

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Zootecnia

Caroline Teixeira Bonifácio

**TESTE DE APRENDIZAGEM E PREFERÊNCIA COM O USO DE LABIRINTO EM
PEIXES**

Belo Horizonte
2023

Caroline Teixeira Bonifácio

**TESTE DE APRENDIZAGEM E PREFERÊNCIA COM O USO DE LABIRINTO EM
PEIXES**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Zootecnia.

Área de concentração: Produção animal/Aquacultura

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

Coorientadora: Dr^a. Gisele Cristina Favero

Belo Horizonte
2023

B715t

Bonifácio, Caroline Teixeira, 1990 -

Teste de aprendizagem e preferência com o uso de labirinto em peixes / Caroline Teixeira

Bonifácio. – 2023.

80 f.il

Orientador: Ronald Kennedy Luz

Coorientadora: Gisele Cristina Favero

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Área de concentração: Produção animal.

Bibliografias: f. 75 a 78.

1. Peixe - Teses - 2. Produção animal - Teses - 3. Veterinária - Teses - I. Luz, Ronald Kennedy - II. Favero, Gisele Cristina - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 639.3

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"TESTE DE APRENDIZAGEM E PREFERÊNCIA COM O USO DE LABIRINTO EM PEIXES"

CAROLINE TEIXEIRA BONIFÁCIO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **28 de fevereiro de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas
Universidade Estadual Paulista



Assinado de forma digital por
Eliane Gonçalves De
Freitas:07204441877
Dados: 2023.03.02 12:57:20 -03'00'

Prof. Dr. Leonardo Demier Cardoso
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado digitalmente
LEONARDO DEMIER CARDOSO
Data: 02/03/2023 13:13:08-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Galileu Crovatto Veras
Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado digitalmente
GALILEU CROVATTO VERAS
Data: 02/03/2023 13:27:17-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Cíntia Labussière Nakayama
Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado digitalmente
CINTIA LABUSSIÈRE NAKAYAMA
Data: 02/03/2023 14:07:47-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz
Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado digitalmente
RONALD KENNEDY LUZ
Data: 01/03/2023 08:16:31-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Belo Horizonte, 28/02/2023.

À minha mãe, muito amada. (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus e Maria por me fazer forte diante das pedras no caminho.

À minha mãe Elza Teixeira que sempre se fez presente e me apoiou até o último suspiro.

À minha família, em especial minha irmã Aline Costa, por sempre ser meu porto seguro.

Aos meus amigos, que de perto ou longe tornam mais leve a caminhada pela estrada da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz pela confiança, oportunidade e orientações sem as quais não seria possível realizar este trabalho.

A todos professores que tive a oportunidade de conhecer e que de diferentes formas contribuíram nessa caminhada.

A todos os animais que tiveram a vida destinada à pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais por toda a estrutura para realizar a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela essencial bolsa de estudos.

“(...) fishes are not just sentient, but aware, communicative, social, tool-using, virtuous, even machiavellian.”

Jonathan Balcome.

RESUMO

Pesquisas relacionadas à ciência cognitiva tem sido a chave para entender o estado interno dos animais e através do labirinto é possível medir de forma confiável a manutenção de informações visual e espacial pelos animais. Buscando compreender o efeito de diferentes fatores na capacidade cognitiva de peixes de água doce foram realizados dois artigos. O objetivo do primeiro artigo foi avaliar se há diferença no aprendizado e preferência entre machos e fêmeas de *Aulonocara nyassae* blue orchid. Enquanto que, o segundo artigo, teve como objetivo avaliar o efeito da cor do ambiente no desempenho de tarefas que envolvem a cognição em labirinto em T e o efeito na preferência por cor em labirinto em cruz, do peixe *Pangasianodon hypothalmus*. O primeiro artigo foi dividido em dois experimentos, em que o experimento 1, os animais foram submetidos ao teste de aprendizagem por associação em labirinto em T. Dentro do labirinto foram colocados uma peça de Lego®, como estímulo neutro, associado a pellets de ração, como estímulo positivo. Após 10 dias de treinamento, foi inserido entre a peça de Lego® e o alimento uma barreira visual, como desafio, mantida durante 5 últimos dias de estudo. Em ambas etapas foram observados o tempo despendido em latência, para realizar a primeira escolha, que permaneceu na primeira escolha, para captura do alimento e o número de associações. No segundo experimento, machos e fêmeas foram submetidos a teste de preferência também em labirinto em T, onde cada braço recebeu um estímulo positivo, abrigo ou alimento. Os animais passaram por 10 dias de treinamento. Posteriormente, permaneceram 20 dias sem contato com o labirinto e após esse período retornaram ao labirinto, após serem submetidos a estresse por exposição ao ar por cinco minutos. Também foi identificado o tempo que o animal despendeu em latência, para fazer a primeira escolha, tempo na primeira escolha e qual foi a primeira escolha realizada. No experimento 1, ambos os sexos foram capazes de aprender associação entre um estímulo neutro com um estímulo positivo, sem distinção. Ao decorrer dos dias experimentais, houve queda no tempo despendido em latência e no tempo gasto para a captura do alimento, para ambos os sexos. No experimento 2, independente do sexo, os animais frequentaram mais o braço com a presença de abrigo. Mesmo após desafio de estresse, a taxa de visita ao abrigo foi maior que de captura de alimento. O artigo 2 foi dividido em duas fases: Fase 1 que consistiu na análise do comportamento aprendido em labirinto em T; e Fase 2 que avaliou se a cor do tanque afeta a preferência por cor em labirinto em cruz. Foram utilizados 24 exemplares de *P. hypothalmus* que participaram de ambos experimentos. O

período experimental foi de 37 dias no total. Os peixes foram alojados em grupo de 6 indivíduos, independente do sexo, para cada tanque de cor azul, branco, preto ou verde. Na fase 1, os animais passaram por um período de ambientação de 2 dias ao labirinto em T. Após esse período foram ao labirinto uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos para observação dos comportamentos. Dentro do labirinto foi posicionado na entrada de um dos braços, escolhido por sorteio, uma peça de Lego® e no final do mesmo braço uma peça de cano PVC com intuito de fornecer abrigo. Os comportamentos analisados durante 15 minutos que o peixe permaneceu no labirinto em T foram: tempo de latência; tempo que o peixe levou para fazer a primeira escolha; tempo que o peixe permaneceu na primeira escolha; tempo que o peixe permaneceu em ócio e tempo para utilizar o cano de PVC como abrigo. No último dia do teste em labirinto T, ao final de cada observação, foi realizada coleta de sangue para análise de hemoglobina, glicose, colesterol e lactato. Na fase 2 os peixes passaram por um período de ambientação ao labirinto em cruz de 2 dias. Após esse período foram ao labirinto uma vez ao dia durante 8 dias consecutivos. Os braços do labirinto foram revestidos com papel opaco na cor azul, branco, verde ou preto. Foi permitido aos peixes nadarem livremente no labirinto por 15 minutos. Durante esse período foi avaliado o tempo e a frequência de visitação em cada braço do labirinto. A cor do ambiente em que foi alojado teve efeito no comportamento dos peixes no labirinto em T e no nível de lactato sanguíneo. No labirinto em cruz *P. hypothalmus* demonstraram preferência pela cor verde. Concluimos que machos e fêmeas de *A. nyassae* blue orchid foram capazes de aprender a tarefa de associação objeto e alimento e que o aprendizado se mantém em condição de desafio. Ambos os sexos também preferem se abrigar a se alimentar mesmo após exposição a estresse. Em relação ao artigo 2 concluimos que a cor do ambiente interfere no comportamento de aprendizado e preferência em labirinto do peixe *P. hypothalmus*.

Palavras-chave: comportamento, etologia, ambiente, lactato, cognição, teste de preferência

ABSTRACT

Research related to cognitive science has been the key to understanding the internal state of animals and through the maze it is possible to reliably measure the maintenance of visual and spatial information by animals. Seeking to understand the effect of different factors on the cognitive capacities of freshwater fish, two articles were carried out. The objective of the first article was to assess whether there is a difference in learning and preference between males and females of *Aulonocara nyassae* blue orchid. While the second article aimed to evaluate the effect of the color of the environment on the performance of tasks involving cognition in a T-maze and the effect on preference for color in a plus-maze of the fish *Pangasianodon hypothalmus*. The first article was divided into two experiments, in which experiment 1, the animals were submitted to the learning test by association in a T-maze. Inside the maze, a Lego® piece was placed, as a neutral stimulus, associated with pellets of food, as a positive stimulus. After 10 days of training, a visual barrier was inserted between the Lego® piece and the food, as a challenge, maintained during the last 5 days of the study. In both stages, the time spent in latency to make the first choice, which remained in the first choice, to capture the food and the number of associations were observed. In the second experiment, males and females were also subjected to a preference test in a T-maze, where each arm received a positive stimulus, shelter or food. The animals underwent 10 days of training. Subsequently, they remained 20 days without contact with the maze and after that period they returned to the maze, after being subjected to stress by exposure to air for five minutes. It was also identified the time that the animal spent in latency, to make the first choice, time in the first choice and which was the first choice made. In experiment 1, both sexes were able to learn the association between a neutral stimulus and a positive stimulus, without distinction. Over the course of the experimental days, there was a decrease in the time spent in latency and in the time spent to capture food, for both sexes. In experiment 2, regardless of sex, the animals frequented the arm with the presence of shelter more. Even after the stress challenge, the shelter visit rate was higher than the food capture rate. Article 2 was divided into two phases: Phase 1, which consisted of analyzing the behavior learned in a T-maze; and Phase 2 which evaluated whether tank color affects color preference in a plus maze. 24 specimens of *P. hypothalmus* that participated in both experiments were used. The experimental period was 37 days in total. The fish were housed in groups of 6 individuals, regardless of gender, in each blue, white, black or

green tank. In phase 1, the animals underwent a 2-day acclimatization period to the T-maze. After this period, they went to the maze once a day for 15 consecutive days to observe behavior. Inside the labyrinth, a Lego® piece was placed at the entrance of one of the arms, chosen by lot, and at the end of the same arm a piece of PVC pipe was placed in order to provide shelter. The behaviors analyzed during the 15 minutes that the fish remained in the T-maze were: latency time; time the fish took to make the first choice; time the fish remained in the first choice; time the fish remained idle and time to use the PVC pipe as a shelter. On the last day of the T-maze test, at the end of each observation, blood was collected for hemoglobin, glucose, cholesterol and lactate analysis. In phase 2, the fish underwent a 2-day acclimatization period to the plus maze. After this period, they went to the maze once a day for 8 consecutive days. The arms of the maze were coated with opaque paper in blue, white, green or black. The fish were allowed to swim freely in the maze for 15 minutes. During this period, the time and frequency of visitation in each arm of the maze was evaluated. The color of the environment in which it was housed had an effect on the behavior of the fish in the T-maze and on the level of blood lactate. In the plus maze *P. hypothalmus* showed a preference for the green color. We conclude that males and females of *A. nyassae* blue orchid were able to learn the task of object and food association and that learning is maintained in a challenging condition. Both sexes also prefer shelter to food even after exposure to stress. Regarding article 2, we concluded that the color of the environment interferes with the learning behavior and preference in the labyrinth of the fish *P. hypothalmus*.

Key-words: behavior, ethology, environment, lactate, cognition, preference test

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1: Association learning and preference of females and males of the blue orchid, *Aulonocara nyassae* Regan, 1922 in a T-maze

- Figure 1.** T-maze for the learning and preference tests of the blue orchid, *A. nyassae*. 41
- Figure 2.** Polystyrene barrier in T-maze for the learning tests of the blue orchid, *A. nyassae* females and male..... 44
- Figure 3.** Experiment 1 and 2 timelines..... 46
- Figure 4.** Number of individual choice between the Lego® piece and food by males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, over the days during Phase 1 and Phase 2 (addition of the polystyrene plate) in the T-maze learning test..... 47
- Figure 5.** Time (seconds) for males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, spent in the first choice in Phase 1 and Phase 2 (addition of polystyrene plate) in the T-maze learning test..... 48
- Figure 6.** Number of individuals choice between shelter and food that males and females of the blue orchid, *A. nyassae* over the days during Phase 1 and Phase 2 (addition of exposure to stress) in the T-maze preference test..... 49
- Figure 7.** Time (seconds) that males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, spent in their first choice during Phase 1 and Phase 2 (addition of exposure to stress) in the T-maze preference test..... 50

ARTIGO 2: A cor do ambiente pode afetar o comportamento e aprendizado de *Pangasianodon hypothalmus* (Sauvage, 1878)?

- Figura 1.** Labirinto em T para teste de aprendizado de *Pangasianodon hypothalmus*..... 64

Figura 2. Labirinto em cruz para teste de preferência por cor de <i>Pangasianodon hypothalmus</i>	67
Figura 3. Linha do tempo.....	68
Figura 4. Gráfico radar com representação da primeira escolha por juvenis <i>P. hypothalmus</i> dos tanques de diferentes cores por dia de visitação ao labirinto em T. Escore 2, mais externo ao gráfico, representa o braço vazio como primeira escolha, enquanto que escore 1 representa a escolha pelo braço indicado pela peça de Lego®, com abrigo.....	71
Figura 5. Média da concentração sanguínea de lactato de juvenis <i>P. hypothalmus</i> , após ida ao labirinto em T, no final do período experimental de 15 dias. São apresentados os valores médios e barra de erros (média \pm EP; n = 6). Letras diferentes nas barras do diagrama indica diferença significatia (P < 0.05, ANOVA unilateral, teste T (LSD de Fisher)).....	72
Figura 6. Frequência de visitação de juvenis de <i>P. hypothalmus</i> em cada braço do labirinto em cruz com diferentes cores durante nove dias de experimento. Valores médios e barra de erro (média \pm EP) são apresentados (n = 6). Letras diferentes nas barras de frequência de visitação indicam diferença significativa (P < 0.05, ANOVA unilateral, teste T (LSD de Fisher)).....	73

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1: Association learning and preference of females and males of the blue orchid, *Aulonocara nyassae* Regan, 1922 in a T-maze

Table 1. Ethogram for observation of *A. nyassae* females and males (n= 12 per sex) in experiment 1 43

Table 2. Ethogram for observation of *A. nyassae* females and males (n= 12 per sex) in experiment 2 45

ARTIGO 2: A cor do ambiente pode afetar o comportamento e aprendizado de *Pangasianodon hypothalmus* (Sauvage, 1878)?

Tabela 1. Etograma para observações de cada peixe no experiment 1 65

Tabela 2. Tempo mediano (segundos) que juvenis de *P. hypothalmus* de tanques de diferentes colorações despenderam em diferentes comportamentos no labirinto em T..... 69

Tabela 3. Número de associações entre a peça de Lego® e o abrigo durante os dias do teste de aprendizado com juvenis de *P. hypothalmus* de diferentes tanques de diferentes cores em labirinto em T 70

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de juvenis *P. hypothalmus* dos tanques de diferentes cores após 15 dias de aprendizado no labirinto em T 71

Tabela 5. Média de tempo (segundos) que juvenis *P. hypothalmus* de diferentes tanques de diferentes cores despendido em cada braço com diferentes cores, em labirinto em cruz 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus <i>Celsius</i>
µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
kg	Quilograma
L	Litro
L:E	Luz:Escuro
LSD	<i>Least Significance Difference</i> - Diferença de menor significância
min	Minutos
mL	Mililitro
mS	<i>MilliSiemens</i>
ppt	Partes Por Trilhão
RAS	Sistema de Recirculação de Água
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Teste de memória como estudo cognitivo em animais de produção	18
2.1.1 <i>Estudo da memória em peixes</i>	20
2.2 Metodologia do labirinto em T	21
2.2.1 <i>Memória operacional e aprendizado espacial</i>	22
2.2.2 <i>Estudos cognitivos em peixes em labirinto em T</i>	23
2.3 Aplicações do labirinto em cruz	25
2.4 Espécies estudadas	26
2.4.1 <i>Biologia e comportamento do peixe ciclídeo africano</i>	26
2.4.2 <i>Biologia e comportamento do peixe panga</i>	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5. ARTIGO 1	37
5.1 Introduction	39
5.2 Material and methods	40
5.2.1 <i>T-maze reconnaissance session</i>	41
5.2.2 <i>Experiment 1. Associative learning</i>	42
5.2.3 <i>Experiment 2. Preference for shelter or food</i>	44
5.2.4 <i>Statistical analysis</i>	46
5.3. Results	46
5.3.1 <i>Experiment 1. Associative learning</i>	46
5.3.2 <i>Experiment 2. Preference for shelter or food</i>	48
5.4. Discussion	50
5.5. Conclusions	53
5.6. Acknowledgments	53
5.7. References	54
6. ARTIGO 2	58
Resumo	59
Abstract	60

6.1. Introdução.....	61
6.2. Material e métodos.....	62
6.2.1 <i>Local de coleta de dados.....</i>	62
6.2.2 <i>Fase 1.....</i>	63
6.2.2.1 <i>Sessão de reconhecimento labirinto em T.....</i>	63
6.2.2.2 <i>Teste de aprendizado em labirinto em T.....</i>	65
6.2.2.3 <i>Hematologia e bioquímica do sangue.....</i>	66
6.2.3 <i>Fase 2.....</i>	66
6.2.3.1 <i>Sessão de reconhecimento do labirinto em cruz.....</i>	66
6.2.3.2 <i>Teste de preferência por cor em labirinto em cruz.....</i>	67
6.2.4 <i>Análise Estatística.....</i>	68
6.3 Resultados.....	69
6.3.1 <i>Fase 1. Teste de aprendizado em labirinto em T.....</i>	69
6.3.1.1 <i>Análises comportamentais.....</i>	69
6.3.1.2 <i>Hematologia e bioquímica do sangue.....</i>	71
6.3.2 <i>Fase 2. Teste de preferência em labirinto em cruz.....</i>	72
6.4 Discussão.....	74
6.5 Conclusões.....	76
6.6 Referências.....	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

A forma mais difundida de mensurar o bem-estar dos animais são as cinco liberdades que trazem à tona a pertinência do estado emocional destes, onde a quinta liberdade salienta a importância do animal ser livre de medo e de estresse, com prevalência de emoções positivas (Webster, 1986; FAWC, 1993). Assim como, o atual modelo sistemático de aplicação do bem-estar animal aos sistemas intensivos de produção animal, denominado Cinco domínios também inclui o domínio mental (estado mental ou afetivo), considerando o impacto físico e/ou funcional no bem-estar dos animais (Mellor; Reid, 1994).

O estudo da emoção tem sido realizado, tradicionalmente, por intermédio de medidas fisiológicas e testes comportamentais específicos, tendo em vista que os processos cognitivos podem influenciar as emoções do mesmo modo que as emoções podem influenciar a cognição dos animais (Murphy et al., 2013). Os estudos sobre as habilidades dos animais são necessários para que se possa garantir o bem-estar nos sistemas de produção, considerando que a capacidade cognitiva influencia a maneira como estes interpretam situações do cotidiano e em como os consumidores finais relacionam com esses animais cobrando práticas de bem-estar nos sistemas de produção (Forkman, 2000). Assim, pesquisas relacionadas à ciência cognitiva tem sido a chave para a compreensão do estado interno dos animais nos diferentes sistemas de produção, o que torna possível o entendimento sobre as necessidades desses com intuito de promover a saúde e o bem-estar, apreciando as variações individuais existentes intra e interespecífica (Bushby et al., 2018).

Nesse sentido, o labirinto em T tem sido amplamente utilizado como aparato de estudo comportamental de aprendizado, medindo de forma confiável a manutenção de informações visual e espacial (Wenk, 2004). Parece haver uma interação de reconhecimentos espaciais e sequência de movimento, de modo que, sob certas circunstâncias, pelo menos, uma resposta pode ser determinada pela sequência precedente de movimentos, independentemente de suportes espaciais explícitos (Blodgett e Mccutchan, 1947).

Para que o animal aprende a tarefa no labirinto, duas estratégias são possíveis; as egocêntricas que são baseadas na relação ao corpo do animal e o braço do labirinto e estratégia alocêntrica, relativa ao local, baseada em pistas não relacionadas ao animal (Olton, 1979). Porém, fatores intrínsecos ao indivíduo, como por exemplo a personalidade, podem influenciar na realização da tarefa (Mamuneas et al., 2015).

É prática o animal ir ao labirinto em jejum enquanto um dos braços se encontra com alimento como recompensa, associado a um marcador visual, sendo esse um objeto não

conhecido pelo animal (Deacon e Raylins, 2006). Existem diferentes tipos de motivadores que podem ser usados em teste de aprendizagem e memória no labirinto; entretanto, para que os pesquisadores consigam identificar nos animais o que aprenderam e lembraram, esses devem estar motivados para realizar a tarefa em questão (Bimonte-Nelson, 2015). Assim, a escolha do motivador adequado a aquela espécie estudada é essencial para a execução da pesquisa.

O labirinto em T ainda permite observações diretas da cognição usando métodos de abordagem de investigações, com base em hipóteses da influência de distintos fatores nas tomadas de decisões, analisando a flexibilidade cognitiva nos animais (Weber et al., 2019).

Outro modelo de labirinto, amplamente utilizado para estudos cognitivos em animais, é o labirinto em cruz. Este aparato é um intermediário entre o labirinto radial e o labirinto em T, com procedimentos similares ao labirinto em T. Por intermédio de sinais espaciais permite a navegação do animal, sendo possível o estudo de tarefa de localização, correspondência de amostra atrasada, trabalho espacial e retenção de memória de curto prazo (Bimonte-Nelson, 2015). O labirinto em cruz permite o entendimento do estado emocional do animal com base nas respostas comportamentais, como a timotaxia e evitar a luz em estudo de ansiedade (Gould, 2010). Também permite o estudo das estratégias comportamentais dos animais na execução de atividade de exploração do ambiente associado com outros fatores, como a idade do animal (Pankova et al., 2018).

Com isso, estudos comportamentais através da metodologia do labirinto em T e do labirinto em cruz permitem o entendimento da cognição dos animais de produção, ou seja, a capacidade dos animais de detectarem as mudanças que ocorrem no ambiente ao seu redor, e assim, embasa a busca por sistemas de produções que proporcione bem-estar a estes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Teste de memória como estudo cognitivo em animais de produção

Uma grande variedade de espécies de animais possui capacidade cognitiva, ou seja, são capazes de aprenderem tarefas e o nível de abstração pode ser medido através da transferência completa do aprendizado (Wright, 2018). Para avaliar a capacidade cognitiva existem diferentes tipos de metodologia disponíveis, como cognição espacial, memória, cognição social, aprendizado social, raciocínio inferencial, aprendizado por discriminação e permanência do

objeto, condicionamento clássico, condicionamento operante e compreensão numérica (Bushby et al., 2018).

Em estudos de memória espacial com ovelhas, baseado na premissa que herbívoros podem aprender relação de localização do alimento preferido em grandes áreas por meio de marcadores na paisagem, como manchas nas folhas da pastagem, principalmente na ausência de pistas olfativas. Dumont e Petit (1998) observaram que esses animais aprenderam rapidamente a localização de alimento preferido na pastagem, optando por locais onde ocorre a abundância da recompensa alimentar, o que leva a maior eficiência do consumo, ou seja, menor gasto de energia com maior consumo de alimento.

Forkman (2000) observou que as aves poedeiras possuem capacidade de formar representações declarativas, ou seja, relações entre eventos e formação de mapa cognitivo. Pintinhos de cinco dias de idade também foram capazes de formar mapas mentais codificando e armazenando informações sobre localizações de diferentes alimentos (Cozutti e Vallortigara, 2001). Também são formados nesses animais mapas mentais, com atualização contínua da representação local do parceiro social, com habilidades para manter essas memórias funcionais (Vallortigara et al., 1998; Regolin et al., 2005).

Em tarefa de labirinto, ao comparar desempenho entre minis-porcos e suínos de sistemas de produção, Murphy et al. (2013) observaram que os minis-porcos responderam de forma mais rápida às pistas, apresentando desempenho de aprendizado diferente dos suínos de sistema de produção. Os autores atrelaram essa diferença ao manejo padrão diferenciado para cada raça; porém, como ambas apresentaram semelhança na discriminação entre estímulos positivo e negativo e nível comparável de desempenho, concluíram que o conhecimento de manejo de uma raça pode ser aplicado a outra.

Também em labirinto, ovelhas foram capazes de resolver tarefas; porém, a experiência com estímulos negativos influenciou na capacidade cognitiva desses animais, com aumento no tempo para resolver a tarefa, principalmente durante o primeiro dia no labirinto (Doyle et al., 2014). Ratos expostos a gato, principal predador, quando colocados no labirinto, imediatamente após exposição tiveram a esquivia inibitória seletivamente facilitada sem alterar a expressão de escape no labirinto (Bulos et al., 2015). Segundo os mesmos autores, após o uso de ansiolítico associado à exposição, houve queda da resposta de fuga perante o predador, prejudicando o comportamento de esquivia no labirinto.

Prescott et al. (1998) buscando demonstrar a importância de reforço positivo no ato da ordenha de gado leiteiro, dispuseram em labirinto a opção de o animal escolher entre ser ordenhado ou se alimentar. Segundo os autores, os resultados indicaram que a motivação para

ser ordenhada é fraca e sem ligação ao estágio de lactação do animal, em contramão da robustez da motivação ao acesso ao alimento. Usando o mesmo aparato, em estudo da hierarquia social Rioja-Lang et al. (2012) observaram que vacas de níveis baixos da hierarquia preferem se alimentar sozinhas e/ou sacrificar a qualidade do alimento com intuito de evitar o contato próximo com dominantes, levantando a importância de fornecer área de alimentação em tamanho adequado em sistemas de produção.

Bruslé e Quignard (2020) relataram que durante muito tempo, o estudo de comportamento animal teve foco em espécies mais familiares, em particular mamíferos que são mais intimamente ligados aos humanos, e os peixes, apesar de serem amplamente produzidos e consumidos não recebiam tanta atenção. Esses autores informaram que esse panorama tem mudado e que estudos recentes trouxeram descobertas de comportamento extraordinários que os peixes são capazes de realizar, levantando a importância dos avanços da etologia em peixes.

2.1.1 Estudo da memória em peixes

Os estudos da cognição dos peixes são mais recentes quando comparado aos outros animais de sistema de produção, fato este em decorrência da tardia confirmação de sua sciência (Pedrazzani et al., 2007). O peixe *Danio rerio* tem recebido destaque em pesquisa de cognição e com ampla gama de testes comportamentais foi demonstrado que indivíduos dessa espécie apresentam habilidades avançadas no processamento visual, paradigmas de condicionamento clássico e operante, resolução de labirintos espaciais, discriminação de cores e objetos, orientações de linhas/formas e reconhecimento de objetos (Hamilton, 2018).

Em estudos com outras espécies de peixes também já foram demonstradas capacidades cognitivas, como por exemplo, o acará-Bandeira (*Pterophyllum scalare*) que foi capaz de discriminar grupos de coespecíficos pela quantidade de indivíduos e de demonstrar preferências por grupos maiores a partir de informações retidas na memória de trabalho (Gómez-Laplaza e Gerlai, 2015). Essa capacidade de discriminar é importante, principalmente, para animais que vivem em cardumes, com função nas atividades de forragear e fuga de predadores (Gómez-Laplaza e Gerlai, 2016).

A partir do conhecimento da capacidade cognitiva que diferentes espécies de peixes apresentam, se torna possível o estudo do efeito que o ambiente de produção tem sobre esses animais. Tendo em vista que as distintas situações experimentadas influenciam diretamente no comportamento, e que animais cativos tem comprometimento na plasticidade neural, Salvanes et al. (2013) identificaram que o uso de enriquecimento no ambiente de criação tem efeitos

positivos, melhorando a capacidade de aprendizado de juvenis de salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*). O ambiente enriquecido fomenta uma recuperação mais rápida após vivenciar uma experiência estressante e melhora o desenvolvimento do comportamento social, sendo que em bacalhau juvenil (*Gadus morhua*) propiciou melhor observação de coespecíficos resultando em desenvolvimento social sofisticado (Strand et al., 2010). Interessante pensar que esses resultados associados às pesquisas, primeiro com humanos e depois com animais, relacionam experiências com excitação emocional ao favorecimento da durabilidade da memória (McGaugh, 2018).

Outro fator que pode interferir na memória e resposta de aprendizado em peixes como *D. rerio* é a lateralidade, uma característica conservada evolutivamente identificada na produção motora da lateralização do cérebro e que está presente em todos os animais, podendo ser afetada em decorrência de transtornos cognitivos e neuropsiquiátricos, incluindo ansiedade e transtorno depressivo maior (Fontana et al., 2019).

Dentro da mesma espécie pode haver diferença na cognição em relação ao sexo, sendo esse fato devido a que machos e fêmeas fazem diferentes escolhas, mesmo que inseridos em ambiente semelhantes (Cummings, 2018). Fêmeas de *Astatotilapia burtoni* demonstraram, através do paradigma de reconhecimento espontâneo de objetos, despender mais tempo para se aproximar do objeto novo, exibir latências de decisão mais longas e velocidades de correção de erro mais rápidas, comparada a machos (Wallace e Hofmann, 2021). Uma metodologia para estudar memória de peixes seria o uso de labirintos.

2.2 Metodologia do labirinto em T

O labirinto em T é um modelo que há mais de 60 anos é amplamente difundido para estudos comportamentais e em decorrência de possuir o formato da letra T fornece ao animal duas escolhas diretas: seguir a direita ou à esquerda (Olton, 1979). O aparato permite entender a memória de trabalho e de curto prazo utilizadas pelos animais, método inicialmente prolífico no estudo comportamental de ratos e camundongos que trouxe muitas informações e perspectivas para futuros trabalhos sobre aprendizagem e memória em outros grupos de animais (Bimonte-Nelson, 2015).

É uma ferramenta utilizada para estudos da habilidade cognitiva em animais vertebrados, podendo ser elevado ou fechado, disposto de forma horizontal, onde os animais são colocados

na base do T e liberados para que possam escolher livremente um dos braços na ponta oposta (Deacon e Raylins, 2006).

Apesar da sua simplicidade de execução, devido ao qual foi bastante propagado, a instrumentação desse aparato está longe de ser trivial. Dentro do labirinto, duas disposições são assumidas para que o aprendizado aconteça: o animal virar para um dos lados a partir do ponto de escolha e se mover do ponto de escolha em direção a recompensa, podendo assim fazer a escolha correta depois de adquirir uma ou ambas dessas disposições (Blodgett e McCutchan, 1947). Em adição, o animal aprende a relação de lugar, situação concreta a partir de objetos em relação espacial, o que parece haver uma interação de reconhecimentos espaciais e sequência de movimento, tendo os sentidos papel importante para êxito na atividade (Woodworth, 1938).

Os animais podem alternar em diferentes classes de pistas para resolver o labirinto ou podem usar marcadores visuais extra labirinto para realizar a tarefa com êxito; porém, mesmo na ausência de marcadores a memória sobre qual curva foi feita anteriormente não é interrompida, e assim, tem a capacidade de reconhecer e lembrar a última ação em um local específico (Dudchenko, 2001).

2.2.1 Memória operacional e aprendizado espacial

A memória operacional é necessária para realização de tarefas complexas de raciocínio, compreensão e aprendizagem no labirinto, baseado na integração das informações mantidas com a regra aprendida, podendo essas respostas de alternâncias serem estimuladas pelo reforço alimentar (Leggio et al., 2020). O peixe *D. rerio* consegue visualizar cores semelhantes aos humanos, o que faz com que as cores sejam um estímulo frequentemente usado no aparato para estudos com essa espécie (Avdesh, 2012). Além das cores padrões como listras, estampa xadrez, entre outras, também são igualmente usados como estímulos visuais para os testes (Saili, 2012).

Os testes no labirinto em T podem ser realizados utilizando ambientes monocromáticos ou objetos para associação a recompensa (Bault et al., 2015). Porém, segundo os autores estudos indicam que se deve ter cautela no uso de associação com cores, principalmente com peixes da mesma espécie, onde indivíduos de sexo diferentes podem apresentar preferência por cor distintas.

A cadeia de estímulo-resposta desencadeada no processo de aprendizado espacial no teste em labirinto faz parte do aprendizado associativo, que é um condicionamento clássico Pavloviano, no qual é utilizada a associação de um estímulo neutro com um estímulo condicionante, que é um estímulo expressivo para o animal de forma positiva ou negativa (Gould, 2010). A partir do condicionamento surgem inúmeras possibilidades de estudos, como por exemplo o efeito do álcool no aprendizado espacial e retenção de aprendizado (Yang et al., 2003). A preferência natural por determinados ambientes pode ser usada na qualidade de estímulo positivo, por exemplo, braço mais profundo e até mesmo o enriquecimento do braço com componentes preferidos, como vegetação (Ninkovic et al., 2006; Peitsaro et al., 2003).

Por intermédio do aparato do labirinto, também pode ser analisado qualquer tipo de preferência natural, desde que previamente determinadas as opções a serem testadas, levando em conta que no labirinto em T é esperado uma escolha aleatória e equivalente (50%) dos lados, sendo indispensável a sucessividade dos testes para a compreensão das preferências (Volpato et al., 2007). Outras problemáticas como, por exemplo, os efeitos da disposição genética, alterações químicas, substâncias promissoras no tratamento de distúrbios específicos podem ser elucidadas através de estudos comportamentais no aparato (Takahashi et al., 2005; McGaugh et al., 2009; Grossman et al., 2010).

2.2.2 Estudos cognitivos em peixes em labirinto em T

Conforme é sabido, peixes possuem capacidade de aprender e codificar sequências ordenadas ou listas de pontos de referência, integrando várias informações espaciais complexas e parecem usar uma região do cérebro homóloga ao hipocampo de vertebrados terrestres (Braithwaite e Burt-de-Perera, 2006). Assim, apresentam capacidades cognitivas de aprendizado em labirinto em T comparável aos mamíferos, como primatas e roedores (Lucon-Xiccato e Bisazza, 2017). Os autores reforçam que esse fato pode ter contribuído com a diversidade de espécies e o sucesso de adaptação a diferentes ambientes aquáticos, tendo em vista que as habilidades em labirinto favorecem a vida dos animais em ambientes com estrutura espaciais complexas.

Estudos comprovaram que peixes podem aprender associações entre estímulos casuais de forma satisfatória por meio de formas complexas de aprendizado, sem distrair com outras pistas (Luchiari, 2016). Nesse contexto de labirinto, os peixes tendem a maximizar os benefícios de ser comportamentalmente plásticos, ao mesmo tempo que minimizam os custos e aprendem a

selecionar as pistas de forma eficiente, construindo e mantendo mapas mentais apenas quando os custos metabólicos podem ser compensados pela maior eficiência na aquisição de alimento ou parceiros (Odling-Smee e Braithwaite, 2003). Vale lembrar que o uso do labirinto em T para estudos dos efeitos da exposição de neurotóxicos devem levar em conta a possível alteração nas preferências inatas que podem ocorrer (Bault et al., 2015).

Odling-Smee e Braithwaite (2003) trazem que a capacidade de orientação que os peixes possuem é um exemplo de questionamento que o aparato possibilita compreender, como por exemplo o efeito do habitat natural no uso de marcos visuais na orientação de rotas. A estabilidade do habitat influencia na reposta de aprendizagem por marco visuais, confirmando a premissa que o comportamento aprendido é ajustado em resposta às condições ambientais locais (Odling-Smee e Braithwaite, 2003). Outro evento é o estudo do efeito da poluição química na memória de *D. rerio*, combinando esquiva passiva e teste de memória espacial, onde o choque elétrico a baixa voltagem, como estímulo negativo, foi usado em contraposição a cor preferida como marco visual (Hieu et al., 2020), assim como investigar a discriminação visual em *D. rerio* baseado no condicionamento, tendo o alimento como reforço positivo (Colwill et al., 2005).

Também pode ser investigado, com uso do aparato, relação da lateralização animal e sua herdabilidade (Bisazza et al., 2001). Outro exemplo de estudo é em relação ao efeito do ambiente em que o animal é mantido no seu desenvolvimento cognitivo, como por exemplo, a coloração predominante no ambiente e seu efeito na aprendizagem, questionamento esse que pode ser elucidado através da metodologia do labirinto em T (Torres et al., 2018).

Com base nos resultados encontrados por intermédio deste aparato há possibilidade de usos em programas genéticos ou de desenvolvimento, que orientam os processos perceptivos e de aprendizagem, incluindo a nível populacional (Odling-Smee e Braithwaite, 2003). Dessa forma, esse aparato ganhou destaque nas atividades de pesquisas comportamentais buscando a melhoria da produção animal e, conseqüentemente, para o uso em diversas finalidades deve ser adaptado a diferentes espécies.

Em relação ao labirinto em si, as dimensões variam dependendo do tipo de teste e em decorrência da espécie estudada. Entretanto, deve-se levar em conta que labirintos pequenos não apresentam nenhuma dificuldade espacial, bem como, à medida que o corredor central é alongado há um aumento no grau de dificuldade de aprendizado e faz-se necessário a adição de caracteres de espaços diferenciais para que os animais possam formar as associações adequadas, juntamente com uma sessão de reconhecimento do aparato em momento prévio ao teste propriamente dito (Blodgett e McCutchan, 1947). Vale ressaltar, também, que o labirinto

apresenta o tempo necessário para que cada animal realize a tarefa, como limitante para o estudo, sendo desafiador testar um número grande de animais no mesmo procedimento (Leggio et al., 2020).

2.3 Aplicações do labirinto em cruz

O teste com labirinto em cruz elevado é bem documentado para estudo de ansiedade em roedores e já validado para peixes, por meio da análise do comportamento do animal de aversão ao braço aberto pode-se inferir sobre o nível de ansiedade que o animal apresenta (Hope et al., 2019). Em uso como labirinto em cruz submerso, adaptação para estudo da ansiedade em peixes, o labirinto tem as paredes de dois braços revestidos pela coloração preta e dois braços revestidos pela cor branca, em analogia aos braços fechados e abertos no estudo com roedores, respectivamente (Gould, 2010). Os autores acrescentaram que as análises comportamentais feitas com os peixes são semelhantes as com roedores, sendo computados o número de vezes que os animais ultrapassam a área central mudando de ambiente, o tempo que permaneceram em cada ambiente, assim como o tempo de latência.

Além de ser um aparato para teste de ansiedade, o labirinto em cruz pode ser usado para análise de outros comportamentos, como estudo do comportamento exploratório em peixes com análise de estratégias de exploração, buscando comparar a organização comportamental entre organismos (Pankova et al., 2018). Experimentos mostraram que os peixes podem formar respostas de orientação com base nas superfícies e eixos do corpo ou através de referências físicas como forma de associação (Rodríguez et al., 2021).

Outro exemplo de comportamento que pode ser analisado através do aparato é a aprendizagem associativa com dois sinais simples ou com sinais relacionais mais complexos, incluindo a análise dos mecanismos destas funções (Sison e Gerlai, 2010), como também estudo de aprendizado espacial e desempenho de memória, através de pistas visuais e estudo de preferência entre as pistas (Abreu et al., 2019).

Diferentes tipos de teste e vários protocolos podem ser aplicados no aparato do labirinto, sendo importante ter clareza sobre o que está sendo avaliado, definindo o aprendizado e memória e a forma operacional mais viável para a execução (Bimonte-Nelson, 2015).

2.4 Espécies estudadas

2.4.1 *Biologia e comportamento do peixe ciclídeo africano*

Aulonocara nyassae blue orchid (Regan, 1922) pertencente a família Cichlidae, a maior família de peixes e mais rica em espécies, com cerca de 70-80% encontrada na África nos lagos Victoria, Tanzânia e Malawi (Satuffer et al., 2006). O lago Malawi contempla metade do número das espécies, essa biodiversidade surpreendente pode ser justificada a partir de duas teorias; especiação ecológica devido ao tipo de alimentação e seleção sexual por meio da escolha da fêmea (Danley e Kocher, 2001). O gênero *Aulonocara* é endêmico lago Malawi sendo encontrado de 4 a 75 metros de profundidade na região costeira, em áreas de transição entre rocha/areia, onde se alimentam dos substratos e usam esconderijos da rocha (Grant, 1987).

Este gênero é caracterizado por grandes canais com amplas aberturas nos ossos frontal, nasal, orbital, pré-opercular e mandibular (Konings, 1990). Um comportamento comum ao gênero está relacionado a estratégia de alimentação incomum em que os indivíduos nadam próximo ao sedimento arenoso e capturam presas invertebradas enterradas no substrato (Konings, 2007). Esse comportamento está relacionado aos canais alargados, tendo em vista que essa adaptação permite melhor detecção de estímulos hidrodinâmicos das presas invertebradas bentônicas (Schalwabe, 2015).

Vários grupos formam o gênero *Aulonocara* e cada grupo contém várias espécies com características morfológicas e comportamentais semelhantes. O repertório comportamental é uma característica importante para distinção das espécies de ciclídeos (Satuffer et al., 2006). A espécie *A. nyassae* vive em habitat arenoso e formam pequenos cardumes contendo um macho com coloração territorial (Konings, 1995).

Em geral, os peixes ciclídeos são de interesse para indústria do aquarismo devido às cores fortes que os tornam visualmente atrativos (Karsli, 2021). *Aulonocara* é um dos gêneros de ciclídeos mais cultivados na aquicultura devido à facilidade de manejo, tendo grande importância econômica (Olaleye, 2017). Porém, há poucas informações sobre essa espécie principalmente em relação ao seu repertório comportamental em cativeiro.

2.4.2 *Biologia e comportamento do peixe panga*

O *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) é um peixe demersal pertencente à família Pangasiidae geralmente encontrados em grandes rios, com ocorrência em toda a parte da bacia do Mekong, no sudeste da Ásia (Rainboth, 1996). São conhecidos popularmente como

bagres tubarões e podem alcançar até 1,50 m de comprimento; vivem em águas paradas ou correntes, possuem alimentação onívora consumindo principalmente crustáceos, peixes, frutas e detritos em áreas de várzeas (Poulsen et al., 2004). É uma espécie de importância para a aquicultura e para a pesca, mas também com grande demanda na indústria ornamental devido às cores do corpo vibrantes atraentes que afetam diretamente no seu valor comercial (Singh e Lakra, 2012), estando entre as espécies favoritas dos aquaríofilos (Rainboth, 1996). Possui fácil cultivo, com alto rendimento e baixo custo de implementação e por isso tem se difundido em todo o mundo (Shah et al., 2014). A espécie apresenta crescimento rápido, atingindo o tamanho para venda em poucos meses e é tolerante a alta densidade quando comparada a outras espécies já produzidas (Khan et al., 2017).

No Brasil, apesar do cultivo ter sido regulamentado somente nos estados de São Paulo e Tocantins, *P. hypophthalmus* é comercializado para fins de aquariofilia em sete estados e comercializado como alimento em todo território brasileiro (Garcia et al., 2018).

No ambiente natural a desova ocorre com a deposição dos ovos no sistema radicular de plantas aquáticas (Rainboth, 1996). As larvas eclodem com as características morfológicas imaturas, mas apresentam desenvolvimento dos órgãos sensoriais de forma rápida acompanhando o crescimento do peixe, sendo que com dois dias de idade já tem os olhos bem desenvolvidos como uma possível adaptação para sobrevivência em águas correntes (Mukai et al., 2010).

O fotoperíodo tem efeito direto no comportamento de *P. hypophthalmus*, por serem peixes com hábito noturno. Em fotoperíodo natural, ao entardecer se encontram mais ativos, nadadeiras em movimento rápido e permanecem mais no fundo e na presença de luz diminuem a atividade natatória (Windarti et al., 2019). A visão desempenha papéis importantes no comportamento de bagres e se encontra totalmente funcional durante o dia, assim apesar de diminuir a atividade os bagres continuam ativos durante o dia (Ching et al., 2015).

Contudo, pouco se sabe sobre o comportamento dessa espécie quando mantida em ambientes de diferentes cores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a habilidade cognitiva e preferência de blue orchid, *Aulonocara nyassae* e *Pangasianodon hypothalmus* utilizando labirintos com diferentes metodologias.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar se *P. hypothalmus* e blue orchid, *A. nyassae* são capazes de aprender tarefa de condicionamento clássico;
- Analisar se o sexo do peixe blue orchid, *A. nyassae* interfere no desempenho cognitivo em labirinto em T;
- Analisar se o sexo do peixe blue orchid, *A. nyassae* interfere na escolha entre abrigo e alimento em labirinto em T;
- Analisar se o estresse pela exposição ao ar do peixe blue orchid, *A. nyassae* interfere na escolha entre abrigo e alimento em labirinto em T;
- Analisar se a cor do ambiente interfere no desempenho cognitivo de *P. hypothalmus* em labirinto em T;
- Avaliar o efeito da cor do ambiente nos parâmetros sanguíneos de *P. hypothalmus* após ida ao labirinto em T;
- Identificar a preferência de *P. hypothalmus* por coloração predominante no ambiente;
- Analisar se a cor do ambiente em que o *P. hypothalmus* está alojado afeta na preferência por coloração do braço do labirinto em cruz.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, C.C., Fernandes, T.N., Henrique, E.P., Pereira, P.D.C., Marques, S.B., Herdeiro, S.L.S., Oliveira, F.R.R., Magalhães, N.G.M., Anthony, D.C., Melo, M.A.D., Guerreiro-Diniz, C., Diniz, D.G., Picanc o-Diniz, C.W., 2019. Braz. J. Med. Biol. Res., 52, 5, e8026. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20198026>
- Avdesh, A., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Chen, M., Askraba, S., Morgan, N., Lardelli, M., Groth, D.M., Verdile, G., Martins, R.N., 2012. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory. J. Alzheimer's Dis., 28, 459-469. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110704>
- Bault, Z.A., Peterson, S.M., Freeman, J.L., 2015. Directional and color preference in adult zebrafish: Implications in behavioral and learning assays in neurotoxicology studies. J. Appl. Toxicol. 35, 1502-1510. <https://doi.org/10.1002/jat.3169>
- Bimonte-Nelson, H.A., 2015. The maze book: Theories, Practice, and Protocols for Testing Rodent Cognition. Canada: Humana Press. <https://10.1007/978-1-4939-2159-1>
- Bisazza, A., Sovrano, V.A., Vallortigara, G., 2001. Consistency among different tasks of left-right asymmetries in lines of fish originally selected for opposite direction of lateralization in a detour task. Neuropsychol. 39, 1077-1085. [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(01\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(01)00034-3)
- Blodgett, H.C., McCutchan, K., 1947. Place versus response learning in the simple T-maze. J. Exp. Psychol., 37, 412.
- Braithwaite, V.A., Burt-De-Perera, T., 2006. Short-range orientation in fish: How fish map space. Mar. Freshw. Behav. Physiol., 39, 37-47. <https://doi.org/10.1080/10236240600562844>
- Bruslé, J., Quignard, J.P. Fish behavior 1. London: ISTE Ltda, 2020. 258 p.
- Bulos, E.M., Pobbe, R.L.H., Zangrossi Jr., H., 2015. Behavioral consequences of predator stress in the rat elevated T-maze. Physiol. Behav. 146, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.019>

- Bushby, E.V., Friel, M., Goold, C., Gray, H., Smith, L., Collins, L.M., 2018. Factors influencing individual variation in farm animal cognition and how to account for these statistically. *Front. Vet. Sci.*, 5, 193. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00193>
- Ching, F.F., Senoo, S., Kawamura, G., 2015. Relative Importance of Vision estimated from the Brain pattern in African catfish *Clarias gariepinus*, river catfish *Pangasius pangasius* and red tilapia *Oreochromis* sp. *Int. Res. J. Biological Sci.* 4, 1, 6-10.
- Colwill, R.M., Raymond, M.P., Ferreira, L., Escudero, H., 2005. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Processes.* 70, 19–3. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.03.001>
- Cummings, M.E., 2018. Sexual conflict and sexually dimorphic cognition—reviewing their relationship in poeciliid fishes. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 72, 73. <https://doi.org/10.1007/s00265-018-2483-9>
- Danley, P., Kocher, T., 2001. Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. *Mol. Ecol.* 10, 1075–1086. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01283.x>
- Deacon, R.M.J., Raylins, J.N.P., 2006. T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 1, 7–12. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>
- Doyle, R.E., Freire, R., Cowling, A., Knott, S.A., Lee, C., 2014. Performance of sheep in a spatial maze is impeded by negative stimuli. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 151, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.11.009>.
- Dudchenko, P.A., 2001. How do animals actually solve the T maze? *Behav. Neurosci.* 115, 850-860. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.4.850>
- Dumont, B., Petit, M., 1998. Spatial memory of sheep at pasture. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 60, 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00152-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00152-X)
- FAWC – Farm Animal Welfare Council. 1993. Second report on priorities for research and development in farm animal welfare. UK: MAFF: Tolworth.
- Fontana, B. D., Cleal, M., Clay, J.M., Parker, M.O., 2019. Zebrafish (*Danio rerio*) behavioral laterality predicts increased short-term avoidance memory but not stress-reactivity responses. *Anim. Cogn.* <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01296-9>
- Forkman, B., 2000. Domestic hens have declarative representations. *Anim. Cogn.*, 3, 135–137. <https://doi.org/10.1007/s100710000074>

- Gómez-Laplaza, L.M., Gerlai, R. 2015. Angelfish (*Pterophyllum scalare*) discriminate between small quantities: a role of memory. *J. Comp. Psychol.*, 129, 78–83. <https://doi.org/10.1037/a0038228>
- Gómez-Laplaza, L.M., Gerlai, R., 2016. Discrimination of large quantities: Weber's law and short-term memory in angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Anim. Behav.*, 112, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.10.022>
- Gould, G.G., 2010. Modified Associative Learning T-Maze Test for Zebrafish (*Danio rerio*) and Other Small Teleost Fish. In: Kalueff, A. V., Cachat, J. M. (eds.), *Zebrafish Neurobehavioral Protocols. Neuromethods*, 51. Totowa: Humana Press, 61-73.
- Grant, S.M., Dieckhoff, H.W., Mayland, H.J., Meyer, M.K., 1987. Ecology of *Aulonocara* REGAN, 1922 in Lake Malawi. *Cour Forsch Lnst Senckenberg*. 94:131–139.
- Grossman, L., Utterback, E., Stewart, A., Gaikwad, S., Chung, K.M., Suci, C., Wong, K., Elegante, M., Elkhayat, S., Tan, J., Gilder, T., Wu, N., DiLeo, J., Cachat, J., Kalueff, A.L., 2010. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav. Brain. Res.* 214, 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.039>
- Hamilton, T.J., 2018. Object Novelty and Object Location Recognition Memory in Fish – Recent Advances. In: *Handbook of Object Novelty Recognition*, Elsevier, 27, 151–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00009-4>
- Hieu, B.T.N., Anh, N.T.N., Audira, G., Juniardi, S., Liman, R.A.D., Villaflores, O.B., Lai, Y., Chen, J., Liang, S., Huang, J., Hsiao, C., 2020. Development of a modified three-day T-maze protocol for evaluating learning and memory capacity of adult zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21041464>
- Hope, B.V., Hamilton, T.J., Hurd, P.L., 2019. Submerged plus maze: A novel test for studying anxiety-like behaviour in fish. *Behav. Brain. Res.*, 362, 332-337. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.012>
- Khan, A., Guttormsen, A., Roll, K.H., 2017. Production risk of pangas (*Pangasius hypophthalmus*) fish farming. *Aquac. Econ. Manag.* <http://dx.doi.org/10.1080/13657305.2017.1284941>
- Konings, A., 1995. A review of the sand-dwelling species of the genus *Aulonocara*, with the description of three new species. *The Cichlids Yearbook*. 5:26–36.
- Konings, A., 1990. *Koning's Book of Cichlids and Other Fishes of Lake Malawi*. Neptune City, NJ: TFH Publications Inc.

- Konings, A., 2007. *Malawi Cichlids in Their Natural Habitat*, 4 edn. El Paso, TX: Cichlid Press.
- Leggio, G.M., Torrisi, S.A., Papaleo, F., 2020. The Discrete Paired-trial Variable-delay T-maze Task to Assess Working Memory in Mice. *Bio Protoc.* 10. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3664>
- Luchiari, A.C., 2016. How *Betta splendens* finds its way. *Behav. Processes.* 124, 47–5. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.11.021>
- Lucon-Xiccato, T., Bisazza, A., 2017. Complex maze learning by fish. *Anim. Behav.* 125, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.12.022>
- Mamuneas, D., Spence, A.J., Manica, A., King, A.J., 2015. Bolder stickleback fish make faster decisions, but they are not less accurate. *Behav. Ecol.* 26, 91–96. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru160>
- McGaugh, J.L., 2018. Emotional arousal regulation of memory consolidation. *Curr. Opin. Behav. Sci.*, 19, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.10.003>
- Mcgaugh, J.L., Roozendaal, B., 2009. Drug enhancement of memory consolidation: Historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacol.* 202, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1285-6>
- Mukai, Y., Tuzan, A.D., Shaleh, S.R.M., Manjaji-Matsumoto, B.M., 2010. Development of sensory organs and changes of behavior in larvae of the sutchi catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Fish Sci.*, 76, 921–930. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0290-y>
- Murphy, E., Nordquist, R.E., Staay, F.J.D.V., 2013. Responses of conventional pigs and Göttingen miniature pigs in an active choice judgement bias task. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 148, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.07.01>
- Ninkovic, J., Folchert, A., Makhankov, Y.V., Neuhauss, S.C.F., Sillaber, I., Straehle, U., Bally-Cuif, L., 2006. Genetic identification of AChE as a positive modulator of addiction to the psychostimulant D-Amphetamine in zebrafish. *J. Neurobiol.* 66, 463–475. <https://doi.org/10.1002/neu.20231>
- Odling-Smee, L., Braithwaite, V.A., 2003. The influence of habitat stability on landmark use during spatial learning in the three-spined stickleback. *Anim. Behav.*, 65, 701–707. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2082>

- Olaleye, O.A. Assessment of the use of DNA barcoding for identification of some cichlid species. 2017. Dissertation (master in zoology) – University of Johannesburg, Johannesburg.
- Olton, D.S., 1979. Mazes, maps, and memory. *Am. Psychologist.*, 34, 583. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.34.7.583>
- Pankova, N.A., Bolotovskiy, A.A., Levin, B.A., Nepomnyashchikh, V.A., 2018. Organization of Three-Spined Stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. (Gasterosteidae: Pisces) Exploratory Behavior in a Plus Maze. *Inland Water Biology*, 11, 4, 485–491. <https://doi.org/10.1134/S1995082918030136>
- Pedrazzani, A.S., Fernandes-de-Castilho, M., Carneiro, P.C.F., Molento, C.F.M., 2007. Bem-estar de peixes e a questão da senciência. *Arch. Vet. Sci.*, 11, 60-70. <http://doi.org/10.5380/avs.v12i3.10929>
- Peitsaro, N., Kaslin, J., Anichtchik, O.V., Panula, P., 2003. Modulation of the histaminergic system and behavior by α -fluoromethylhistidine in zebrafish. *J. Neurochem.* 86, 432-441. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01850.x>
- Poulsen, A.F., Hortle, K.G., Valbo-Jorgensen, J., Chan, S., Chhuon, C.K., Viravong, S., Bouakhamvongsa, K., Suntornratana, U., Yoorong, N., Nguyen, T.T., Tran, B.Q. Distribution and Ecology of Some Important Riverine Fish Species of the Mekong River Basin. Sikhottabong District: Mekong River Commission, 2004.
- Prescott, N.B., Mottram, T.T., Webster, A.J.F., 1998. Relative motivations of dairy cows to be milked or fed in a Y-maze and an automatic milking system. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 57, 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00112-3)
- Rainboth, W.J. Fishes of the Cambodian Mekong. Rome: FAO, 1996.
- Regolin, L., Rugani, R., Pagni, P., Vallortigara, G., 2005. Delayed search for social and nonsocial goals by young domestic chicks, *Gallus gallus domesticus*. *Anim. Behav.*, 50, 850-864. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.01.014>
- Rioja-Lang, F.C., Roberts, D.J., Healy, S.D., Lawrence, A.B., Haskell, M.J., 2012. Dairy cow feeding space requirements assessed in a Y-maze choice test. *J. Dairy Sci.*, 95, 3954–3960. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4962>

- Rodríguez, F., Quintero, B., Amores, L., Madrid, D., Salas-Peña, C., Salas, C., 2021. Spatial Cognition in Teleost Fish: Strategies and Mechanisms. *Animals*, 11, 2271. <https://doi.org/10.3390/ani11082271>
- Saili, K.S., Corvi, M.M., Weber, D.N., Patel, A.U., Das, S.R., Przbyla, J., Anderson, K.A., Tanguay, R. L., 2012. Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicol.* 291, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.11.001>
- Salvanes, A.G.V., Moberg, O., Ebbesson, L.O.E., Nilsen, T.O., Jensen, K.H., Braithwaite, V.A., 2013. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proc R. Soc. B.*, 280, 20131331. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1331>
- Schwalbe, M.A.B., Bassett, D.K., Webb, J.F., 2015. Feeding in the dark: lateral-line-mediated prey detection in the peacock cichlid *Aulonocara stuartgranti*. *The Journal of J. Exp. Biol.* 215, 2060-2071.
- Shah, S.A., Malik, A., Kalhor, H., Kalhor, I.B., Wadhar, G.M., Maher, G.M., 2014. Growth performance of exotic catfish Pangas, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) at Fish Hatchery ChilyaThatta, Sindh, Pakistan. *Sindh Univ. Res. Jour. (Sci. Ser.)*, 46, 2, 205-208.
- Sison, M., Gerlai, R., 2010. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav. Brain Res.*, 207, 1, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.043>
- Singh, A.K., Lakra, W.S., 2012. Culture of *Pangasianodon hypophthalmus* into India: Impacts and present scenario. *Pak J Biol Sci.* <https://doi.org/10.3923/pjbs.2012>
- Stauffer Jr., J.R., Black, K.E., Geerts, M., Konings, A.F., McKaye, K.R. Cichlid Fish Diversity and Speciation. In: Hodkinson, T.R., Parnell, J.A.N. (Ed.). *Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and systematics of species rich taxa*. Boca Raton: Taylor & Francis group, 2006. p. 213-225.
- Strand, D.A., Utne-Palm, A.C., Jakobsen, P.J., Braithwaite, V.A., Jensen, K.H., Salvanes, A.G.V., 2010. Enrichment promotes learning in fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 412, 273–282. <https://doi.org/10.3354/meps08682>

- Takahashi, R.N., Pamplona, F.A., Fernandes, M.S., 2005. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated t-maze. *Neurosci. Lett.* 380, 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.049>
- Torres, I.F.A., Ferreira, A.S., Souza-e-Silva, W., Mesquita, F.O., Luz, R.K., 2018. Effect of environmental color on learning of Nile tilapia. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 209, 104–108. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.08.021>
- Vallortigara, G., Regolin, L., Rigoni, M., Zanforlin, M., 1998. Delayed search for a concealed imprinted object in the domestic chick. *Anim. Cogn.*, 1, 17–24. <https://doi.org/10.1007/s100710050003>
- Volpato, G.L., Gonçalves-de-Freitas, E., Fernandes-de-Castilho, M., 2007. Insights into the concept of fish welfare. *Dis. Aquat. Org.* 75, 165–171. <http://dx.doi.org/10.3354/dao075165>
- Wallace, K.J., Hofmann, H.A., 2021. Equal performance but distinct behaviors: sex differences in a novel object recognition task and spatial maze in a highly social cichlid fish. *Anim. Cogn.* <https://doi.org/10.1007/s10071-021-01498-0>
- Weber, D.N., Hesselbach, R.A., Petering, D.H., Berg, C.A., 2019. My fish is smarter than your fish: inquiry-approach methods to examine learning in zebrafish exposed to environmental chemicals. *Am. Biol. Teach.* 81, 352–359. <https://doi.org/10.1525/abt.2019.81.5.352>
- Webster, J. Health and welfare of animals in modern husbandry systems-Dairy cattle. In *practice* 8, 85-89, 1986. <https://doi.org/10.1136/inpract.8.3.85>
- Wenk, G.L., 2004. Assessment of spatial memory using the radial arm and Morris water maze. *Curr. Protoc. Neurosci.* 26, 8.5A.1–8.5A.12. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0805as26>
- Windarti, U., Riauwaty, M., Putra, R.M., Simarmata, A.H., 2019. Biological aspects of *Pangasius hypophthalmus* reared under controlled photoperiod. *IOP Conf. Ser. Earth and Environ. Sci.*, 348, 012050. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/348/1/012050>
- Woodworth, R.S., 1938. *Experimental Psychology*. New York: Henry Holt and Company.
- Wright, A.A., 2018. Testing complex animal cognition: concept learning, proactive interference, and list memory. *J. Exp. Anal. Behav.* <https://doi.org/10.1002/jeab.299>

Yang, S., Kim, W., Choi, B., Koh, Y., Lee, C., 2003. Alcohol impairs learning of T-maze task but not active avoidance task in zebrafish. *Korean J. Biol. Sci.* 7, 303-307.
<https://doi.org/10.1080/12265071.2003.9647720>

5. ARTIGO 1

Association learning and preference of females and males of the blue orchid, *Aulonocara nyassae* Regan, 1922 in a T-maze

Abstract

Males and females of various species spend energy on different activities throughout the day in their natural environment. Thus, the present study aimed to assess whether males and females of *A. nyassae* differ in learning and preferences through two experiments. Experiment 1 subjected animals to learning by association in a T-maze test. Experiment 2 subjected males and females to a preference test in a T-maze, with each tank arm receiving one of the two following positive stimuli: shelter or food. Experiment 1 found that both sexes were able to learn the association between neutral and positive stimuli. Experiment 2 found that, regardless of sex, the animals frequented more the arm with the presence of shelter. This study demonstrates that males and females of *A. nyassae* were able to learn the task of object and food association and also preferred to take shelter over eating, even after exposure to stress.

Keywords: Cichlidae; African cichlid; latency; freezing; ornamental; fish behavior

5.1 Introduction

In the group of fishes, as in other classes of vertebrates, females and males spend time performing different tasks with a wide repertoire of behaviors and variation depending on the species and place of occurrence (Cummings 2018). Likewise, within the same social context, males and females are prone to make different choices that may have a direct impact in their cognition (Wallace and Hofmann 2021). For example, some male behaviors, such as the formation and protection of harems, make them territorial and aggressive with individuals of the same species (Stiassny and Meyer 1999).

Aulonocara nyassae blue orchid, is a member of the family Cichlidae, the species of which are predominant in the ornamental fish trade in Brazil and throughout the world (Assis et al. 2014). Endemic to several regions of Lake Malawi, fish of the genus *Aulonocara* are commonly found in shallow environments and feed on benthic organisms (Malinsky et al. 2018). Lake Malawi, home to hundreds of species of cichlids that have undergone an adaptive radiation and have high genomic diversity with different ecological adaptations (Joyce et al. 2011). This great morphological variability, including in coloration, has given these species commercial value for aquarism and made them subjects for the study of speciation (Genner et al. 2004). Species of *Aulonocara* can be divided into groups according to their habitat, but all species of the genus have a common foraging behavior called ‘sonar-feeding’, which consist in the animal standing still above the substrate and occasionally dipping the snout into the sand (Konings 1995). *Aulonocara nyassae* possess clear sexual dimorphism, with males having an intense blue color interspersed with brown, whereas females are only brown (Quinn 2018). Females form shoals and feed on substrates around rocks and sand, while males can be found close to holes, crevices and caves in rocks, forming and defending a small territory (Grant et al. 1987). The sexes also differ in behavior during reproductive investment, with females spawning with immediate fertilization by the male, after which the female collects the eggs and performs oral incubation (Konings 1995). This different behavioral repertoire may lead to different cognitive profiles between the sexes, and some studies show a male superiority in spatial learning (Lucon-Xiccato and Bisazza 2017b).

In the present study, we evaluated the cognitive differences between male and female *A. nyassae* blue orchid through tests of learning and preferences in a T-maze. The T-maze is an apparatus that allows the study of spontaneous alternation, spatial behavior and learning (Wenk 1998). The geometric element of the T-maze requires a binary choice to be made by organisms individually, and the proportion of choices within a population can be assessed by counting the

preferences of organisms (Salek et al. 2019). There are various sorts of motivators that can be used in memory and learning assessments in a maze; however, in order to assess what animals were able to learn and memorize, they must be motivated to perform the imposed task (Bimonte-Nelson 2015). The stimulus response chain initiated in the process of spatial learning in the T-maze test falls within a classic Pavlovian conditioning called associative learning, in which there is the association of both neutral and a significative stimuli for the animal, either positive or negative (Gould 2010). Placing a positive reward within a T-maze in association with a new object is a widely-used method for the study of learning by association (Bilotta et al. 2005; Colwill et al. 2005; Salas et al. 2006; Sison and Gerlai 2010) and has demonstrated that, with repeated tests, fish can acquire and retain associations, such as with colors, light and food, by spatial suggestion (Gould 2010). The apparatus allows for direct observations of cognition using inquiry-approach methods, based on the hypothesis of the influence of multiple factors in decision making, assessing the cognitive flexibility of the animals (Sison and Gerlai 2010; Weber et al. 2019). Some challenges may interfere in the learning of the animals in the apparatus. Previous research demonstrated that a recent experience, when in the context of competition, affects the learning of fish in a T-maze (Chang et al. 2012). Another example is the effect of hypoxia in the learning process in a T-maze, which can be assessed through the observation of animal behavior (Kim et al. 2019).

Thus, the present study aimed to determine whether abilities to learn an association between a marker and food (experiment 1) and preference for shelter or food before and after either stress and a break from the challenge (experiment 2) differ between males and females of the African cichlid *A. nyassae* using a T-maze. Our hypothesis is that males and females of this species have different behaviors in learning tasks in a T-maze.

5.2 Material and methods

The experiments were conducted at Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária of Universidade Federal de Minas Gerais. We used 48 sexually mature specimens of *Aulonocara nyassae* blue orchid from a descended lab population. The matrices arrived at the laboratory one year before the beginning of the experimentation, coming from donations from commercial producers in the region.

5.2.1 T-maze reconnaissance session

Two experiments were performed using a T-maze aquarium with the walls lined with opaque white plastic paper with a 49-cm long main channel and two 29-cm long, 20-cm high and 14-cm wide side arms (Figure 1).

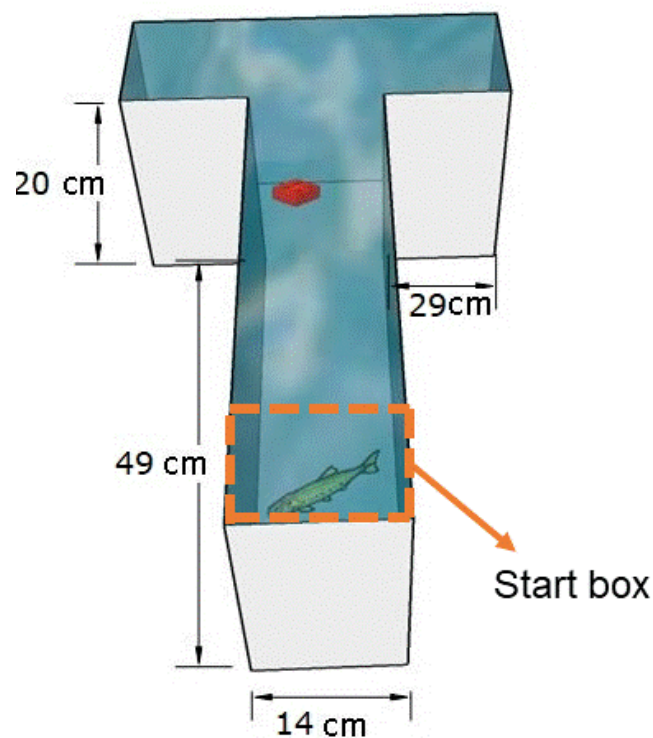


Figure 1. T-maze for the learning and preference tests of the blue orchid, *A. nyassae*.

For two days prior to the learning and preference tests, the animals were individually directed to the maze for a reconnaissance session. The reconnaissance session was held to habituate the fishes to the T-maze and reducing any neophobia produced by exposure to the new environment (Luchiari 2016). For this, the animals were fasted for 24 hours, and the tanks drawn so that the animals could be captured individually and placed in the acclimatization area (start box) of the T-maze, where they were kept for five minutes. During the acclimatization period, the animals were kept in the start box with a removable opaque wall such that they were without external visual contact with the rest of the maze. After the five minutes, the opaque

wall was removed to provide access to the remainder (arms) of the maze without the presence of food or objects for a period of 15 minutes. The fish were fed at the end of the day, after finishing the reconnaissance session with all animals.

5.2.2. Experiment 1. Associative learning

Experiment 1 used 24 sexually mature specimens of *A. nyassae* with 12 were females (7.88 ± 0.45 cm; 6.16 ± 1.27 g) and 12 males (8.42 ± 0.56 cm; 7.78 ± 1.61 g). The fish were stocked in four 30-L tanks of a recirculation aquaculture system (RAS) with six fish per tank and two tanks of females and two tanks of males. The animals were fed once a day with a commercial extruded diet (Acqualine Supra®, Anápolis, Goiás, Brazil) measuring 1.2–1.8 mm in diameter and containing 46% crude protein (CP), 8% ether extract (EE) and 3600 kcal kg⁻¹ digestible energy (DE). The temperature, salinity, pH and conductivity of the water of the RAS were maintained at $27.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 0.84 ± 0.38 ppt, 6.27 ± 0.22 and 0.42 ± 0.19 mS/cm, and the T-maze maintained at $26.6 \pm 0.6^\circ\text{C}$, 1.09 ± 0.54 ppt, 6.19 ± 0.35 and 0.52 ± 0.30 mS/cm, respectively, measured with a multiparameter probe (Hanna HI98130). The photoperiod was kept at 12 L:12D using an automatic timer. The fish were kept in these conditions for 15 days prior to testing. The learning test was divided into two phases. Phase training lasted 10 days and involved allocating each animal individually to the T-maze once a day, as described in the reconnaissance session. A piece of Lego® representing a visual marker was placed next to feed pellets in one of the arms of the T-maze. The arm of the T-maze being chosen by lot before the beginning of each day of the study. After five minutes, the fish was released to explore the maze, when time measurements and behavioral observations began. The following were recorded during the 15 minutes of observation of each fish: latency time; time taken to make the first choice; time spent remaining in the first choice; time spent idle; time spent feeding and number of associations (Table 1).

Table 1. Ethogram for observation of *A. nyassae* females and males (n= 12 per sex) in experiment 1.

Behavior	Description
Latency time	Time taken to leave the acclimatization zone.
Time taken to make the first choice	Time elapsed between leaving the acclimatation zone and choosing one of the T-maze arms (left of right).
Time spent remaining in the first choice	Amount of time in which fish stayed in the first chosen T-maze arm.
Time spent feeding	Amount of time between leaving the acclimatation zone and capturing a food pellet.
Time spent idle	Amount of time in which fish were idle in the T-maze, without any apparent function.
Number of associations	How many times fish first chose the arm with Lego® and food.

After the 10 days of training, it was observed that fish learned the task, choosing the arm containing the Lego® as the first option. Then, fish were subjected to a test of associative learning using a polystyrene barrier in the tank, so that the fish did not see the food before swimming past the barrier (Figure 2). Thus, a polystyrene plate (1.7 cm thick; 20 cm high) was added between the Lego® piece and the food with a central circular hole of 7.5 cm in diameter that allowed the fish to pass through once a day during the period of four consecutive days. The barrier was added aiming at creating a challenge to the fish and evaluating if this challenge would affect their learning. The observations recorded were the same as those adopted in Phase 1.



Figure 2. Polystyrene barrier in T-maze for the learning tests of the blue orchid, *A. nyassae* females and males.

5.2.3. Experiment 2. Preference for shelter or food

Another 24 specimens of *A. nyassae* were used in Experiment 2 with 12 females (8.12 ± 0.85 cm; 7.95 ± 1.61 g) and 12 males (9.34 ± 0.58 cm; 12.11 ± 2.33 g). The fish were stocked in four 28-L tanks of a RAS with six fish per tank and two tanks of females and two tanks of males. The animals were fed the same diet as in Experiment 1. The temperature, salinity, pH and conductivity of the water in the RAS were maintained at $27.9 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 0.32 ± 0.03 ppt, 7.21 ± 0.25 and 0.63 ± 0.06 mS/cm, and the T-maze maintained at $26.4 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 0.32 ± 0.1 ppt, 7.11 ± 0.19 and 0.64 ± 0.06 mS/cm, respectively. The photoperiod was kept at 12 L:12D using an automatic timer. The fish were kept in these conditions for 15 days prior to testing. HT The preference test was divided into two phases. Phase 1 lasted 10 days and involved allocating each animal individually to the T-maze once a day, as described in the reconnaissance session. A piece of PVC pipe (9.5 cm long, 5 cm diameter) was placed inside one of the arms of the

maze to provide shelter for the fish. Pieces of a PVC pipe were added to the environment where the fish had been kept before the trial so that they could get accustomed to using this material as a shelter. A Lego® piece was placed in the other arm along with feed pellets at the end of the arm. The arm intended for food was chosen by lot before the beginning of each day of the study. Each animal was carefully captured individually and placed in the start box. After five minutes, the fish was released to explore the maze, when time measurements and behavioral observations began. Following were recorded during the 15 minutes of observation of each fish: latency time; time taken to make the first choice; time spent remaining in the first choice; time spent idle and the first choice made by the animal (Table 2).

Table 2. Ethogram for observation of *A. nyassae* females and males (n= 12 per sex) in experiment 2.

Behavior	Description
Latency time	Time taken to leave the acclimatization zone.
Time taken to make the first choice	Time elapsed between leaving the acclimatation zone and choosing one of the T-maze arms (left of right).
Time spent remaining in the first choice	Amount of time in which fish stayed in the first chosen arm.
Time spent idle	Amount of time in which fish were idle in the T-maze, without any apparent function.
First choice	First T-maze arm visited by the fish, the arm containing Lego® and food or the arm with a shelter.

Phase 1 lasted for 10 days – time required for fish to show preference for one of the two tank arms. So, after the 10 days, the animals were kept for 20 days without being submitted to the T-maze. After this period, the Phase 2 of the test began. To assess the ability of the fish to learn and choose, before being submitted to the T-maze for testing, in addition to the time without contact with the maze, the animals were subjected to stress. Each fish was exposed to the air for five minutes and, subsequently, placed in the maze without acclimatization time, with direct access to the entire maze to make a choice. This process was carried out for five consecutive days in order to confirm the choice does not change when either the fish are in stress and after a break from the trial. The observations were the same as those adopted in Phase

1, without considering latency time. For better understanding the timeline of the two experiments, an infographic has been designed (Figure 3).

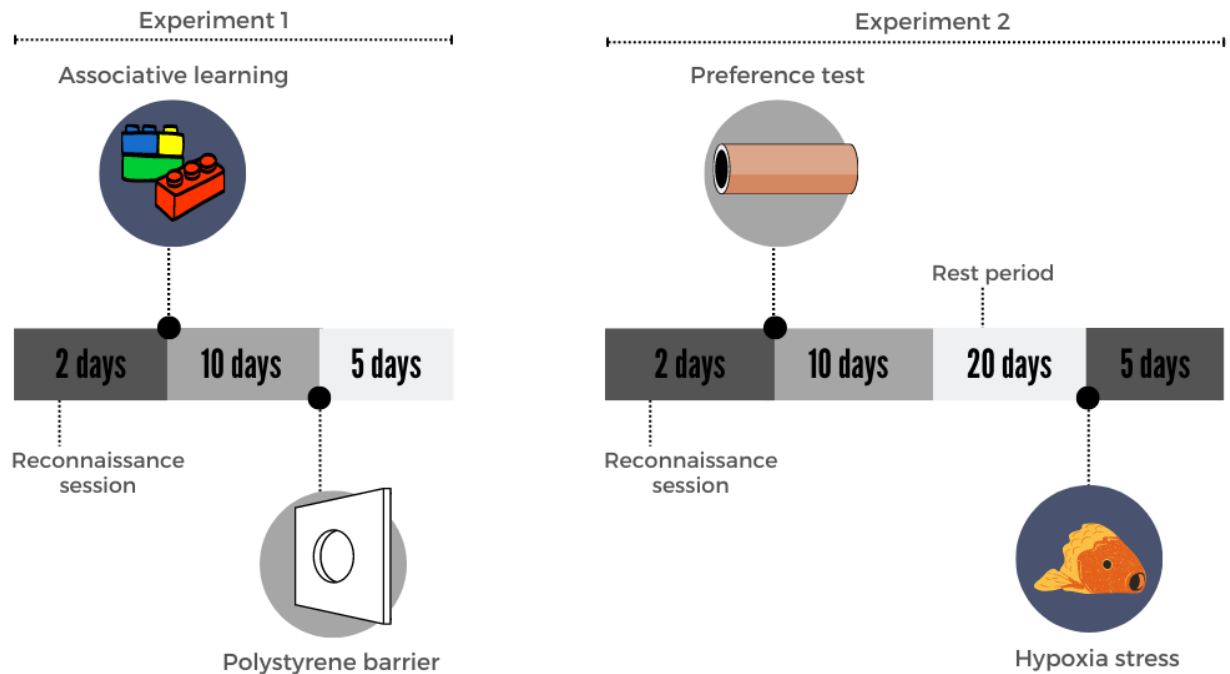


Figure 3. Experiment 1 and 2 timelines.

5.2.4. Statistical analysis

The experiments were conducted in a completely randomized design with two treatments and 12 replicates, with each animal being an experimental unit. The data obtained from the behavioral observations were first submitted to the Shapiro-Wilk normality test, followed by the non-parametric Mann-Whitney test at the level of 5% probability, for the comparison between males and females. For the analysis of the results of each day of the study, data were subjected to the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by the Student-Newman-Keuls comparison test at the level of 5% probability. The number of associations between the Lego® piece and food (Experiment 1) and the number of choices of the arm with shelter or the arm with food (Experiment 2) were analyzed using the Chisquare test. All tests were performed using the Bioestat statistical program (vers. 5.3, Ayres et al. 2007).

5.3. Results

5.3.1. Experiment 1. Associative learning

Both males and females ($P = 0.9267$) were able to associate the visual marker with the food provided during the tests (Figure 4), in other words, they preferred the arm with the visual marker associated with the food as their first choice over the empty arm.

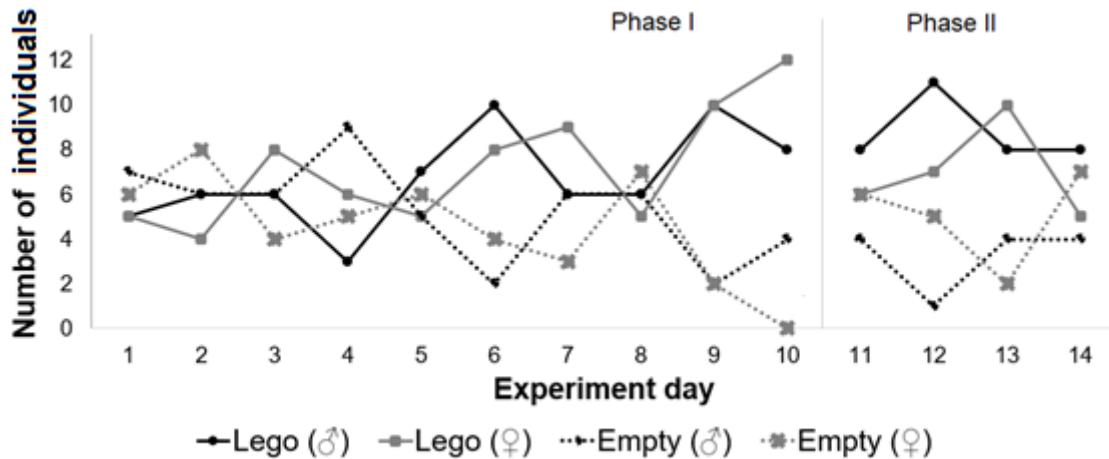


Figure 4. Number of individual choice between the Lego® piece and food by males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, over the days during Phase 1 and Phase 2 (addition of the polystyrene plate) in the T-maze learning test.

In Phase 1, females and males did not differ significantly in the time spent feeding inside the T-maze (53 seconds; $P = 0.6071$), but after the challenge, males spent less time (14.5 seconds; $P < 0.05$) feeding than females (20 seconds). The fish that chose the arm with food indicated by the Lego® piece as their first choice spent less time for to feed (21 seconds) than did the fish that chose the empty arm first (64 seconds).

Latency time did not differ significantly between males and females for any of the learning days, both in Phase 1 (3 seconds; $P = 0.3736$) and in Phase 2 (1 second; $P = 0.9125$). However, there was a decrease in median latency time beginning on the third day of the test, with an increase on the fifth and sixth days, followed by a further reduction in time until the tenth day. Latency time in Phase 2 remained low after the challenge.

Males and females did not differ significantly in the time taken to make the first choice throughout the test in Phase 1 (7 seconds; $P = 0.2425$) and Phase 2 (5 seconds; $P = 0.0977$). On the third day of Phase 1, there was a decrease in the time taken to make the first choice. In Phase 2, there was a decrease in time taken to make the first choice beginning on the second day.

The amount of time males and females remained in the chosen arm, once they made their first choice, did not differ significantly (8 seconds; $P = 0.5706$), regardless of the first

choice ($P = 0.5721$) (Figure 5). There was also no significant difference when compared over the training days (8.5 seconds; $P = 0.9151$), and a similar time was even maintained after the challenge (8 seconds; $P = 0.3695$), that is, the fish remained in the chosen arm for a statistically similar time over the 14 days.

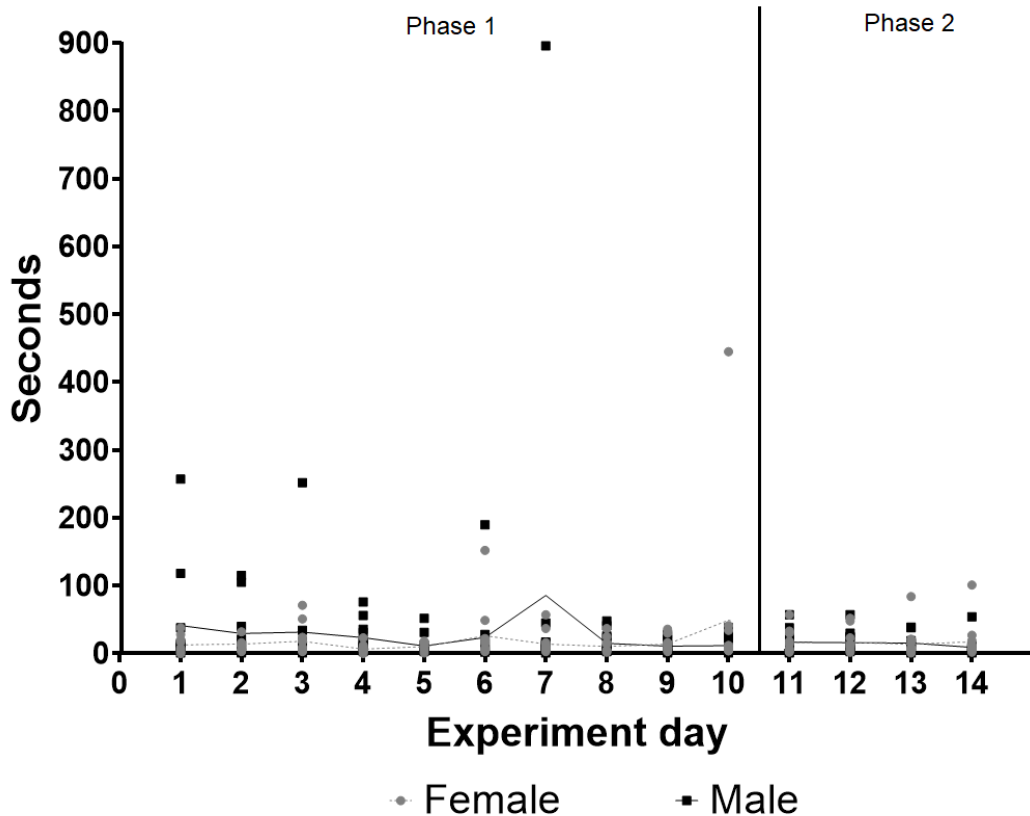


Figure 5. Time (seconds) for males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, spent in the first choice in Phase 1 and Phase 2 (addition of polystyrene plate) in the T-maze learning test.

There was no significant difference between females and males in the median time spent in idleness inside the T-maze, both in Phase 1 (0 seconds; $P = 0.1077$) and in Phase 2 (0 seconds; $P = 0.0786$).

5.3.2. Experiment 2. Preference for shelter or food

The choice between shelter or food did not differ significantly between females and males ($P = 0.5323$). Animals of both sexes preferred to take shelter as the first option, over food (Figure 6).

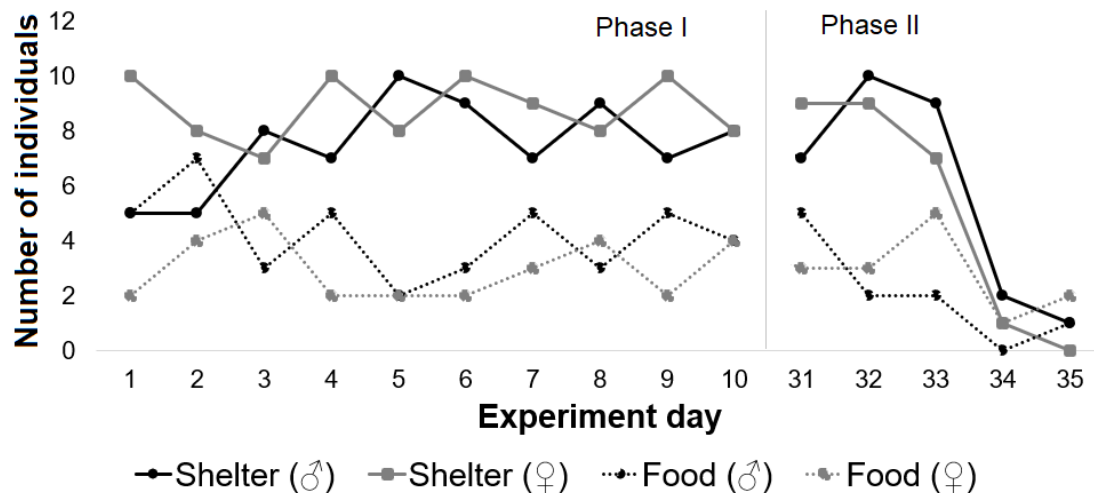


Figure 6. Number of individuals choice between shelter and food that males and females of the blue orchid, *A. nyassae* over the days during Phase 1 and Phase 2 (addition of exposure to stress) in the T-maze preference test.

In Phase 1, males spent less time in latency (1.5 seconds; $P < 0.05$) than did females (3.5 seconds), a difference that remained in the Phase 2 ($P < 0.05$) when males spent 3 seconds while females spent 8.5 seconds.

However, males and females took similar amounts of time to make their first choice during training (6 seconds; $P = 0.0614$) and after the challenge (13.5 seconds; $P = 0.0900$). There was a reduction in the time taken to make the first choice during the last days of Phase 1. The time taken to make the first choice was maintained during the days of going to the maze after the challenge ($P = 0.4280$).

Males and females remained for a similar amount of time in the first chosen arm both on training days (24.5 seconds; $P = 0.7259$) and after the challenge (18 seconds; $P = 0.6383$), with no significant differences during training days ($P = 0.5753$) or during the days of the Phase 2 ($P = 0.1759$) (Figure 7).

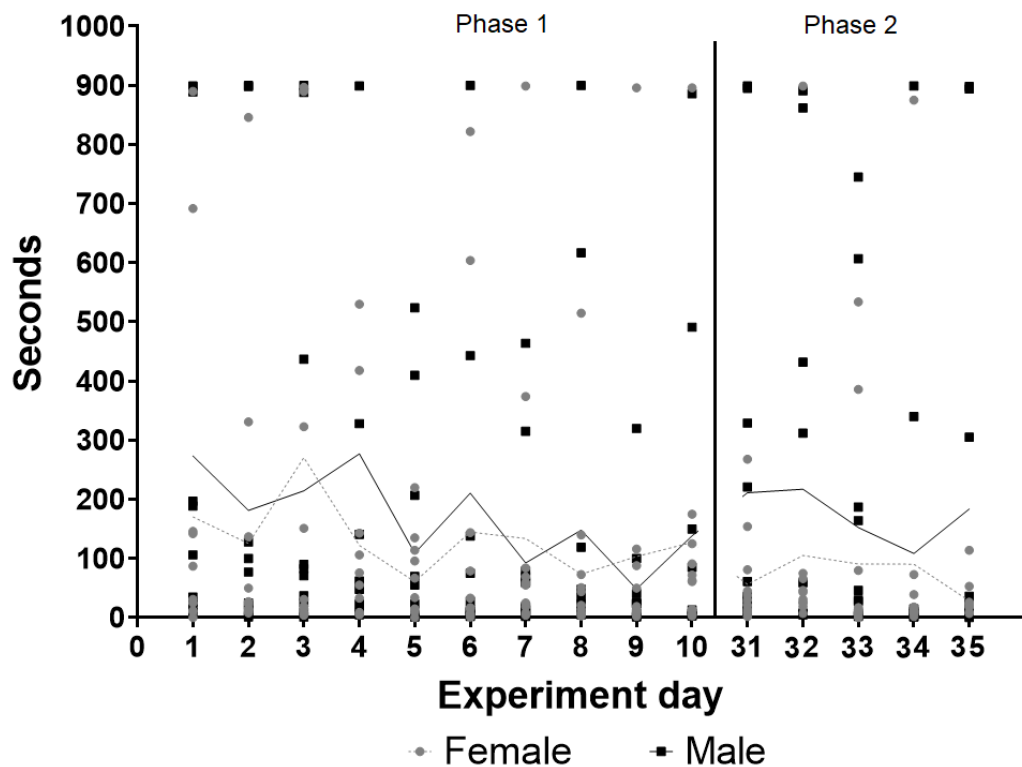


Figure 7. Time (seconds) that males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, spent in their first choice during Phase 1 and Phase 2 (addition of exposure to stress) in the T-maze preference test.

The same occurred with the time spent in idleness, which did not differ significantly between males and females during the training phase (0 seconds; $P = 0.5878$), after the challenge (0 seconds; $P = 0.9916$), or during test days in Phase 1 ($P = 0.0850$) and in Phase 2 ($P = 0.5742$).

5.4. Discussion

Males and females did not differ in their learning and were able to perform the association for food (experiment 1) positive stimuli, and the Lego® piece, a neutral stimulus. Lucon-Xiccato and Bisazza (2017a) found similar results in a study comparing male and female guppies (*Poecilia reticulata*), with no distinction in learning between the sexes, despite females making numerically fewer mistakes with maze choices. Likewise, guppies did not show any significant sex-linked differences in reversal learning in a T-maze (Petrazzini et al. 2017). For *Kryptolebias marmoratus*, no relationship was found between testosterone levels and learning (Chang et al. 2012). There was also no difference in learning when comparing T-maze

performance of male and female zebrafish, and there was no difference in latency, time taken to make first choice and time in freezing (Hieu et al. 2020). However, male *Salaria fluviatilis* fish showed a bigger capacity of learning using visual markers when compared to females (Fabre et al. 2014), which highlights the importance of studying sex-linked cognitive differences in fish regarding learning tasks.

In experiment 2, as in experiment 1, males and females showed similarities in their first choice. However, unlike experiment 1, when they learned the association between a visual marker and food, animals of both sexes preferred to take shelter over food in experiment 2. This preference may be related to the fact that in nature, fish of the genus *Aulonocara* are commonly found in rocky environments, where perforations serve as shelters that are important when fighting for territory, demarcating territory, escaping fights and persecuting predators (Millidine et al. 2006).

In addition, regardless of sex, there was a reduction of the time taken to choosing the tank arm with shelter as a first option throughout the trial. Since our choice for placing either a shelter or food in each arm was randomly made before the trial, the location of the shelter varied in the environment. This evidences that fish were able to learn the association between the Lego® piece and the presence of food, as well as the presence of shelter in the other T-maze arm.

In nature, males are responsible for defending their territory and forming harems, while females are dedicated to caring for their offspring (Grant et al. 1987). Thus, males and females develop different behavioral repertoires to carry out their different tasks. Despite these differences, animals of both sexes are known to be active most of the day, spending time in their different activities (Konings 1995), which may explain their similarities in latency time, time spent in idleness, time to make first choice and time to feed in the T-maze, in both experiments.

The decrease in latency time observed in Experiment 1 over the experimental days, for both sexes, may be related to the fish having learned the task. Such a result due to learning was observed in a study with *Danio rerio*, where control animals, which were not influenced by the effect of alcohol on the body, learned a task in a T-maze with a consequent decrease in latency time over the days of training (Yang et al. 2003). Accordingly, a similar result was obtained in a visual discrimination test with *D. rerio*, with decreased latency time when the animal presented satisfactory learning performance and memory acquisition (Colwill et al. 2005). Nile tilapia (*O. niloticus*) also showed a decrease in latency time throughout the experimental period using a T-maze (Torres et al. 2018).

As with latency, decreases in the time taken for the fish to find and apprehend food (experiment 1), or for the fish to find and use shelter (experiment 2), can be directly correlated with learning. As the fish learned the task of associating the Lego® piece with food, the time required to perform the activity decreased. A study with Nile Tilapia (*O. niloticus*), also observed a decrease in time searching for food in line with a decrease in latency time (Mesquita et al. 2016).

The fish in both experiments maintained similar behaviors, even after a challenge. Adding a physical barrier between the Lego® piece and the food did not result in a loss of associative learning by the animals. This finding may be related to fish facing constant challenges in nature during the process of foraging, which requires decision making involving different learning and memory systems, plus motivation during foraging increases the attention to clues (Warburton 2003). Thus, the present study demonstrated that the African cichlid *A. nyassae* performs well in learning tasks using food as a positive stimulus, and that cognitive performance does not change when an individual is challenged.

The preference that the fish exhibited for taking shelter over food persisted even after the challenge of acute stress and time spent away from the maze employed in Experiment 2. Considering that fish, like all animals, experience a series of dangers arising from factors in the environment, and are constantly threatened by conspecifics and individuals of other species, they need to develop protection through behavior or physiological mechanisms and escape strategies involving shelters (Bruslé and Quignard, 2020). Shelter, then, has a fundamental role in fish survival, particularly for species that occupy rocky habitats, such as *A. nyassae* (Konings, 1995). Species that occupy rocky habitats have good abilities to memorize the location of shelters by acquiring more spatial information in a complex environment (Foam et al. 2005).

The present study demonstrated that testing associative learning and preference in a T-maze can be used with males and females of *A. nyassae* to study behavior and learning in relation to the association between an object and reward and preference between two options, respectively. The T-maze has been used previously to study memory, learning and preference (Colwill et al., 2005; Hieu et al., 2020). The study of spatial memory is based on the fact that animals develop strategies to explore the environment to obtain food with minimal effort (Wenk, 2004). The association of a neutral stimulus with an expressive stimulus to the animal within a T-maze has been used for the study of learning (Gould, 2010). Food can be used as a positive stimulus so that fish can learn the desired association (Colwill et al. 2005).

The ability to learn by association has been demonstrated in studies with fish of different families and habitats. The present study found that individuals of the blue orchid, *A. nyassae*,

were able to perform the association with performance comparable to that of other cichlids, such as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), which were able to perform associations at the end of training trials (Mesquita et al. 2016).

5.5. Conclusions

In nature, male and female fish of various species show differences in their behavioral repertoire, even within the same social context. This raises the question of whether there should be any cognitive differences between sexes. The T-maze facility allows for the assessment of animal performance in learning tasks. This present study showed that males and females of the blue orchid, *A. nyassae*, possess the same capacity for learning in a T-maze and the learning persists even if they are subjected to a challenge. Both males and females were able to learn the required association between the Lego® piece and the food. This demonstrates that, although male and female *A. nyassae* fish perform different roles in their social context, they have a comparable cognitive development.

The differences in the behavioral repertoire did not influence the choice the animals made for shelter over food in a T-maze. Even though some challenges may influence the performance of cognitive tasks, in this study we observed that the preference persisted even after they were subjected to a stress challenge.

5.6. Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPESBrasil). R. K. Luz received a research grant and a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq n°.308547/2018-7).

5.7. References

- Assis D, Cavalcante SS, Brito MFG. 2014. Avaliação do comércio de peixes ornamentais de água doce em Aracaju, Sergipe. *Magistra*. 26:213–220.
- Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Dos Santos AS, Ayres LL. 2007. *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. Belém; p. 380.
- Bilotta J, Risner ML, Davis EC, Haggbloom SJ. 2005. Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. *Zebrafish*. 2(4):259–268. doi:10.1089/zeb.2005.2.259.
- Bimonte-Nelson HA. 2015. Rodent mazes and memory: continuing the search for the engram. In: Bimonte-Nelson HA, editor. *The maze book: theories, practice, and protocols for testing rodent cognition*. Canada: Humana Press; p. 3–37.
- Bruslé J, Quignard JP. 2020. *Fish behavior 1*. London: British Library.
- Chang C, Li C, Earley RL, Hsu Y. 2012. Aggression and related behavioral traits: the impact of winning and losing and the role of hormones. *Integr Comp Biol*. 52(6):801–813. doi:10.1093/icb/ics057.
- Colwill RM, Raymond MP, Ferreira L, Escudero H. 2005. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Processes*. 70(1):19–31. doi:10.1016/j.beproc.2005.03.001.
- Cummings ME. 2018. Sexual conflict and sexually dimorphic cognition—reviewing their relationship in poeciliid fishes. *Behav Ecol Sociobiol*. 72(4):73. doi:10.1007/s00265-018-2483-9.
- Fabre N, García-Galea E, Vinyoles D. 2014. Spatial learning based on visual landmarks in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis* (Asso, 1801). *Learn Motiv*. 48:47–54. doi:10.1016/j.lmot. 2014.10.002
- Foam PE, Harvey MC, Mirza RS, Brown GE. 2005. Heads up: juvenile convict cichlids switch to threat-sensitive foraging tactics based on chemosensory information. *Anim Behav*. 70 (3):601–607. doi:10.1016/j.anbehav.2004.12.011.

- Genner MJ, Seehausen O, Cleary DFR, Knight ME, Michel E, Turner GF. 2004. How does the taxonomic status of allopatric populations influence species richness within African cichlid fish assemblages? *J Biogeogr.* 31(1):93–102. doi:10.1046/j.0305-0270.2003.00986.x.
- Gould GG. 2010. Modified associative learning T-maze test for zebrafish (*Danio rerio*) and other small teleost fish. In: Kalueff AV, Cachat JM, editors. *Zebrafish neurobehav protocols neuromethods*, 51. Totowa: Humana Press; p. 61–73. doi:10.1007/978-1-60761-953-6_5.
- Grant SM, Dieckhoff HW, Mayland HJ, Meyer MK. 1987. Ecology of *Aulonocara* REGAN, 1922 in Lake Malawi. *Cour Forsch Lnst Senckenberg.* 94:131–139.
- Hieu BTN, Anh NTN, Audira G, Juniardi S, Liman RAD, Villaflores OB, Lai Y, Chen J, Liang S, Huang J, et al. 2020. Development of a modified three-day T-maze protocol for evaluating learning and memory capacity of adult zebrafish. *Int J Mol Ciênci.* 21(4):1464. doi:10.3390/ijms21041464.
- Joyce DA, Lunt DH, Genner MJ, Turner GF, Bills R, Seehausen O. 2011. Repeated colonization and hybridization in Lake Malawi cichlids. *Curr Biol.* 21(6):526. doi:10.1016/j.cub.2011.02.044.
- Kim Y, Lee K, Kim Y, Kim Y, Kim J. 2019. Effects of hypoxic preconditioning on memory evaluated using the T-maze behavior test. *Anim Cells Syst.* 23(1):10–17. doi:10.1080/19768354.2018.1557743.
- Konings A. 1995. A review of the sand-dwelling species of the genus *Aulonocara*, with the description of three new species. *The Cichlids Yearbook.* 5:26–36.
- Luchiari AC. 2016. How *Betta splendens* finds its way. *Behav Processes.* 124:47–51. doi:10.1016/j.beproc.2015.11.021
- Lucon-Xiccato T, Bisazza A. 2017a. Complex maze learning by fish. *Anim Behav.* 125:69–75. doi:10.1016/j.anbehav.2016.12.022
- Lucon-Xiccato T, Bisazza A. 2017b. Individual differences in cognition among teleost fishes. *Behav Processes.* 141:184–195. doi:10.1016/j.beproc.2017.01.015

- Malinsky M, Svardal H, Tyers A, Miska EA, Genner MJ, Turner G, Durbin R. 2018. Whole-genome sequences of Malawi cichlids reveal multiple radiations interconnected by gene flow. *Nat Ecol Evol.* 2(12):1940–1955. doi:10.1038/s41559-018-0717-x.
- Mesquita FO, Torres IFA, Luz RK. 2016. Behaviour of proactive and reactive tilapia *Oreochromis niloticus* in a T-maze. *Appl Anim Behav Sci.* 181:200–204. doi:10.1016/j.applanim.2016.05.022
- Millidine KJ, Armstrong JD, Metcalfe NB. 2006. Presence of shelter reduces maintenance metabolism of juvenile salmon. *Funct Ecol.* 20(5):839–845. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01166.x.
- Petrazzini MEM, Bisazza A, Agrillo C, Lucon-Xiccato T. 2017. Sex differences in discrimination reversal learning in the guppy. *Anim Cogn.* 20(6):1081–1091. doi:10.1007/s10071-017-1124-4.
- Quinn D. 2018. The family Cichlidae the genus *Aulonocara* a brief history, maintaining and breeding, species description and judging. *Tropical Fish Club of Burlingt.* 13–17.
- Salas C, Broglio C, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Jiménez-Moya F, Rodríguez F. 2006. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish.* 3(2):157–171. doi:10.1089/zeb.2006.3.157.
- Salek MM, Carrara F, Fernandez V, Guasto JS, Stocker R. 2019. Bacterial chemotaxis in a microfluidic T-maze reveals strong phenotypic heterogeneity in chemotactic sensitivity. *Nat Commun.* 10(1). doi:10.1038/s41467-019-09521-2.
- Sison M, Gerlai R. 2010. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav Brain Res.* 207(1):99–104. doi:10.1016/j.bbr.2009.09.043.
- Stiassny MLJ, Meyer A. 1999. Cichlids of the rift lakes. *Sci Am.* 280(2):64–69. doi:10.1038/scientificamerican0299-64.
- Torres IFA, Ferreira ADS, Silva WS, Mesquita FO, Luz RK. 2018. Effect of environmental color on learning of Nile tilapia. *Appl Anim Behav Sci.* 209:104–108. doi:10.1016/j.applanim.2018.08.021

- Wallace KJ, Hofmann HA. 2021. Equal performance but distinct behaviors: sex differences in a novel object recognition task and spatial maze in a highly social cichlid fish. *Anim Cogn.* 24 (5):1057–1073. doi:10.1089/zeb.2005.2.259.
- Warburton K. 2003. Learning of foraging skills by fish. *Fish fish.* 4(3):203–215. doi:10.1046/j.1467-2979.2003.00125.x.
- Weber DN, Hesselbach RA, Petering DH, Berg CA. 2019. My fish is smarter than your fish: inquiry-approach methods to examine learning in zebrafish exposed to environmental chemicals. *Am Biol Teach.* 81(5):352–359. doi:10.1525/abt.2019.81.5.352.
- Wenk GL. 1998. Assessment of spatial memory using the t maze. *Curr Protoc Neurosci.* 8 (5B):8.5B.1–8.5B.7.
- Wenk GL. 2004. Assessment of spatial memory using the radial arm and Morris water maze. *Curr Protoc Neurosci.* 8(5A):8.5A.1–8.5A.12.
- Yang S, Kim W, Choi B, Koh H, Lee C. 2003. Alcohol impairs learning of T-maze task but not active avoidance task in zebrafish. *Kor J Biol Sci.* 7(4):303–307. doi:10.1080/12265071.2003.9647720.

6. ARTIGO 2

A cor do ambiente pode afetar a preferência e a aprendizagem de *Pangasianodon hypothalmus* (Sauvage, 1878)?

Resumo

Os peixes sofrem efeito direto do ambiente em que estão alojados, principalmente quando não tem a possibilidade de escolha, como ocorre em ambientes cativos. A coloração predominante no ambiente pode afetar o comportamento, desenvolvimento, desempenho e o bem-estar desses animais. Porém, o efeito é espécie dependente. Foram realizados dois experimentos para análise de respostas comportamentais e fisiológicas de *Pangasionodon hypothalmus* alojados em tanques com coloração azul, branco, preto ou verde. O primeiro experimento teve como objetivo analisar o efeito da cor do tanque no comportamento cognitivo de *P. hypothalmus* no labirinto em T, quando também foram mensurados parâmetros sanguíneos ao final dos testes. No segundo experimento analisamos a preferência por cor pelo *P. hypothalmus* em labirinto em cruz. A cor do ambiente em que foi alojado teve efeito no comportamento dos peixes no labirinto em T e no nível de lactato sanguíneo, sendo que os peixes alojados em tanque preto apresentaram maiores níveis de lactato e despenderam menos tempo para realizar a primeira escolha no labirinto em T. Enquanto que os peixes alojados em tanque verde visitaram mais vezes o braço vazio e demoraram mais tempo para se abrigar no labirinto em T. No labirinto em cruz *P. hypothalmus* demonstraram preferência pela cor verde.

Palavras-chave: labirinto em T, comportamento aprendido, ambiente, abrigo, lactato

Abstract

Fish are directly affected by the environment in which they occur, especially when they have no choice, such as in captive conditions. The predominant coloration of an environment can affect the behavior, development, performance and welfare of these animals, although the effects are species dependent. Two experiments were carried out to analyze the behavioral and physiological responses of *Pangasionodon hypothalmus* housed in blue, white, black and green tanks. The first experiment analyzed the effects of tank color on the cognitive behavior of *P. hypothalmus* in a T-maze, with blood parameters also being measured at the end of the tests. The second experiment, also using a T-maze, analyzed color preference for *P. hypothalmus*. The color of the housing environment affected the behavior of the fish in the T-maze and the level of blood lactate, with fish housed in the black environment having higher lactate levels and shorter times for first arm choice. Fish housed in the green environment visited the empty arm of the T-maze more often and took longer to take shelter. *Pangasionodon hypothalmus* showed a preference for green color in the plus maze.

Keywords: T-maze, cognitive behavior, environment, shelter, lactate

6.1. Introdução

As características do ambiente em que o peixe se encontra, como a coloração predominante, pode interferir diretamente na fisiologia do olho destes, sendo que essas alterações podem influenciar comportamentos essenciais como na reprodução e especiação (Dalton et al., 2015). No estágio larval, a coloração do ambiente pode contribuir na mitigação de comportamentos de canibalismo, refletindo nos índices produtivos, como por exemplo, em milkfish (*Chanos chanos*) foi registrado maior crescimento e sobrevivência em tanques com fundo de cor amarelo (Bera et al., 2019). Segundo os mesmos autores, este fato pode estar relacionado a dispersão máxima da luz que gera um aumento no contraste com a presa, facilitando a captura do alimento para as larvas. O mesmo resultado foi encontrado na larvicultura de *Hucho taimen* com maior consumo de ração em tanque amarelo, seguido do tanque branco (Wang et al., 2016).

Vale ressaltar que a cor do fundo do tanque é espécie dependente, ou seja, uma mesma cor pode ter efeito positivo, negativo ou nulo (Nawang et al., 2019). Por exemplo, em estudo com *Epinephelus coioides*, a maior ingestão de alimentos foi em tanque com fundo azul (Ghavidel et al., 2020). Também em tanque com fundo azul *Trichogaster pectoralis* apresentaram melhor taxa de conversão alimentar e crescimento, além de manter a coloração padrão da pele (Ninwichian et al., 2018). Outro exemplo, larvas de *Perca fluviatilis* em tanque branco apresentaram menores valores de comprimento, peso e sobrevivência quando em comparação ao preto (Palińska-Żarska et al., 2019). Enquanto que juvenis de *Colossoma macropomum* apresentaram melhor desempenho e metabolismo quando cultivados em tanque branco (Boaventura et al., 2021). Na larvicultura do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), a cor do tanque não teve efeito nos parâmetros produtivos, porém os peixes alojados em tanque preto apresentaram maiores concentrações sanguíneas de cortisol e glicose com redução do brilho da pele (Costa et al., 2016). A cor do ambiente também pode afetar a escolha de parceiros em guppies (*Poecilia reticulata*) que exibem preferências por grupos de cores em relação a cores individuais nos parceiros, em adição ao contraste visual do ambiente, ou seja, preferem machos com cor que complementa a coloração da água (Cole; Endler, 2015). Assim, a cor do tanque é importante na produção de peixes.

Escobar-Camacho et al. (2019) mostraram que ciclídeos (*Metriaclima benetos*) são hábeis para treinamento com estímulo de cor. Ao estudarem associação de estímulo positivo com a cor azul, cor predominante nos machos, os ciclídeos demonstraram sucesso na tarefa, mesmo na

presença de estímulos de distração em outras tonalidades. A preferência por cor em zebrafish (*Danio rerio*) pode variar, sendo que em peixes domésticos apresentaram preferência pela cor vermelha em contexto de forrageamento e exploratório (Roy et al., 2019), enquanto que, em contexto de múltiplas escolhas entre ambientes, apresentaram preferência pela cor azul e verde (Oliveira et al., 2015).

Visando investigar os efeitos da cor do ambiente no comportamento de *Pangasianodon hypothalmus* usamos dois tipos de labirinto. O uso do aparato do labirinto é adequado para estudos de processos cognitivos em animais, tais como teste de memória, desenvolvimento de mapas cognitivos e estratégias de forrageamento, permitindo com isso a construção do entendimento sobre memória visual-espacial, mapas mentais e raciocínio (Olton, 1979), tendo em vista que o enriquecimento ambiental garante o bem-estar de peixes, melhora a cognição, o comportamento exploratório e as funções neurais (Arechavala-Lopez et al., 2020). A cor pela qual o animal apresenta preferência, também exerce papel importante nas características comportamentais dos animais e pode influenciar em tarefas de aprendizado por associação, memória e tomada de decisão (Avdesh et al., 2012). Em adição, estudo sobre a preferência dos peixes por meio do teste de escolha auxilia na interpretação das respostas fisiológicas a estressores (Ashley, 2007).

O presente estudo teve como objetivo analisar a habilidade de aprendizagem de *P. hypothalmus* alojados em ambientes de diferentes colorações e se estas afetam a preferência por cor desses animais.

6.2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com o comitê de ética da UFMG (CEUA/UFMG) nº 180/2020 e nº 22/2021.

6.2.1 Local de coleta de dados

Foram utilizados 24 exemplares de *P. hypothalmus* juvenis com 13.22 ± 3.76 cm de comprimento e 12.35 ± 1.20 g de peso distribuídos aleatoriamente em quatro tanques de 28 L (6 por tanque) em sistema de recirculação de água (RAS). Cada tanque foi revestido por papel plástico opaco, nas seguintes cores: verde, azul, preto ou branco. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com dieta comercial extrusada (Acqualine Supra®, Anápolis, Goiás, Brasil) de 1.2-1.8 mm de diâmetro, contendo 46% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e energia digestível de $3600 \text{ kcal kg}^{-1}$. No RAS a temperatura, salinidade, pH e condutividade foram 25.5 ± 2.1 °C, 0.47 ± 0.25 ppt, 6.23 ± 0.28 e 0.96 ± 0.46 mS/cm, respectivamente, mensurados através da sonda multiparâmetro (Hanna HI98130). O fotoperíodo foi de 12L:12E usando temporizador automático. Os peixes foram mantidos nessas condições por 37 dias.

6.2.2 Fase 1

6.2.2.1 Sessão de reconhecimento labirinto em T

Para o teste de aprendizagem foi utilizado um aquário labirinto em T com as paredes revestidas por papel plástico opaco de cor branco com corredor principal de 49 cm e braços laterais com 29 cm de comprimento, altura de 20 cm e largura de 14 cm (Figura 1).

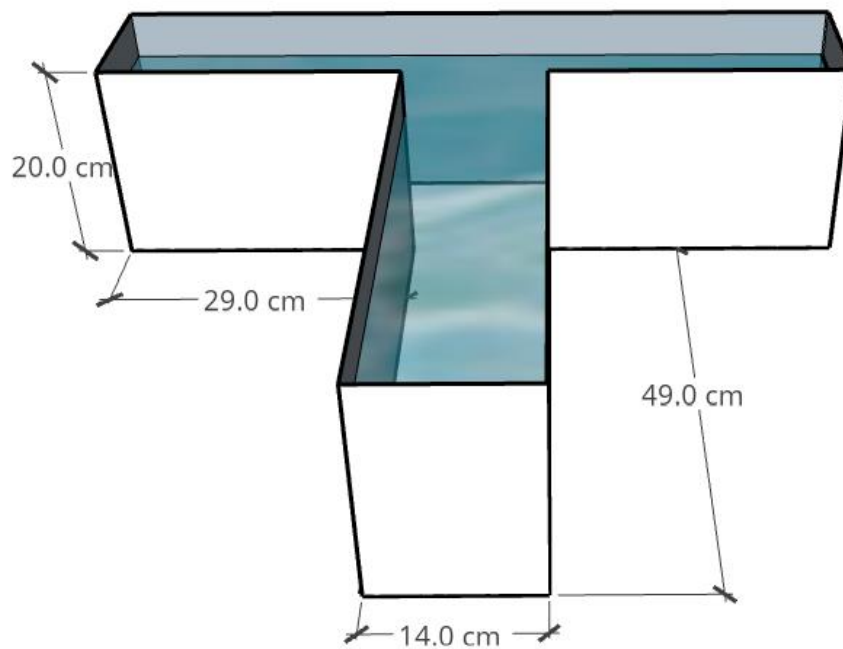


Figura 1. Labirinto em T para teste de aprendizado de *Pangasianodon hypothalmus*.

Antes do teste propriamente dito, durante dois dias consecutivos, os animais, estocados em tanques de diferentes cores, foram direcionados individualmente ao labirinto para uma sessão de reconhecimento. Para tal, os animais foram submetidos a jejum de 24 horas. Antes de iniciar a sessão de reconhecimento, foi realizado o sorteio dos tanques para ordem de ida ao labirinto dos animais. Em seguida foram capturados individualmente e alocados na área de aclimação do labirinto T e mantidos por cinco minutos. Durante o período de aclimação os animais foram mantidos em área fechada, na caixa inicial com parede opaca removível (*start box*), sem contato visual externo com o resto do labirinto. Após este tempo, foi removida a parede opaca para acesso ao labirinto sem a presença de abrigo e marcador visual durante o período de 15 minutos. Ao final do dia os peixes foram alimentados.

6.2.2.2 Teste de aprendizado em labirinto em T

Para este teste, cada animal foi alocado individualmente no labirinto em T uma vez ao dia, como descrito na sessão de reconhecimento. Localizado dentro do labirinto foi colocado uma peça de Lego[®] representando um marcador visual junto uma peça de cano PVC de 50 mm de 9.5 cm de comprimento com intuito de fornecer abrigo ao peixe, em um dos braços, sendo este por sorteio antes do início de cada dia do estudo. Após cinco minutos, os animais foram liberados para explorar o labirinto, quando se deu início a contagem do tempo e observações dos comportamentos. Durante os 15 minutos de observações, de cada peixe, foi quantificado: tempo de latência; tempo que o peixe levou para fazer a primeira escolha; tempo que o peixe permaneceu na primeira escolha; tempo que o peixe permaneceu inativo e tempo para se abrigar, ou seja, utilizar o cano de PVC como abrigo (Tabela 1). Também foram contabilizados os números de associações entre marcador visual e o abrigo, quando o braço com a peça de Lego[®] e abrigo foi a primeira escolha realizada. Cada animal foi treinado durante 15 dias consecutivos, realizando um teste por dia.

Tabela 1. Variáveis observadas de cada peixe no experiment 1.

Comportamento	Descrição
Tempo de latência	Tempo que levou para sair da zona de aclimatação
Tempo para a primeira escolha	Tempo que o peixe demandou entre deixar a zona de aclimatação e escolher um dos braços do labirinto-T (direito ou esquerdo).
Tempo na primeira escolha	Tempo que permaneceu no primeiro braço escolhido
Tempo para abrigar	Tempo que demandou para encontrar o abrigo e utilizá-lo
Tempo inativo	Tempo que o peixe permaneceu inativo sem função aparente
Número de associações	Quantas vezes o peixe escolheu o braço do labirinto indicado pela peça de Lego [®] que continha o abrigo

6.2.2.3 Hematologia e bioquímica do sangue

No último dia do teste em labirinto T, ao final de cada observação, foi realizada coleta de sangue de cada peixe. Para as coletas, os peixes foram contidos utilizando-se pano úmido. A coleta foi realizada por venopunção na artéria vertebral caudal, com acesso ventral. Foram coletados cerca de 1 mL de sangue e adicionado heparina sódica (10% do volume de sangue). A concentração de hemoglobina (g dL^{-1}) no sangue foi determinada usando a reação de cianometahemoglobina pelo kit comercial (Bioclin - www.bioclin.com).

Ao final das análises hematológicas, as alíquotas remanescentes de sangue total heparinizado foram centrifugadas a $1.165 \times g$ por 10 min (Centrifuge Spinlab SL-5AM) para separação do plasma e determinação da glicose (mg dL^{-1}) pelo teste da glicose oxidase (GOD Trinder) (n.º de referência: K082-2), triglicérides monoreagente (mg dL^{-1}) pela reação de Trinder (n.º de referência: K117) e colesterol (mg dL^{-1}) pelo método enzimático de Trinder por kit comercial (n.º de referência: K083-3). Todos os testes foram analisados pelo kit Bioclin (www.bioclin.com - QUIBASA Química Básica Ltda). Todas as análises foram lidas em espectrofotômetro (Biocrom Libra S22 – analiticaweb.com.br).

Ao final da etapa 1, os animais permaneceram por 11 dias nos tanques de diferentes cores sob os manejos descritos anteriormente.

6.2.3 Fase 2

6.2.3.1 Sessão de reconhecimento do labirinto em cruz

Para o teste, foi utilizado um aquário tipo cruzeta com quatro pontas com as paredes revestidas por papel plástico opaco de cor branco. As quatro pontas do aquário possuem o mesmo comprimento e distância do centro com 40 cm de comprimento, 14 cm de largura e 20 cm de altura (Figura 2). As pontas do aquário são conectadas por um quadrado central 14 x 14 cm que funciona como caixa de início (*start box*).

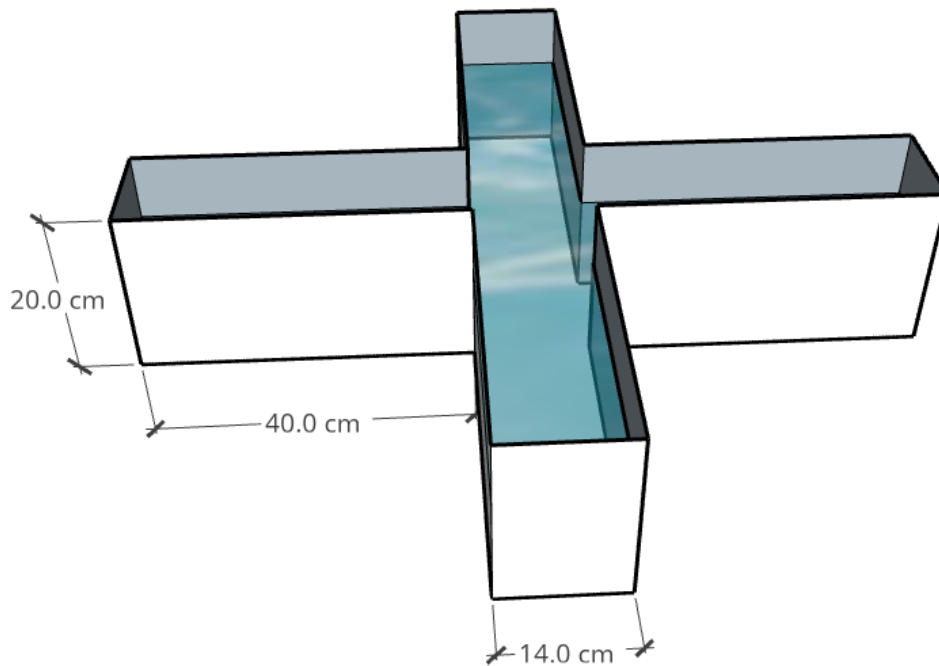


Figura 2. Labirinto em cruz para teste de preferência por cor de *Pangasianodon hypothalmus*.

Assim como no teste de aprendizagem, durante dois dias antes de iniciar os testes os animais estocados nos tanques de diferentes cores foram direcionados individualmente ao labirinto para uma sessão de reconhecimento. Para tal, os animais foram submetidos a jejum de 24 horas. Antes de iniciar a sessão de reconhecimento, foi realizado o sorteio dos tanques para ordem de ida ao labirinto dos animais. Em seguida foram capturados individualmente e alocados na área de aclimação do labirinto cruzeta e mantidos por cinco minutos. Durante o período de aclimação os animais foram mantidos em área fechada, na caixa inicial (*start box*) com parede translúcida removível, com contato visual externo com o resto do labirinto. Após este tempo, foi removida a parede translúcida para acesso ao labirinto durante o período de 15 minutos. Após finalizado todos os testes ao final do dia os peixes foram alimentados.

6.2.3.2 Teste de preferência por cor em labirinto em cruz

O teste de preferência por coloração do ambiente teve duração de 8 dias consecutivos. As paredes do labirinto foram revestidas com papel plástico opaco, cada braço com uma das cores; azul, branco, preto e verde, de acordo com a cor dos tanques de cultivo. Cada animal foi alocado

individualmente no labirinto cruzeta uma vez ao dia, como descrito na sessão de reconhecimento. Após cinco minutos, os animais foram liberados para explorar o labirinto, quando se deu início a contagem do tempo e observações dos comportamentos. Durante os 15 minutos de observações, de cada peixe, foram marcados o tempo despendido e a frequência de visitação em cada braço.

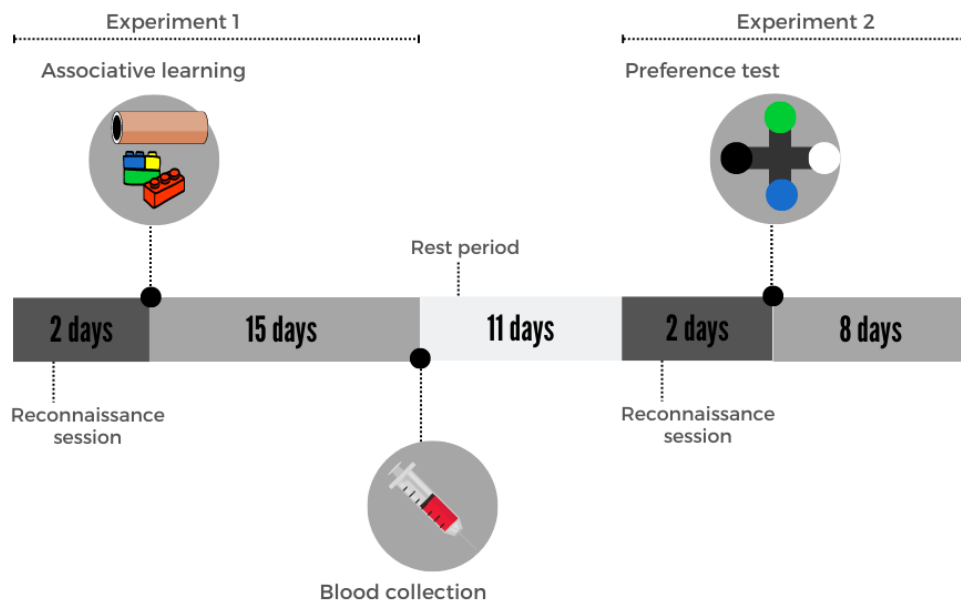


Figura 3. Linha do tempo.

6.2.4 Análise Estatística

A fase 1 do experimento foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro cores de alojamentos (azul, branco, preto e verde) como tratamentos, com seis repetições, sendo cada animal uma unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos primeiro ao teste *Kruskal-Wallis* para análise de variância a 5% de confiabilidade e quando significativos foram analisados pelo teste de médias *Student-Newman-Keuls* ao nível de 5% de probabilidade. Para identificar qual foi a primeira escolha realizada, entre os tratamentos, foi realizado o teste de *Qui-quadrado*. Os dados de análise sanguínea foram submetidos à análise de variância a 5% de confiabilidade seguida pelo teste T (LSD de Fisher) ao nível de 5% de probabilidade. A Fase 2 foi conduzida em DIC, em fatorial com quatro cores de alojamentos (azul, branco, preto e verde) e quatro cores disponíveis no labirinto (azul, branco, preto e verde), com seis repetições, e cada animal como unidade experimental. Os dados foram submetidos à

análise de variância a 5% de confiabilidade e quando significativos foram analisados pelo teste T (LSD de Fisher) ao nível de 5% de probabilidade. Os testes foram realizados utilizando o programa estatístico *Bioestat*.

6.3 Resultados

6.3.1 Fase 1. Teste de aprendizado em labirinto em T

6.3.1.1 Análises comportamentais

Não houve diferença entre as médias de tempo em latência, TNPE e TF entre os peixes estocados em ambientes de diferentes cores quando alocados no labirinto em T ($P > 0.05$; Tabela 2). Os peixes mantidos no tanque de coloração preto despenderam menos tempo para realizar a primeira escolha ($p = 0.0437$), enquanto os peixes oriundos do tanque verde despenderam mais tempo para se abrigar que os demais peixes ($p = 0.0070$).

Tabela 2. Tempo mediano (segundos) que juvenis de *P. hypothalmus* de tanques de diferente coloração despenderam em diferentes comportamentos no labirinto em T.

Comportamento	Cor do tanque				Valor de P
	Azul	Branco	Preto	Verde	
Latência (s)	4.0	2.0	1.5	2.0	0.0942
TPPE (s)	8.0 ^a	6.0 ^{ab}	5.0 ^b	8.0 ^a	0.0437*
TNPE (s)	14.0	16.0	15.0	11.5	0.6003
TF (s)	0	0	0	0	0.4509
TS (s)	138.0 ^b	189.0 ^b	108.5 ^b	314.0 ^a	0.0070*

*Diferença significativa pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0.05$).

Letras diferentes na coluna indica diferença significativa pelo teste Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$). Tempo que o peixe levou para fazer a primeira escolha (TPPE); tempo que o peixe permaneceu na primeira escolha (TNPE); tempo em ócio (TF) e tempo para se abrigar, ou seja, utilizar o cano de PVC como abrigo (TS).

A escolha entre o braço indicado pela peça de Lego®, com abrigo e o braço vazio do labirinto em T, variou de acordo com a cor do tanque onde os animais estavam alojados ($p = 0.0393$). Os peixes alojados no tanque de coloração verde visitaram mais o braço do labirinto

que estava vazio, como primeira escolha ($p=0.0148$; Tabela 3). Os animais alojados nos demais tanques visitaram o braço vazio e o braço com abrigo na mesma proporção.

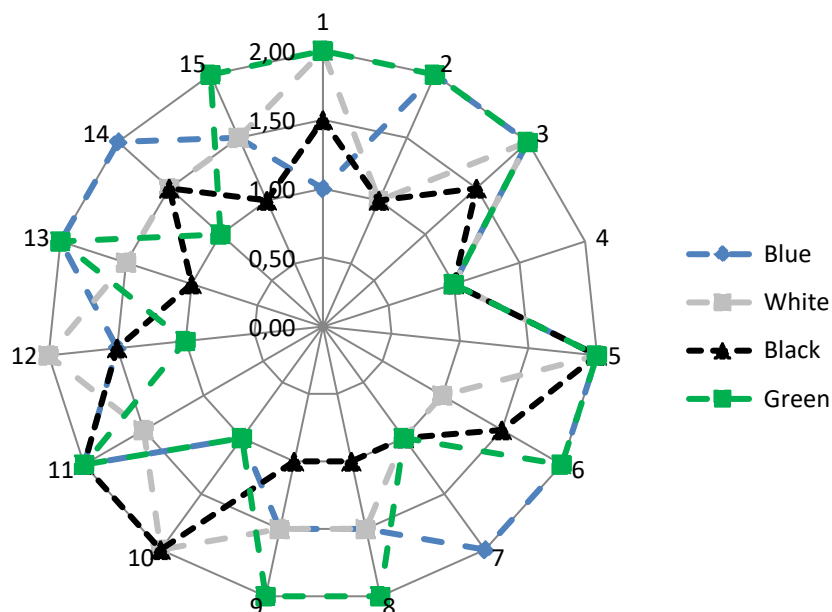
Tabela 3. Número de associações entre a peça de Lego® e o abrigo durante os dias do teste de aprendizado com juvenis de *P. hypothalmus* de diferentes tanques de diferentes cores em labirinto em T.

Cor do tanque	Braço visitado		Valor de <i>P</i>
	Vazio	Lego®+Abrigo	
Azul	51	36	0.1334
Branco	46	42	0.7491
Preto	37	51	0.1658
Verde	61 ^a	36 ^b	0.0148*

*Diferentes letras na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($P<0.05$).

Ao visualizar as escolhas medianas realizadas durante os dias de observações, nota-se que os peixes do tratamento verde escolheram por mais dias o braço vazio como primeira opção, enquanto que os peixes dos demais tratamentos não demonstraram preferência (Figura 4).

Figura 4. Gráfico radar com representação da primeira escolha por juvenis *P. hypothalmus* dos tanques de diferentes cores por dia de visitaçao ao labirinto em T. Escore 2, mais externo ao



gráfico, representa o braço vazio como primeira escolha, enquanto que escore 1 representa a escolha pelo braço indicado pela peça de Lego®, com abrigo.

6.3.1.2 Hematologia e bioquímica do sangue

Não houve diferença para os níveis de hemoglobina, glicose e colesterol entre as cores de tanques ao final do teste de aprendizado ($P > 0.05$; Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de juvenis *P. hypothalmus* dos tanques de diferentes cores após 15 dias de aprendizado no labirinto em T.

Parâmetros	Cor do tanque				Valor de P
	Azul	Branco	Preto	Verde	
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	8.1±0.7	7.3±0.8	9.0±0.6	8.0±0.6	0.3621
Glicose (mg dL ⁻¹)	76.3±6.7	77.0±6.3	94.8±15.9	94.7±4.4	0.3254
Colesterol (mg dL ⁻¹)	108.7±16.4	127.0±11.2	106.8±9.0	123.0±9.0	0.5387

Os peixes mantidos em tanques de coloração preta apresentaram maiores concentrações sanguíneas de lactato ($P < 0,0001$; Figura 5) quando comparado aos peixes dos demais tratamentos.

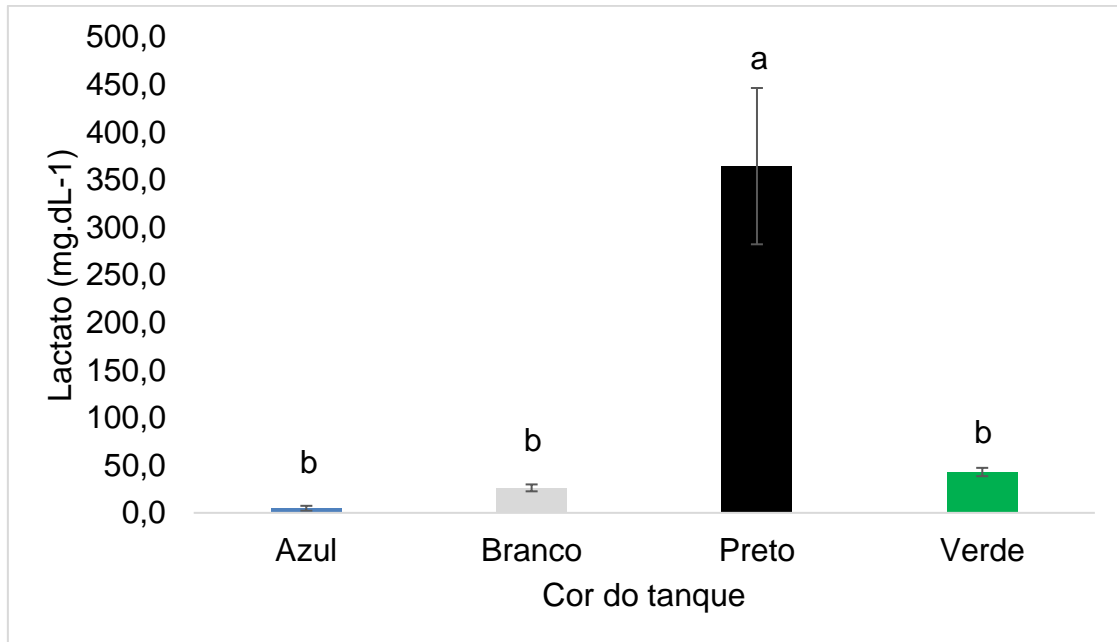


Figura 5. Média da concentração sanguínea de lactato de juvenis *P. hypothalmus*, após ida ao labirinto em T, no final do período experimental de 15 dias. São apresentados os valores médios e barra de erros (média \pm EP; n = 6). Letras diferentes nas barras do diagrama indica diferença significatia ($P < 0.05$, ANOVA unilateral, teste T (LSD de Fisher)).

6.3.2 Fase 2. Teste de preferência em labirinto em cruz

Não foi significativa a interação entre as cores dos tanques onde os animais estavam alojados com a cor do braço visitado, na frequência de visitação ($p=0.1079$) dos peixes em cada braço dentro do labirinto em cruz (Figura 6). Independentemente da cor do tanque onde estavam alojados, os peixes visitaram mais o braço de cor verde e o braço de cor azul.

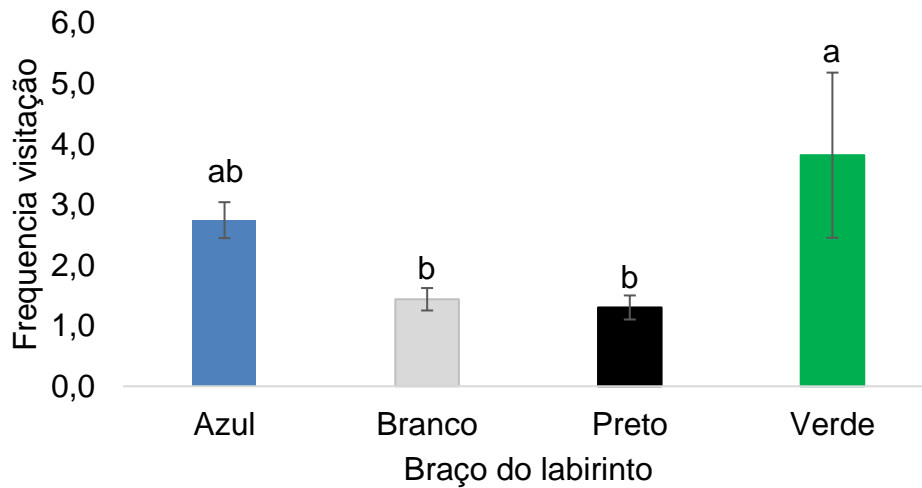


Figura 6. Frequência de visitação de juvenis de *P. hypothalmus* em cada braço do labirinto em cruz com diferentes cores durante nove dias de experimento. Valores médios e barra de erro (média ± EP) são apresentados (n = 6). Letras diferentes nas barras de frequência de visitação indicam diferença significativa ($P < 0.05$, ANOVA unilateral, teste T (LSD de Fisher)).

Em relação ao tempo que os peixes despenderam em cada braço do labirinto houve interação significativa ($p=0.0005$; Tabela 5) entre a cor do tanque onde estavam alojados e a preferência.

Tabela 5. Média de tempo (segundos) que juvenis *P. hypothalmus* de diferentes tanques de diferentes cores despenderam em cada braço com diferentes cores, em labirinto em cruz.

Cor do braço	Cor do tanque				Valor de P
	Azul	Branco	Preto	Verde	
Azul	348.3±55.5 ^{Aa}	265.9±44.3 ^{Aab}	228.8±47.5 ^{Aa}	339.3±55.5 ^{Aa}	0.2775
Branco	82.7±35.0 ^{Ab}	187.8±42.9 ^{Abc}	198.7±46.9 ^{Aa}	125.6±40.9 ^{Ab}	0.1581
Preto	85.8±35.5 ^{Bb}	77.0±19.5 ^{Bc}	287.8±50.5 ^{Aa}	130.8±41.2 ^{Bb}	0.0005
Verde	377.1±55.5 ^{Aa}	351.4±49.4 ^{Aa}	183.9±41.4 ^{Ba}	329.7±57.5 ^{Ba}	0.0380
P-valor	<0.0001	0.0001	0.5973	0.0011	

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste T (LSD de Fisher) ($P < 0.05$). Cada valor representa a média ± EP.

Os peixes alojados em tanque azul passaram mais tempo no braço azul e verde do labirinto. Os peixes do tanque branco passaram mais tempo no braço verde e azul. Os peixes do tanque preto permaneceram nos braços azul, verde e preto, por tempo semelhante. Já, os peixes do tanque verde passaram mais tempo no braço azul. Analisando pela disponibilidade de cor para escolha, no braço azul como opção os peixes oriundos dos tanques azul, preto e verde passaram mais tempo. Na opção do braço branco, os peixes do tanque preto permaneceram mais tempo. Na opção de ambiente com braço preto os peixes que passaram mais tempo foram os alojados em tanques de mesma coloração. No braço verde do labirinto os peixes que permaneceram mais tempo foram os advindos do tanque azul e branco.

Além dos comportamentos analisados, podemos observar que alguns espécimes de *P. hypophthalmus* do presente estudo, do primeiro ao último dia experimental, permaneceram longos períodos em congelamento ou não responderam ao teste no Labirinto em T. Apesar de não influenciar na mediana do tempo final em congelamento desses grupos, observamos esse comportamento com certa frequência nos peixes.

6.4 Discussão

No presente estudo encontramos que a cor do tanque afeta o comportamento, parâmetros sanguíneos e preferência por cor de *P. hypophthalmus* nos labirintos testados. Quando alojados em tanque verde visitaram com mais frequência o braço vazio e demandaram mais tempo para se abrigar no labirinto em T. Acrescido a isso, o braço verde do labirinto em cruz também foi o qual os *P. hypophthalmus*, deste experimento, visitaram mais vezes. Além disso, foi no braço verde do labirinto em cruz que os peixes advindos dos tanques azul, branco e preto despenderam mais tempo. O conjunto desses fatores pode ser indicativo que em ambiente com predominância da coloração verde o *P. hypophthalmus* se sente mais confortável.

O uso de abrigos está relacionado ao estado emocional dos peixes, uma vez que esses proporcionam conforto e segurança, o que resulta na redução do nível de cortisol sanguíneo (Barcellos et al., 2009). Então, peixes que se encontram em conforto diminuem a procura por abrigos, assim como peixes que se encontram em ambiente estressante aumentam a demanda por abrigos. Em consonância com os resultados aqui encontrado, *P. hypophthalmus* criados em tanque verde atingiram melhor desempenho de crescimento em comparação com os criados em

tanque preto (Nawang et al., 2019), enquanto *P. pangasius* apresentaram maior taxa de sobrevivência em tanques verdes (Ferosekhan et al., 2019).

Em contraste, *P. hypophthalmus* alojados em tanque preto apresentaram maior concentração de lactato sanguíneo, despenderam menos tempo para fazer a primeira escolha do braço visitado no Labirinto em T e foram os únicos a permanecerem mais tempo no braço preto do labirinto em cruz. Nawang et al. (2019) observaram que em tanque preto *P. hypophthalmus* atingiram a coloração negra profunda. Essa capacidade de ajustar o tom da pele a cor do fundo é um fenômeno comum nos peixes; porém, ambientes que promovem esse processo são considerados estressante (Salm et al., 2005). Em consonância com os resultados observados, em *L. alexandri*, bagre brasileiro, foi observado maiores concentrações de cortisol e glicose em tanque preto (Costa et al., 2017). *Trichogaster pectoralis* também apresentaram níveis mais altos de indicadores de estresse em tanque dessa coloração (Ninwichian et al., 2018). Além desses resultados, *P. pangasius* apresentaram menor taxa de sobrevivência em tanque preto (Ferosekhan et al., 2019) indicando que essa cor deve ser evitada para algumas espécies de peixes, incluindo o *P. hypophthalmus*.

É possível notar que no presente estudo não houve uma consistência dos traços no gráfico radar, formados a partir dos pontos representativos da escolha do peixe. Este fato indica que estes oscilaram de forma espontânea a escolha entre os braços do labirinto em T. Assim inferimos que os *P. hypophthalmus* não foram capazes, ou não estavam motivados suficientemente para aprender a discriminação de resposta condicional durante o período experimental proposto neste trabalho. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de serem peixes que habitam regiões profundas e, apesar de terem a tendência de explorar o ambiente, a exposição em ambientes mais claros, como o labirinto, pode ter tornados os animais mais ansiosos. Outro ponto a ser considerado é o tamanho dos braços do Labirinto em T, que pode não ter sido adequados para esses peixes com tamanho menor que o ideal, não apresentando dificuldade espacial (Blodgett; McCutchan, 1947). Quando esses peixes escolheram o braço vazio primeiro tiveram a possibilidade de mudar a escolha sem despendar energia suficiente para que o aprendizado se tornasse imprescindível.

Em relação ao comportamento de freezing observado no experimento, Lucon-Xiccato e Bisazza (2017) em treinamentos longos com guppies de origem selvagem, também observaram que estes animais apresentavam comportamento de congelamento por longos períodos ou não respondiam ao teste quando em treinamento. Esse comportamento observado nos peixes do

presente estudo, pode ter ocorrido devido a esses animais terem origem de produção comercial em larga escala, sem manejos intensivos e frequentes em contraste com o ambiente laboratorial, presenciado no estudo. O ambiente experimentado pelo peixe oferece oportunidades de diferenças comportamentais, como por exemplo na tomada de risco, peixes de linhagem de laboratório, com manejo intensivo, possuem maior propensão de assumir risco, enquanto de linhagem selvagem apresenta comportamentos antipredador como fuga ou congelamento (Huntingford, 2004).

6.5 Conclusões

Nossos resultados mostraram que a cor do ambiente influencia no comportamento do *P. hypothalmus*. Observamos que *P. hypothalmus* mantidos em tanques verdes apresentaram comportamentos indicativos de conforto, e tanques com cor preta predominante provocou desconforto a esses peixes. Em adição, *P. hypothalmus* apresentaram preferência pela cor verde no teste no labirinto em cruz. A cor do ambiente em que estavam alojados também influenciou na procura por abrigo por *P. hypothalmus*, no labirinto em T. Esse estudo traz contribuições para tomada de decisão a respeito de enriquecimento ambiental e, conseqüente promoção de bem-estar para *P. hypothalmus* em sistemas de produção.

6.6 Referências

- Arechavala-Lopez, P., Caballero-Froilán, J.C., Jiménez-García, M., Capó, X., Tejada, S., Saraiva, J.L., Sureda, A., Moranta, D., 2020. Enriched environments enhance cognition, exploratory behaviour and brain physiological functions of *Sparus aurata*. *Sci. Rep.* 10, 11252. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68306-6>
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104:199–235. <https://10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Avdesh, A., Martin-Iverson, M.T., Mondald, A., Chena, M., Askrabag, S., Morganh, N., Lardellih, M., Grothi, D.M., Verdilea, G., Martins, R.N., 2012. Evaluation of Color Preference in Zebrafish for Learning and Memory. *J. Alzheimers Dis.* 28, 459–469. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110704>

- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., 2009. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. *Aquaculture* 288, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.002>
- Bera, A., Kailasam, M., Mandal, B., Sukumaran, K., Makesh, M., Hussain, T., Sivaramakrishnan, T., Subburaj, R., Thiagarajan, G., Vijayan, K.K., 2019. Effect of tank colour on foraging capacity, growth and survival of milkfish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquaculture* 512. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734347>
- Blodgett, H.C., McCutchan, K., 1947. Place versus response learning in the simple T-maze. *J. Exp. Psychol.* 37, 5, 412-422.
- Boaventura, T.P., Pedras, P.P.C., Santos, F.A.C., Ferreira, A.L., Favero, G.C., Palheta, G.D.A., Melo, N.F.A.C., Luz, R.K., 2021. Cultivation of juvenile *Colossoma macropomum* in different colored tanks in recirculating aquaculture system (RAS): Effects on performance, metabolism and skin pigmentation. *Aquaculture* 532, 736079. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736079>
- Cole, G.L., Endler, J.A., 2015. Variable environmental effects on a multicomponent sexually selected trait. *Am. Nat.* 185. <http://doi.org/10.5061/dryad.2qt5j>.
- Costa, D.C., Mattioli, C.C., Silva, W.S., Takata, R., Leme, F.O.P., Oliveira, A.L., Luz, R.K., 2016. The effect of environmental colour on the growth, metabolism, physiology and skin pigmentation of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.13208>
- Dalton, B.E., Lu, J., Leips, J., Cronin, T.W., Carleton, K.L., 2015. Variable light environments induce plastic spectral tuning by regional opsin coexpression in the African cichlid fish, *Metriaclima zebra*. *Mol. Ecol.* 24, 4193–4204. <https://doi.org/10.1111/mec.13312>
- Escobar-Camacho, D., Taylor, M.A., Cheney, K.L., Green, N.F., Marshall, N.J., Carleton, K.L., 2019. Color discrimination thresholds in a cichlid fish: *Metriaclima benetos*. *J. Exp. Biol.* 222. <https://doi.org/10.1242/jeb.201160>
- Ferosekhana, S., Sahoo, S.K., Radhakrishnana, K., Velmuruganb, P., Shamnac, N., Giria, S.S., Pillaia, B.R., 2020. Influence of rearing tank colour on Asian catfish, magur (*Clarias*

- magur*) and pangas (*Pangasius pangasius*) larval growth and survival. *Aquac.* 521, 735080. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735080>
- Ghavidel, S., Kochanian, P., Salati, A.P., 2020. The effects of the tank colour on growth performance and physiological responses in fingerling grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquac. Res.* 51, 276–281. <http://doi.org/10.1111/are.14373>
- Huntingford, F.A., 2004. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *J Fish Biol*, 65 (Supplement A), 122–142. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00562.x>
- Lucon-Xiccato, T., Bisazza, A., 2017. Complex maze learning by fish. *Animal Behaviour* 125:69-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.12.022>
- Nawang, S.U.S.M., Ching, F.F., Senoo, S., 2019. Comparison on growth performance, body coloration changes and stress response of juvenile river catfish, *Pangasius hypophthalmus* reared in different tank background colour. *Aquac. Res.* 50, 2591-2599. <http://doi.org/10.1111/are.14215>
- Ninwichian, P., Phuwan, N., Jakpim, K., Sae-Lim, P., 2018. Effects of tank color on the growth, stress responses, and skin color of snakeskin gourami (*Trichogaster pectoralis*). *Aquac. Int.* <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0242-6>
- Oliveira, J., Silveira, M., Chacon, D., Luchiari, A., 2015. The zebrafish world of colors and shapes: preference and discrimination. *Zebrafish* 12, 2. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1019>
- Olton, D.S., 1979. Mazes, maps and memory. *Am. Psychol.* 34, 583-596.
- Palińska-Żarska, K., Krejszeff, S., Łopata, M., Żarski, D., 2019. Effect of water hardness, temperature, and tank wall color, on the effectiveness of swim bladder inflation and survival of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) larvae reared under controlled conditions. *Aquac. Int.* 27, 931–943. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0333-4>
- Roy, T., Suriyampola, O.S., Flores, J., López, M., Hickey, C., Bhat, A., Martins, M.P., 2019. Color preferences affect learning in zebrafish, *Danio rerio*. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51145-5>

- Salm, A.L., Spanings, F.A.T., Gresnigt, R., Bonga, S.E.W., Flik, G., 2005. Background adaptation and water acidification affect pigmentation and stress physiology of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Gen. Comp. Endocrinol. 144, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.04.017>
- Valenti Jr., T.W., Gould, G.G., Berninger, J.P., Connors, K.A., Keele, N.B., Prosser, K.N., Brooks, B.W., 2012. Human Therapeutic Plasma Levels of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) Sertraline Decrease Serotonin Reuptake Transporter Binding and Shelter-Seeking Behavior in Adult Male Fathead Minnows. Environ. Sci. Technol. 46, 2427–2435. <https://doi.org/10.1021/es204164b>
- Wang, C.A., Xu, Q., Li, J., Wang, L., Zhao, Z., Du, X., Luo, L., Yin, J., 2016. Effects of tank colour on growth and survival of taimen *Hucho taimen* (Pallas, 1773) larvae. Aquac. Int. 25, 437–446. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0041-x>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O entendimento da capacidade cognitiva é peça importante para inferir sobre o estado emocional que o animal se encontra e, assim, conseguir promover um manejo visando o bem-estar destes. Os labirintos são aparatos validados para estudos de comportamentos cognitivos que podem ser usados em diferentes contextos, com base em inúmeras hipóteses passíveis de serem testadas.

Apesar de apresentarem repertório comportamental distinto na natureza, no presente estudo observamos que machos e fêmeas do peixe *A. nyassae* possuem capacidade semelhante de aprendizado de tarefa de associação. Além disso peixes de ambos sexos demonstraram mesma preferência em labirinto-T.

O ambiente em que o animal se encontra, principalmente quando cativo, pode ter efeito direto no estado emocional dos animais e por consequência na capacidade cognitiva destes. Assim sendo, observamos que a cor do ambiente interfere no comportamento em labirinto-T e na preferência do peixe *P. hypothalmus*. Mais estudos são importantes para esclarecer o efeito dessa preferência por ambiente no desempenho de produção e reprodução desses peixes.