

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

Efeitos de estressores e do cortisol na memória em peixes

Rodrigo Egydio Barreto

Orientador: Dr. Gilson Luiz Volpato

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de Concentração de Zoologia.

Botucatu – SP
2006

Este trabalho foi realizado no RECAW – Research Centre on Animal Welfare – Laboratório de Fisiologia e Comportamento Animal do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP e parcialmente no CEH – Centre for Ecology and Hydrology – Lancaster Environmental Centre – Bailrigg – Lancaster – Inglaterra. Este trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 140307/2002-8) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Processo: BEX 0182/04-4).

*À minha família,
Angela, Cesar,
Ana, Tiago e Giovanna*

*“Aquele que é mestre na arte de viver bem faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu tempo livre, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e sua recreação. Distingue uma coisa da outra com dificuldade. Almeja, simplesmente, a excelência em qualquer coisa que faça, deixando aos demais a tarefa de decidir se está trabalhando ou se divertindo. Ele acredita que está fazendo as duas coisas ao mesmo tempo.”
(De Masi, 2001)*

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha profunda gratidão às pessoas que me ajudaram e apoiaram ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pois sem vocês nada disso seria possível. Agradeço especialmente:

- Ao meu orientador de vários anos e principalmente amigo Gilson L. Volpato, por tudo que me ensinou sobre esse apaixonante caminho da ciência.
- Ao Dr. Tom Pottinger (CEH – Lancaster – Inglaterra) por ter gentilmente aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte deste trabalho.
- Ao Antônio C. B. Tardivo, pelo imprescindível auxílio técnico durante diversas fases desse trabalho, mas principalmente pelo grande amigo que é.
- À Dr.^a Eunice Oba (Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP Botucatu) por ceder gentilmente seu laboratório para as análises de cortisol plasmático.
- Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, pelo profissionalismo, eficiência e amizade com que sempre me auxiliaram.
- A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia, que sempre me auxiliaram e se mostraram grandes amigos, em especial ao Prof. Helton C. Delício.
- À Giovanna R. dos Santos por sempre estar ao meu lado me apoiando, ajudando e ensinando.
- Aos irmãos de república de ontem e de hoje: Biotererenses e especialmente Marcelo, Vladimir, Rodrigo e Francisco. E a todos os colegas da UNESP, obrigado pelos maravilhosos momentos que passamos juntos. Valeu amigos!!!

Preâmbulo

Esta tese versa sobre relações entre memória e estresse. Assim, inicialmente apresentamos alguns conceitos dessas duas áreas que permeiam os estudos apresentados neste trabalho.

O **estresse** é um fenômeno que tem sido amplamente estudado, tanto por razões teóricas quanto pelas suas implicações em atividades zootécnicas de interesse econômico. O estresse é conceituado como um estado do organismo frente situações de ameaça da perda da homeostase causada por algum fator (o **estressor**). Esse estado implica num conjunto relativamente padronizado de respostas bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. Pickering (1981) apresenta o quadro geral de estresse em peixes. Segundo ele, o estressor provoca estimulação no sistema nervoso autônomo simpático que libera das células cromafins da interrenal catecolaminas para o sangue; estimula também o eixo HPI (hipotálamo-pituitária-interrenal), que libera corticosteróides para a circulação. Dessas respostas primárias são induzidas respostas secundárias que podem mobilizar energia que é então usada para o organismo se ajustar à ameaça imposta pelo estressor. Se esses mecanismos de resposta persistem respostas terciárias ocorrem, como imunossupressão, redução ou inibição do crescimento e funções reprodutivas. Temporalmente, as respostas primárias e secundárias podem ocorrer em segundos, ou algumas horas ou dias; as terciárias geralmente demoram alguns dias para que sejam percebidas. Segundo Moberg (2000), o estado de estresse é aquele em que o organismo usa de suas reservas para enfrentar a situação de ameaça (estressor), e o estado de **distresse** ocorre quando essas reservas são levadas a limites extremos e o uso de energia e

vias metabólicas implica necessariamente na supressão, total ou parcial, de outros processos. No presente estudo, centramos as investigações sobre o estresse principalmente a partir de medidas de **cortisol**, considerado um dos principais indicadores de estresse em peixes (Barton & Iwama, 1991; Bonga, 1997; Barton 2002) e outros vertebrados (Johnson et al., 1992; Chrousos & Gold, 1992). Em alguns casos, a **glicose** foi também avaliada como indicadora de estresse.

A partir de estudos em peixes, Moreira & Volpato (2004) propõem que os estressores sejam divididos como: a) aqueles em que há ação física do estressor sobre o animal agredido; b) aqueles que decorrem da percepção de um coespecífico estressado; e c) aqueles que são induzidos pela recuperação mnemônica de experiência estressora anterior (lembrança). Este terceiro tipo de estressor foi descrito em peixes apenas recentemente (Moreira & Volpato, 2004; Moreira et al., 2004) e, para que possa ser avaliado, é necessário que se induza essa lembrança no animal, o que na presente tese foi sempre realizado por condicionamento clássico.

O condicionamento clássico foi descrito em 1927 por Ivan Petrovich Pavlov, um fisiologista russo nascido em 1849 na cidade de Ryazan. Trata-se de um processo de aprendizagem que consolida associação entre estímulos, de forma que a reação do animal emitida a um desses estímulos passa, por esse condicionamento, a ser emitida também a outros estímulos. No exemplo clássico, Pavlov mostrou que o estímulo “carne” (**estímulo não condicionado - EN**) provocava salivação (**resposta não condicionada - RN**) em cães. Ao contrário, o som de uma campainha não provocava essa resposta. Porém, Pavlov viu que após oferecer por algumas vezes

concomitantemente esses dois estímulos (campainha e carne) aos cães, quando apresentava novamente apenas o som da campainha, os cães salivavam. Ou seja, o significado de um estímulo (carne moída) foi incorporado ao outro estímulo (som) por meio de experiências sucessivas, o que caracteriza esse tipo de aprendizagem. Assim, denominou de **estímulo condicionado (EC)** o som da campainha após os cães terem incorporado essa associação e **resposta condicionada (RC)** a salivação induzida pelo som da campainha.

Considerando que foi mostrado que os peixes emitem resposta de estresse em termos de elevação dos níveis de cortisol plasmático, neste trabalho procuramos avançar essa questão tentando responder se o significado de estímulos memorizados afeta a resposta de estresse em peixes. Numa primeira análise comparamos a resposta de estresse em condicionamentos de dois EN, asfixia e presença de alimento. Usamos como modelo experimental a tilápia-do-Nilo. Como os animais foram testados em agrupamentos sociais, a presença de alimento envolvia também competição alimentar, o que nos fez considerar essa condição também como um estressor, avaliando subseqüentemente a intensidade desses estressores, mostrando a possibilidade de ligação entre a severidade do estressor e a aquisição da RC. Frente a isso, procuramos numa etapa seguinte avaliar os efeitos do cortisol plasmático sobre a RC em peixes. Esta etapa foi desenvolvida no CEH – Centre for Ecology and Hydrology – Lancaster – Inglaterra, onde o modelo experimental mais usado é a truta arco-íris e na qual também foi mostrado o condicionamento do estresse (Moreira et al., 2004).

A apresentação do trabalho nesta tese procurou privilegiar não apenas os experimentos que forneceram conclusões sólidas, mas também mostrar testes de hipótese que nem sempre foram bem sucedidas de imediato. Esses testes foram importantíssimos para o redirecionamento do projeto ao longo deste doutoramento o que nos motivou a incluí-los no corpo deste texto.

**Efeito do significado do estímulo
não-condicionado sobre estresse
condicionado na tilápia-do-Nilo**

Introdução

Recentemente, Moreira & Volpato (2004) mostraram que no peixe tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, a recuperação mnemônica de experiências estressoras induz aumento dos níveis plasmáticos de cortisol. Posteriormente, esse tipo de estressor mnemônico foi descrito também em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Moreira et al., 2004). Esses estudos mostram que nesses peixes respostas neuroendócrinas estão sujeitas ao condicionamento pavloviano, uma vez que o indicador de estresse utilizado foi o nível plasmático de cortisol. Portanto, os peixes possuem mecanismos eficazes de aprendizagem para se anteciparem às situações estressantes, pois a liberação de cortisol induzida por um EC prepara o organismo para a situação de ameaça.

No caso de estressores não mnemônicos, tem sido mostrado que a resposta de estresse é modulada pela intensidade do estímulo (Barton & Iwama, 1991; Bonga, 1997; Barton 2002). Assim, é plausível supor que diferentes intensidades de estressores mnemônicos também modulem os níveis de cortisol em peixes.

Independente do EC estar associado a um estímulo aversivo, ele pode alterar os níveis de cortisol. Por exemplo, após alimentação tem sido relatada elevação de cortisol plasmático em algumas espécies de peixes (Bry, 1982; Boujard & Leatherland, 1992; Reddy & Leatherland, 1994, 1995). A alimentação é certamente uma condição não aversiva e que pode estar ligada à liberação de cortisol (pós-prandial). Apesar disso, um certo grau de estresse social está presente na alimentação em grupo devido à competição

alimentar (Carrieri & Volpato, 1991). Mesmo nesse caso, a intensidade do estressor pode ser menor comparada a estressores não sociais. Assim, a comparação de estressor não social e alimentação em grupo como EC implica na avaliação de diferença de estressores e aversividade do estímulo o que, segundo hipotetizamos neste estudo, deve trazer diferença no condicionamento de alterações nos níveis de cortisol plasmático como RC.

Essa hipótese foi testada no peixe Ciclídeo, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), o qual apresenta resposta de estresse condicionado em termos de elevação de cortisol plasmático (Moreira & Volpato, 2004) e na qual a competição alimentar (Carrieri & Volpato, 1991) e o estresse social (Fernandes & Volpato, 1993; Volpato & Fernandes, 1994; Alvarenga & Volpato, 1995; Barcellos et al., 1999; Corrêa et al., 2003; Merighe et al., 2004) são evidentes.

O estudo foi desenvolvido em quatro etapas: 1) avaliação da ocorrência de condicionamento mnemônico do estresse em tilápias-do-Nilo agrupadas, de forma similar ao demonstrado para tilápias em isolamento social (Moreira & Volpato, 2004); 2) efeito da alimentação em grupo nos níveis de cortisol plasmático; 3) efeito da alimentação em isolamento social sobre os níveis de cortisol plasmático; e 4) avaliação do condicionamento mnemônico dos níveis de cortisol plasmático tendo como EN a alimentação em grupo.

Etapa 1: condicionamento de estresse em tilápias-do-Nilo agrupadas

Métodos

Estocagem dos animais

Exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), foram mantidos em tanques por aproximadamente 8 meses, com aeração constante, temperatura da água aproximadamente a 24°C. O fotoperíodo foi estabelecido das 06:00 às 18:00h. Os animais foram alimentados 3 vezes por semana com ração comercial peletizada (38% de proteína bruta).

Procedimentos

Setenta e cinco tilápias-do-Nilo providas da população de estoque e sem distinção de sexo foram alojadas nos tanques experimentais (base com $\varnothing = \sim 93$ cm; 500 l cada; 15 peixes/ tanque). Em cada tanque havia fluxo de água declorinada diário (aproximadamente 4 h de renovação de água por dia; 30L/h). Cada tanque possuía um sistema de iluminação anexado à parte interna da tampa. Essa iluminação provinha de lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, de 20w, acesas das 06:00 h às 18:00 h. Permaneceram cinco dias para ajuste a essas condições, sendo alimentados uma vez ao dia, no 1º, 3º e 5º dias.

Após esse período, a estratégia básica consistiu em condicionar os peixes pela associação de um EC (interrupção da aeração por 30 s) a um EN (asfixia por 2 min fora d'água), avaliando-se posteriormente se o EC

provocava a RC (elevação dos níveis plasmáticos de cortisol) sem a presença do EN. A associação entre EC e EN foi feita por 10 dias consecutivos, uma vez ao dia, e a RC foi avaliada no 11º dia. Todos esses procedimentos foram feitos entre 12:00 h e 14:00 h de cada dia.

Os tanques eram de parede opaca e possuíam tampa não permitindo contato visual entre os peixes e o pesquisador, o que evitava a associação do EN com outros estímulos externos além do EC a ser testado. Os tanques tinham uma rede revestindo a parede interna, que era usada para captura imediata dos peixes para retirada fora d'água (asfixia). O EC foi o desligar do sistema de aeração por 30 s. A aeração provinha de um quadrado (21 cm de lado) de cano PVC perfurado ($\varnothing_{\text{furo}} = 2 \text{ mm}$) em toda sua extensão para saída do ar. Esse quadrado era fixado ao centro no fundo do tanque, sendo suficiente para emitir bolhas em quase toda extensão do tanque. Para a asfixia (EN), erguia-se a rede que cobria a superfície interna do tanque, expondo todos os peixes ao ar por 2 min, que, em seguida, eram reintroduzidos no tanque pelo abaixamento da rede. Esse procedimento foi facilitado anexando-se por cordões a rede à tampa do tanque, a qual era suspensa por um sistema de roldanas.

Para controle de variáveis interferentes, cinco tratamentos foram necessários (Tabela 1).

Tabela 1. Delineamento experimental da Etapa 1.

Grupos Experimentais	Dias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	s
EC	l	i	i	i	l	i	i	i	i	i	i	is
EN ₁₀	A	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	s
EN ₁₁	A	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	as
Condicionamento	l	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	is

s = coleta de sangue para análise dos níveis plasmáticos de cortisol.

i = interrupção da aeração.

a = asfixia

n = 6 peixes aleatoriamente coletados de cada tanque

Nos 10 dias iniciais do experimento, no grupo Controle as variáveis do condicionamento (asfixia e interrupção da aeração) não foram impostas aos peixes; no grupo EC avaliou-se o efeito da interrupção da aeração e no grupo EN₁₁ investigamos o efeito da asfixia. O grupo EN₁₀ avaliou se a asfixia induz elevação crônica do cortisol plasmático. O grupo Condicionamento, comparado com esses outros grupos, permitiu concluir sobre a presença da RC. No 11º dia, o sangue dos animais foi coletado no horário habitual da experimentação diária, sendo exatamente 30 min após a apresentação do EC ou do EN nos grupos com esses estímulos presentes nesse dia.

Para a coleta de sangue, os peixes foram capturados aleatoriamente com uma rede e imediatamente transferidos para solução de anestésico (Benzocaina, 80 mg/ L d'água). Após sedação (perda da postura e ausência de reflexos), o sangue era coletado por punção cardíaca com seringas heparinizadas. Posteriormente, o sangue era centrifugado a 3000 rpm durante 5 min, o plasma coletado e mantido congelado (- 20°C) até o momento das análises laboratoriais. O peso (g) dos peixes foi similar entre os

grupos (ANOVA; $F_{(4;25)} = 0,53$; $P = 0,71$): Controle = $49,0 \pm 18,3$; EC = $45,3 \pm 7,8$; EN₁₀ = $40,3 \pm 7,7$; EN₁₁ = $42,1 \pm 11,3$; Condicionamento $48,2 \pm 14,9$.

Os dados obtidos foram transformados por raiz quadrada para aumentar a homogeneidade e homocedasticidade e, em seguida, comparados por ANOVA (inteiramente casualizados) seguido por Newman-Keuls para as comparações *pos-hoc*, considerando-se $\alpha = 0,05$.

Resultados

Na figura 1 observa-se que o tratamento imposto aos animais afetou significativamente o nível plasmático de cortisol (ANOVA; $F_{(4;25)} = 61,49$; $P < 0,000001$). O valor médio no grupo EN₁₁ foi estatisticamente maior que todos os demais tratamentos. Além disso, no grupo condicionamento o valor médio foi menor que no grupo EN₁₁, mas maior quando comparado com os níveis dos outros tratamentos. Entre os outros grupos os níveis de cortisol foram baixos e similares entre si.

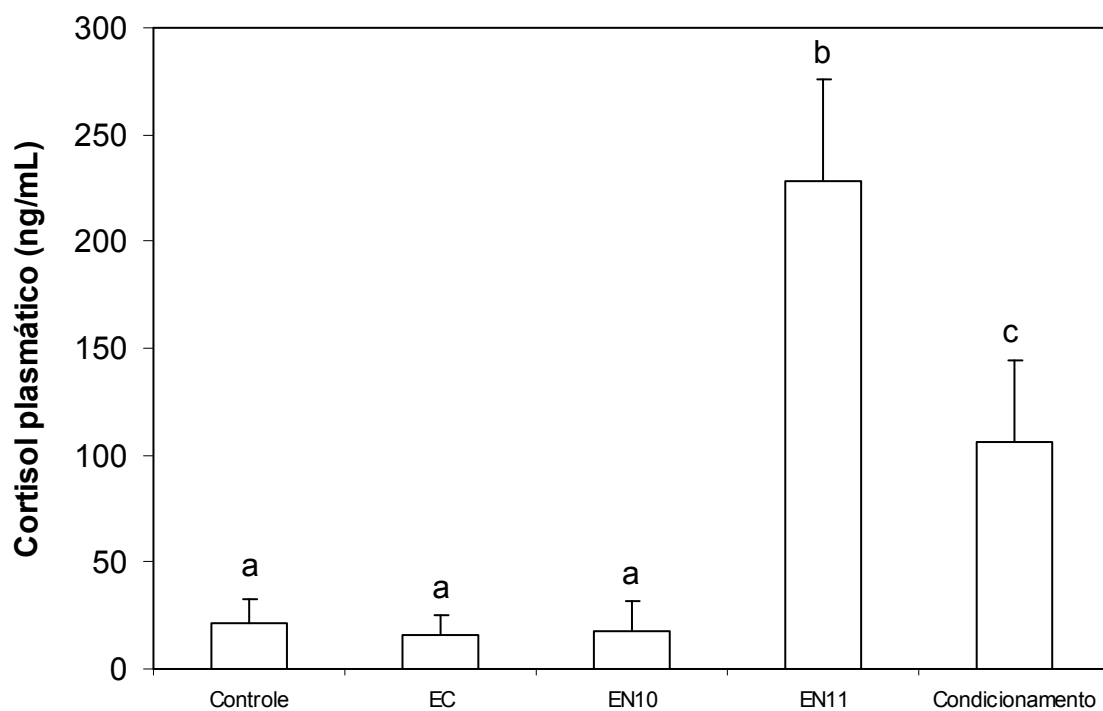


Figura 1. Resposta de estresse condicionada na tilápia-do-Nilo. Valores médios (\pm DP) de cortisol plasmático que não compartilham uma mesma letra são estatisticamente diferentes entre si (ANOVA; $F_{(4;25)} = 61,49$; $P < 0,0001$). Estímulo condicionado (EC) = Interrupção da aeração; estímulo não-condicionado (EN) = asfixia.

Etapa 2: Evolução temporal dos níveis de cortisol plasmático em função da alimentação na tilápia-do-Nilo em agrupamento social.

Métodos

Foram utilizadas 120 tilápias-do-Nilo sem distinção quanto ao sexo e provindas da população de estoque e alojadas nos tanques experimentais (15 peixes/tanque), como descrito na Etapa 1. Os peixes foram mantidos em jejum durante 5 dias. No 6º dia, 4 tanques receberam alimento em excesso (cerca de 10% da biomassa do tanque) e os demais permaneceram em jejum (controle).

Em cada grupo foram amostrados 6 peixes, capturados aleatoriamente dentre os 15 peixes do respectivo tanque. Aos 15 min, 30 min, 1 h e 2 h após a alimentação foram amostrados dois tanques (um controle e um alimentado). Nesses momentos, esses peixes eram anestesiados e coletava-se o sangue e dados biométricos, como descrito na Etapa 1. Em seguida, os peixes foram sacrificados (por exposição prolongada à solução de benzocaína) para avaliação do conteúdo gástrico, confirmando-se se os peixes amostrados haviam se alimentado. Nenhum conteúdo foi observado no estômago dos peixes controles, enquanto que todos os peixes que receberam ração haviam se alimentado. A quantidade de ração ingerida não foi mensurada. O peso (g) dos peixes foi similar entre os grupos (ANOVA; $F_{(7;40)} = 0,56$; $P = 0,78$): Jejum, 15 min = $43,9 \pm 13,8$, 30 min = $48,9 \pm 14,9$, 1h

= $44,0 \pm 8,9$, 2h = $40,0 \pm 9,4$; Alimentado, 15 min = $44,2 \pm 14,1$, 30 min = $44,8 \pm 9,0$, 1h = $44,8 \pm 7,2$, 2h = $42,9 \pm 15,7$.

Os dados do presente experimento foram primeiramente transformados por raiz quadrada para normalização e aumentar a homocedasticidade. Em seguida, os dados foram comparados por teste t de Student (amostras independentes) para cada par de grupos (alimentados x jejum) em cada intervalo de tempo.

Resultados

Na figura 2 estão os dados médios de cortisol plasmático obtidos. Observa-se que os níveis plasmáticos de cortisol nos intervalos de tempo de 30 min e 1h foram estatisticamente maiores nos peixes alimentados quando comparado aos respectivos controles (Test t de Student para amostras independentes; P15 min = 0,30; P30 min < 0,01; P1h < 0,05; P2h = 0,98).

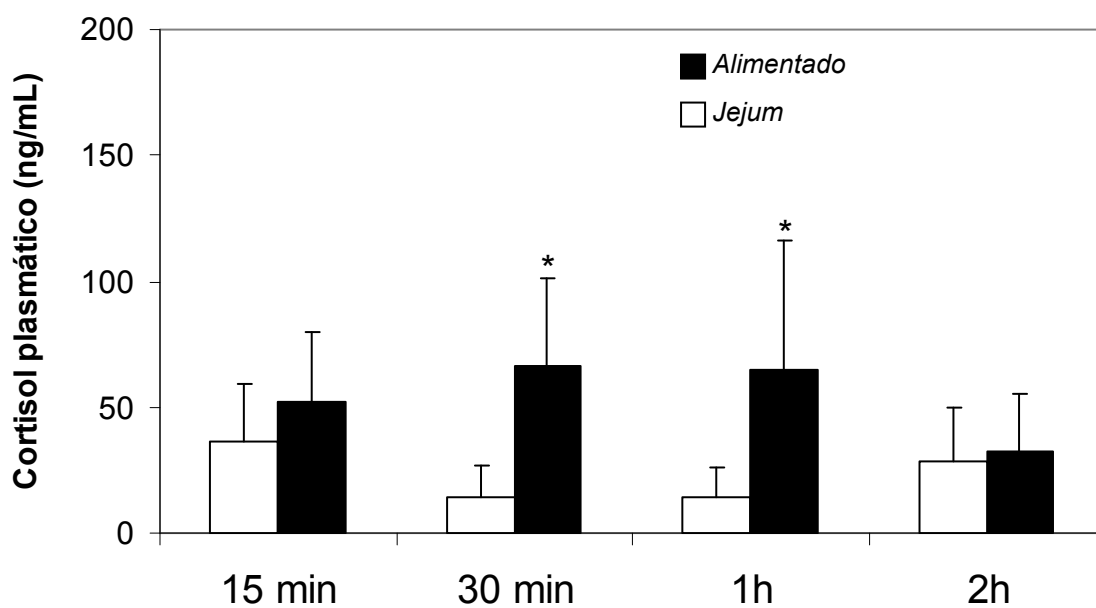


Figura 2. Evolução temporal dos níveis plasmáticos de cortisol em função da alimentação na tilápia-do-Nilo. Dados médios (\pm DP) de 6 animais em cada situação. * indica diferença estatística entre peixes alimentados e controles (jejum) para cada intervalo (Test t de Student para amostras independentes; $P_{15 \text{ min}} = 0,30$; $P_{30 \text{ min}} < 0,01$; $P_{1h} < 0,05$; $P_{2h} = 0,98$).

Etapa 3: Evolução temporal dos níveis de cortisol plasmático em função da alimentação na tilápia-do-Nilo em isolamento social.

Métodos

Utilizaram-se os mesmos procedimentos da Etapa 2, exceto que a avaliação temporal dos níveis plasmáticos de cortisol restringiu-se aos tempos de 30 min e 1 h após alimentação, uma vez que foram os momentos em que ocorreram efeitos significantes na Etapa anterior. Além disso, os animais foram estudados em isolamento social, em aquários de vidro (30 x 35 x 50,5 cm; ~ 53l) completamente isolados entre si e com aeração constante. O peso (g) dos peixes foi similar entre os grupos (ANOVA; $F_{(3;20)} = 0,71$; $P = 0,56$): Jejum, 30 min = $45,5 \pm 19,9$ e 1h = $48,6 \pm 17,3$; Alimentado, 30 min = $48,4 \pm 16,0$ e 1h = $45,3 \pm 19,3$.

O conteúdo gástrico também foi avaliado como descrito na Etapa 2, verificando-se que todos os animais do grupo alimentado haviam ingerido ração.

Resultados

O tratamento e análise dos dados foram como na etapa anterior e os dados estão expressos na figura 3. Observa-se que os níveis plasmáticos de

cortisol não foram estatisticamente diferentes comparando-se os peixes alimentados com os controles (30 min, $P = 0,53$; 1h, $P = 0,62$).

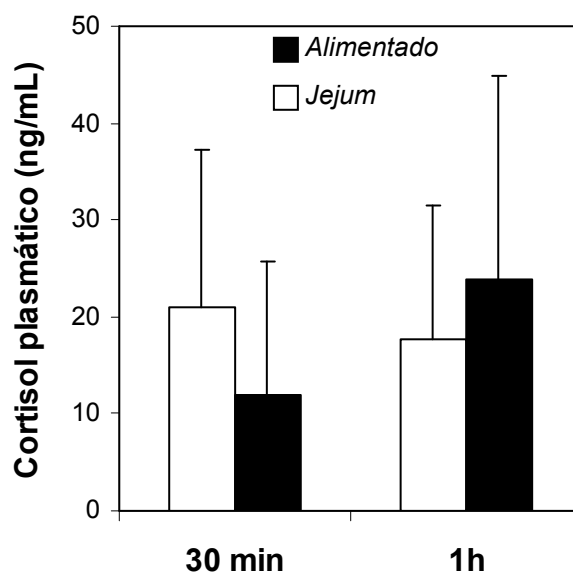


Figura 3. Evolução temporal dos níveis plasmáticos de cortisol em função da alimentação em tilápias-do-Nilo isoladas socialmente. Dados médios (\pm DP) de 6 peixes em cada caso. Nenhuma diferença estatística foi observada entre peixes alimentados e em jejum nos dois intervalos de tempo (Teste t de Student para amostras independentes; $P > 0.5$).

Etapa 4: condicionamento a EN não aversivo em tilápias-do-Nilo agrupadas

Métodos

Os procedimentos básicos foram iguais aos da Etapa 1 e o delineamento experimental está representado na Tabela 2. O EN neste caso foi a alimentação em grupo, que representava um estímulo não aversivo, porém com certo nível de estresse (Etapa 2) supostamente pela competição alimentar, visto que na Etapa 3 não houve tal estresse nos animais isolados. Sete animais foram amostrados de cada grupo e o peso (g) deles foram similares entre os grupos (ANOVA; $F_{(3;24)} = 0,17$; $P = 0,91$): Controle = $43,9 \pm 11,0$; EC = $45,4 \pm 7,0$; EN₁₁ = $41,0 \pm 6,6$; Condicionamento $43,5 \pm 18,1$.

Tabela 2. Delineamento experimental da Etapa 4.

Grupos Experimentais	Dias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Controle	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	s
EC*	ai	ai	ai	ai	ai	ai	ai	ai	ai	ai	ai	is
EN ₁₁	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	as
Condicionamento	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	ia	is

* Nesta condição o alimento não foi pareado com o EC (i).
s = coleta de sangue para análise dos níveis plasmáticos de cortisol.

i = interrupção da aeração.

a = alimento

n = 6 peixes aleatoriamente coletados de cada tanque.

No grupo controle, os peixes foram alimentados todos os dias, exceto no dia de amostragem de sangue, perfazendo um jejum prévio de ~ 24h. No grupo EC, a interrupção da aeração foi apresentada diariamente durante 10 dias consecutivos. No grupo EN₁₁, os peixes receberam o alimento diariamente, incluindo o dia da amostragem de sangue. No grupo condicionamento, os peixes foram condicionados por 10 dias (pareamento EC-EN) e o sangue amostrado no 11º dia após apresentação de apenas EC. No 11º dia, o sangue dos animais foi coletado no horário habitual da experimentação diária, sendo que nos grupos com presença de EC ou EN a coleta foi feita exatamente 30 min após a apresentação desses estímulos. Esse intervalo de 30 min para coleta de sangue foi baseado nas evidências da Etapa 2, que mostrou que era um tempo suficiente para as tilápias terem seus níveis de cortisol plasmático elevado após se alimentarem em grupo. O conteúdo gástrico também foi avaliado como descrito na Etapa 2, registrando-se que todos os animais que receberam alimento no 11º dia haviam-na ingerido.

Resultados

Após transformação dos dados como nas etapas anteriores, as médias entre os grupos foram comparadas por ANOVA, com comparação *a posteriori* pelo teste de Newman-Keuls. Na figura 4 estão mostrados os dados médios (\pm DP) obtidos, revelando que o cortisol plasmático foi significativamente elevado apenas no grupo EN₁₁ ($F_{(3;24)} = 3,42$; $P = 0,033$).

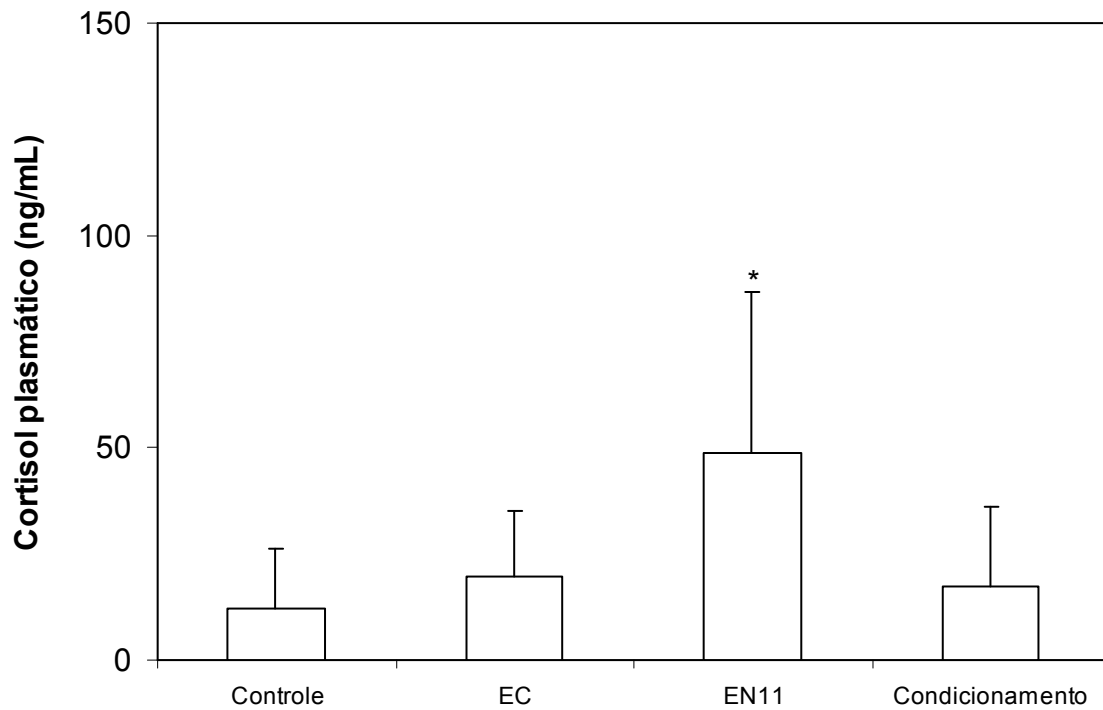


Figura 4. Resposta de cortisol plasmático na tilápia-do-Nilo a condicionamento pavloviano com EN não aversivo, mas estressante. * indica valor médio (\pm DP; $n = 7$) de cortisol plasmático diferente estatisticamente das médias dos demais grupos (ANOVA; $F_{(3;24)} = 3,42$; $P = 0,033$). Estímulo condicionado (EC) = Interrupção da aeração; estímulo não-condicionado (EN) = alimentação.

Discussão

O presente estudo mostrou que tilápias-do-Nilo também podem ser condicionadas a exibir uma RC (elevação dos níveis plasmáticos de cortisol) em resposta a um EC quando mantidas em grupo, assim como demonstrado previamente para tilápias isoladas socialmente (Moreira & Volpato, 2004). Além da tilápia-do-Nilo, esse tipo de RC em peixes agrupados foi também descrito em trutas arco-íris (Moreira et al., 2004). No presente estudo, os níveis de cortisol plasmático aumentaram significativamente quando apresentado o EC, interrupção da aeração, sem a necessidade da presença do EN (asfixia) após condicionamento de 10 dias (pareamento dos estímulos EC-EN). O EC utilizado claramente não foi estressor, pois não se observou elevação dos níveis de cortisol após o período de várias aplicações desse estímulo. Uma outra possibilidade é que o estressor presente durante o período de condicionamento elevasse cronicamente o estresse, de forma que os altos níveis de cortisol no dia de teste (11º dia) representassem esse estado e não fossem consequência do processo de condicionamento. No entanto, a resposta do grupo EN10 mostra que se o estressor não for aplicado no 11º dia a elevação do cortisol não aparece.

De acordo com isso, as tilápias-do-Nilo podem memorizar uma situação aversiva e apresentar resposta neuroendócrina antecipadamente a ela a partir de um sinal externo condicionado. Embora essa constatação revele a adequação do modelo de condicionamento adotado, a RC não ocorreu quando o EN foi o alimento.

Na figura 1 vê-se que o estímulo “parada da aeração” foi percebido pelas tilápias, uma vez que pôde ser condicionado à ocorrência da asfixia. Portanto, a ausência de condicionamento reportada na figura 4 (parada da aeração associada com alimentação) não pode ser explicada pelo tipo de EC usado. De forma similar, pode-se pensar que tal ausência de condicionamento decorra da ineficiência da alimentação em induzir elevação do cortisol. De fato, nos estudos mostrados nas figuras 2 e 3, observa-se que a alimentação eleva os níveis de cortisol plasmático apenas quando os peixes são alimentados em grupo. Ou seja, essa elevação do cortisol decorre do contexto da alimentação e não do alimento. Na alimentação em grupo pode ocorrer certo nível de estresse decorrente da competição alimentar. A ocorrência de competição alimentar na tilápia-do-Nilo durante a alimentação é bem reportada na literatura (veja Carrieri & Volpato, 1991; Volpato et al., 1989 e Volpato & Fernandes, 1994). Em outras espécies, essa competição promove estresse que tem sido mostrado em termos de elevação de cortisol em (Øverli et al., 1998). Assim, na figura 4 vê-se claramente que apenas a competição alimentar foi suficiente para elevar os níveis de cortisol plasmático nas tilápias, o que parece resultar do estresse social envolvido nesse contexto de alimentação. Os confrontos agonísticos são freqüentes nessas competições (Carrieri & Volpato, 1991), estressores bem documentados nesta (Fernandes & Volpato, 1993; Volpato & Fernandes, 1994; Alvarenga & Volpato, 1995; Barcellos et al., 1999; Corrêa et al., 2003; Merighe et al., 2004) e em outras espécies (Schreck, 1981; Sakakura & Tsukamoto, 1999; Sloman et al., 2000a,b,c, 2001; Pottinger & Carrick, 2001).

Mesmo que a competição alimentar induzida pela alimentação aos peixes em agrupamento seja um estressor, no presente estudo o estresse resultante não pôde ser condicionado (Figura 4). Uma explicação é que isso decorra do estressor (EN) ser mais fraco que aquele usado no experimento mostrado na figura 1, onde foi usado asfixia. Esta interpretação é corroborada quando se avalia a amplitude das elevações de cortisol registradas. No caso da asfixia, esse estímulo promoveu elevação média de cerca de 240 ng/mL (Figura 1, grupo EN₁₁), enquanto que na alimentação a elevação foi bem mais discreta (~ 50 ng/mL; Figura 4, grupo EN₁₁). Assim, pode-se assumir que a intensidade do estressor, aqui agindo como EC, tenha sido o fator primordial na modulação do condicionamento entre os dois estímulos testados, a asfixia e a alimentação em grupo. Isso está de acordo com o pressuposto de que a intensidade e o significado do EN para o animal são fatores importantes para o condicionamento (Alcock, 1997).

Cortisol prejudica memória na truta arco-íris

Introdução

Recentemente foi demonstrado que peixes são capazes de serem condicionados a exibir resposta de estresse como uma resposta condicionada (RC) em associação a um sinal não estressante quando se utiliza o paradigma clássico do condicionamento Pavloviano (Moreira & Volpato, 2004, na tilápia-do-Nilo e Moreira et al., 2004, em truta arco-íris). Esses resultados indicam que os peixes são capazes de ficarem estressados pela lembrança de experiências prévias estressantes. Nesses experimentos os peixes foram expostos a um sinal ambiental (EC – estímulo condicionado) pareado com um estressor (EN – estímulo não-condicionado). Após algumas seções de pareamento dos estímulos EC-EN, a exposição dos peixes apenas aos EC resulta em uma RC, no caso, elevação dos níveis plasmáticos de cortisol. Essa RC pode ser retida por algumas semanas na ausência de reforço (Moreira et al., 2004). Neste último estudo avaliou-se a extinção da RC em duas linhagens de truta arco-íris que divergem entre si quanto à reatividade ao estresse, em termos da magnitude dos níveis plasmáticos de cortisol. Esses autores observaram que as trutas que respondem ao estresse com baixa elevação dos níveis plasmáticos de cortisol retêm a RC por um período mais longo que as trutas que respondem ao estresse com alta elevação dos níveis de cortisol. Essa diferença nas funções cognitivas entre essas 2 linhagens de truta sugere que o cortisol possa estar modulando esse processo. De acordo com isso, pode-se supor que o cortisol prejudicaria a memória em peixes. Reforçando essa idéia, pode-se destacar que diversos resultados já obtidos em mamíferos indicam que níveis elevados de

corticosteróides ou exposição ao estresse prejudicam a memória desses animais (Dachir et al., 1993; Luine et al., 1993, 1994; Arbel et al., 1994; Bodnoff et al., 1995; Conrad et al., 1996; Krugers et al., 1997; Belanoff et al., 2001; Roozendaal et al., 2001; Roozendaal, 2003). De modo geral, a elevação nos níveis circulantes de corticoesteróides induz diminuição da retenção da memória, o que diretamente afeta a formação de memória de longo prazo (Roozendaal, 2003). Assim, no presente estudo foi avaliado se níveis circulantes de cortisol elevados cronicamente afetam a retenção da RC na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. A RC usada foi a resposta de estresse, que foi avaliada em termos de elevação do cortisol e glicose, parâmetros bem estabelecidos como indicadores do estresse em peixes (Barton, 2002).

O presente estudo foi conduzido em três diferentes etapas. Na primeira, uma vez que Moreira et al. (2004) utilizou trutas em agrupamentos sociais, procurou-se confirmar inicialmente se o mesmo tipo de condicionamento ocorria em trutas mantidas em isolamento social. Na segunda, a elevação crônica dos níveis plasmáticos de cortisol foi realizada por implantação intra-peritoneal de uma fonte exógena de cortisol, determinando-se a concentração de cortisol adequada para elevar esse hormônio por tempo suficiente para a condução do estudo de condicionamento. A concentração adequada foi considerada a que permitia a elevação plasmática de cortisol frente ao estressor, mesmo com a linha basal desse hormônio já elevada pela aplicação exógena. Na última fase, testou-se o efeito do cortisol na RC, com o implante de cortisol feito antes do período de condicionamento (pareamento entre os estímulos EC-EN).

Etapa 1: condicionamento de estresse em trutas arco-íris em isolamento social.

O objetivo desta etapa foi avaliar se trutas mantidas socialmente isoladas apresentam resposta de estresse como RC. Um total de quatro experimentos foi realizado até se chegar a um modelo adequado.

Experimento 1

Métodos e resultados

Trinta trutas arco-íris provindas do estoque do CEH (Centre for Ecology and Hydrology, Windermere, Inglaterra), peso médio de 478,1 g \pm 80,2 g, comprimento total de 33,2 cm \pm 2,3 cm, sexualmente imaturas, de ambos os sexos e idade de 2 anos, foram mantidas em isolamento social em aquários de vidro (30 cm x 30 cm x 50 cm). Cada aquário recebia fluxo constante (10 l/min) de água do lago Windermere, U.K. A iluminação dos aquários foi com lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia, com fotoperíodo das 06:00 h às 18:00 h. Todos os lados verticais dos aquários foram cobertos com cartolina branca de modo que os peixes não tivessem contato visual com o pesquisador e com os outros peixes, evitando a associação do EN com outros estímulos além do EC proposto. Antes da experimentação os peixes foram alimentados três vezes por semana. Dez dias foram dados aos peixes para ajustarem-se a essas condições dos aquários experimentais. Após isso, o EC foi pareado por 10 dias com o estressor, confinamento por

restrição de espaço (EN). Então, no 11^o dia se avaliou se o EC era capaz de induzir uma resposta de estresse sem a presença do EN. O EC usado foi o ligar da aeração por 1 min. O EN consistiu de um período de 30 min de confinamento por restrição de espaço, realizado pelo abaixamento de uma tela que tornava impossível ao peixe transpô-la, limitando sua movimentação a 10 cm de altura do espaço do aquário a partir do fundo.

Cinco tratamentos foram realizados (n = 6 peixes cada): 1) controle, sem manipulação ou estresse imposto aos peixes; 2) EC, o sinal (ligar a aeração por 1 min) foi apresentado diariamente durante 10 dias consecutivos; 3) EN₁₀, os peixes foram confinados diariamente, exceto no 11^o dia (coleta de sangue); 4) EN₁₁, os peixes eram confinados diariamente incluindo o dia da coleta de sangue; 5) condicionamento, os peixes foram condicionados por 10 dias (pareamento EC-EN).

No 11^o dia foi feita a coleta de sangue dos animais, de acordo com as respectivas condições experimentais. Assim, nesse dia o EC era apresentado no grupo condicionamento sem a imposição do confinamento (EN). O grupo EC também recebia o sinal da aeração. Exatamente 30 min após a apresentação desse sinal o sangue dos peixes era amostrado nos grupos EC e armazenado. Os grupos EN e controle não recebiam a imposição de qualquer manipulação ou estresse, enquanto que os peixes do grupo EN₁₁ foram amostrados imediatamente após a imposição do EN. Para a coleta de sangue, os peixes foram capturados com uma rede e imediatamente transferidos para baldes contendo anestésico (2-fenoxietanol, 10 mL/ 5L de água). Após sedação completa, o sangue foi coletado por punção no sino branquial utilizando-se seringas heparinizadas. Após esse procedimento, o

peso e o comprimento dos peixes foram aferidos e então os peixes foram sacrificados por contusão cefálica para determinação do sexo. Após centrifugar o sangue a 3500 rpm durante 5 min, o plasma foi coletado e mantido congelado até o momento das análises laboratoriais a - 70°C.

Os dados do presente experimento foram comparados utilizando-se teste de ANOVA para experimentos completamente casualizados. Na figura 1 estão representados os dados médios (\pm DP) obtidos. Nenhuma diferença estatística foi observada para os níveis plasmáticos de cortisol entre os grupos experimentais ($F_{(4;25)} = 0.799$; $P = 0,537$).

O presente resultado indica que o EN utilizado não foi eficiente para induzir elevação dos níveis plasmáticos de cortisol. Dessa forma, qualquer associação entre EC e EN não pode ter sido detectada ao avaliarem-se os níveis plasmáticos de cortisol. Baseado nesses dados, um novo experimento foi delineado procurando-se testar um outro estressor (EN) para a indução do estresse.

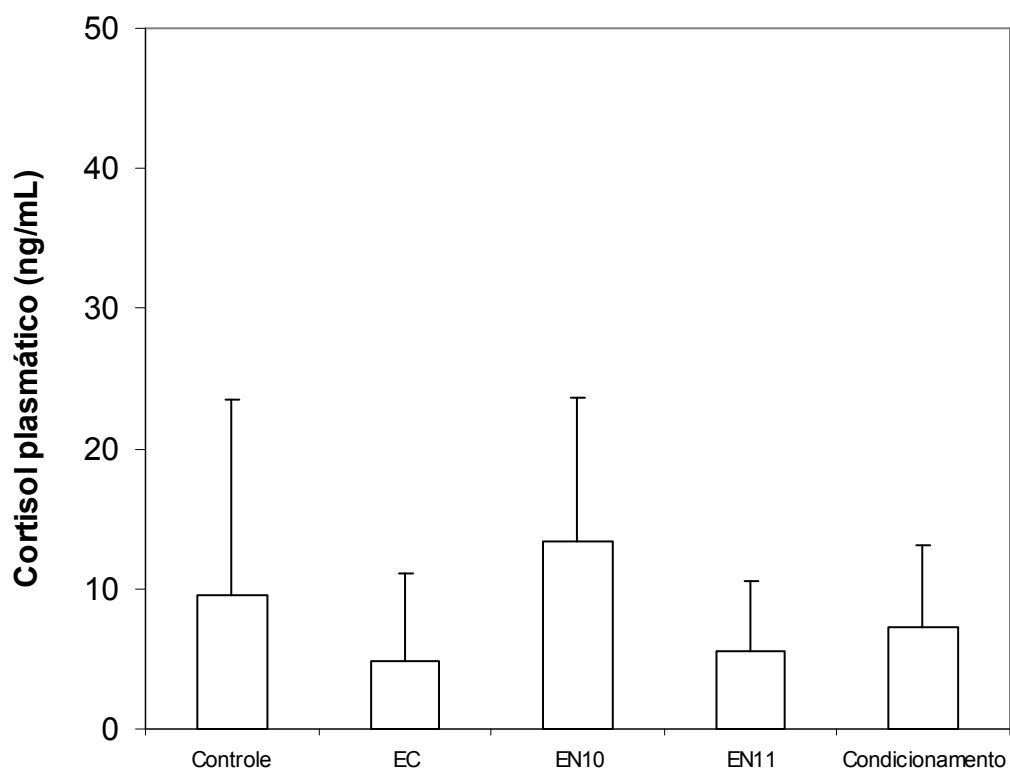


Figura 1. Resposta de estresse condicionada na truta arco-íris. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os valores médios (\pm DP) dos diferentes tratamentos (ANOVA; $F_{(4;25)} = 0.799$; $P = 0,537$). Estímulo condicionado (EC) = ligar aeração; estímulo não-condicionado (EN) = confinamento.

Experimento 2

Métodos e resultados

Trinta trutas arco-íris providas do estoque do CEH, peso médio de 481,3 g \pm 67,3 g, comprimento total médio de 33,6 cm \pm 1,2 cm, sexualmente imaturas, de ambos os sexos e idade de 2 anos, foram alojadas em tanques de fibra de plástico opaco (70 cm x 40 cm x 40 cm) situados exteriormente ao laboratório. Cada tanque recebia fluxo constante de 10L/min de água do lago Windermere (Inglaterra); possuía uma tampa evitando qualquer contato dos peixes com o pesquisador, evitando a associação do EN com outros estímulos além do EC e estava submetido a iluminação natural. Antes da experimentação, os peixes foram alimentados três vezes por semana. Dez dias foram dados aos peixes para ajustarem-se às condições dos tanques experimentais. Após isso, o EC foi pareado com o estressor, confinamento por restrição de espaço pela diminuição do nível de água do tanque (EN), durante 15 dias consecutivos. Então, no 16^o dia avaliou-se se o EC era capaz de induzir uma resposta de estresse sem a presença do EN. O período de condicionamento foi estendido para aumentar a possibilidade do aprendizado da associação EC-EN. O EC foi alterado também, substituindo-se o ligar da aeração por 1 min pela interrupção por 5 min do fluxo de água que entrava no tanque. Essa alteração foi necessária, pois o experimento estava sendo conduzido em tanques externos, o que dificultaria a automatização com sistemas elétricos. Esse novo EC foi o mesmo utilizado com sucesso para condicionar as trutas em cardumes (para detalhes ver Moreira et al., 2004). O EN foi um período de 30 min de confinamento por restrição de espaço,

realizado pela diminuição do nível de água do tanque, de ~ 25 cm até ~ 2 cm de profundidade, produzida rapidamente pela liberação da água pelo cano de escoamento ($\varnothing = 5$ cm).

Cinco tratamentos foram realizados (n = 6 peixes cada): 1) controle, sem manipulação ou estresse foi imposto aos peixes; 2) EC, o sinal (interrupção do fluxo de água que entrava no tanque) foi apresentado diariamente durante 15 dias consecutivos; 3) EN₁₀, os peixes foram confinados diariamente exceto no dia da coleta de sangue; 4) EN₁₁, os peixes foram confinados diariamente incluindo o dia da coleta de sangue; 5) condicionamento, os peixes foram condicionados por 15 dias (pareamento EC-EN).

No 16^o dia foi feita a coleta de sangue dos animais, de acordo com as respectivas condições experimentais. Assim, nesse dia o EC era apresentado no grupo condicionamento sem a imposição do confinamento (EN). O grupo EC também recebia o sinal. Exatamente 30 min após a apresentação do sinal, o sangue dos peixes era amostrado em ambos os grupos EC e condicionamento. Os grupos EN₁₀ e controle não recebiam a imposição de qualquer manipulação ou estresse. Já os peixes do grupo EN₁₁ foram amostrados imediatamente após a imposição do confinamento.

Para a coleta de sangue, os peixes foram capturados com uma rede e imediatamente transferidos para um balde contendo anestésico (2-fenoxietanol, 10 mL/ 5L de água). Após sedação completa o sangue foi coletado por punção no sino branquial utilizando-se seringas heparinizadas. Após esse procedimento, o peso e o comprimento dos peixes foram aferidos e então os peixes eram sacrificados por contusão cefálica para determinação

do sexo. Após centrifugar o sangue a 3500 rpm durante 5 min, o plasma foi coletado e mantido congelado (-70°C) até o momento das análises laboratoriais.

Os dados do presente experimento foram comparados utilizando-se teste de ANOVA para experimentos completamente casualizados, complementado por teste HSD de Tukey. Na figura 2 estão representados os dados médios de cortisol plasmático, dos quais o grupo EN₁₁ foi estatisticamente maior quando comparado com os níveis dos outros grupos remanescentes que, por sua vez, foram estatisticamente similares entre si ($F_{(4;25)} = 23,35; P < 0,0001$).

O presente resultado mostra que o EN utilizado foi eficiente para elevar os níveis plasmáticos de cortisol, corrigindo o problema surgido no experimento 1. Entretanto, o aprendizado da associação entre EC-EN não se mostrou evidente. Apesar do EC utilizado, interrupção da entrada do fluxo de água no tanque, ter sido eficiente no estudo previamente realizado por Moreira et al. (2004) em cardumes de truta, no presente experimento utilizando-se trutas isoladas tal sinal não foi eficaz. No estudo de Moreira et al. (2004), a interrupção no fluxo de água pode não ter funcionado como um sinal direto. Por exemplo, ao interromper o fluxo de água as trutas que nadavam contra a correnteza no tanque perdiam a formação de cardume. Então, é possível que a perda dessa formação de grupo tenha sido o EC. Essa possibilidade explicaria porque as trutas em isolamento não aprenderam a associação de estímulos proposta (EC-EN). Baseado nessa suposição, um novo experimento foi delineado utilizando um sinal (EC) admitido como mais evidente para as trutas.

Experimento 3

Métodos e resultados

Dezoito trutas arco-íris providas do estoque do CEH, peso médio de 490,7 g \pm 89,1 g, comprimento total de 34,8 cm \pm 1,4 cm, sexualmente imaturas, de ambos os sexos e idade de 2 anos, foram alojadas nos tanques experimentais, em condições similares às do experimento anterior. Antes da experimentação os peixes foram alimentados três vezes por semana. Dez dias foram dados aos peixes para ajustarem-se às condições dos tanques experimentais. Os peixes foram submetidos a procedimentos de condicionamento similares aos descritos no experimento anterior. Contudo, o período de condicionamento utilizado foi reduzido para 10 dias. O novo EC utilizado foi a emissão de um jato d'água através de uma pequena abertura circular na superfície da tampa ($\varnothing = 3$ cm) em direção à superfície d'água do tanque durante 15 s.

Neste experimento, apenas três tratamentos foram realizados (n = 6 cada): 1) EC, o sinal (jato d'água) foi apresentado diariamente durante 10 dias consecutivos e no 11^o dia o sangue era amostrado 30 min após a apresentação desse sinal; 2) condicionamento 30, os peixes foram condicionados por 10 dias (pareamento EC-EN) e no 11^o o EC era apresentado sem a imposição do confinamento (EN) aos peixes desse grupo e exatamente 30 min após a apresentação do sinal o sangue dos peixes era amostrado; 3) condicionamento 60, os procedimentos foram similares aos do grupo anterior, porém o sangue dos peixes foi coletado 60 min após a apresentação do sinal. Neste experimento os níveis de cortisol foram

avaliados 30 e 60 min após a apresentação do sinal porque se aventou a possibilidade da resposta das trutas ao EC ter pico em um momento diferente de quando o estressor está realmente presente. Os procedimentos para coleta de sangue, processamento das amostras, biometria e sexagem dos animais foram como os descritos para o experimento 2.

Os dados do presente experimento foram comparados utilizando-se teste de ANOVA para experimentos completamente casualizados, complementado por teste HSD de Tukey. Na figura 3 estão representados os dados médios de cortisol plasmático. A resposta no grupo condicionamento 30 foi estatisticamente maior que a do grupo EC e similar ao do grupo condicionamento 60; além disso, esses dois últimos grupos foram estatisticamente similares entre si ($F_{(2;15)} = 4,24$; $P = 0,035$).

O presente resultado é sugestivo de que ocorra o condicionamento pela associação entre EC-EN, sendo o melhor momento para avaliar essa resposta 30 min após a apresentação do EC. Com base nisso, para melhor avaliar esse modelo de condicionamento na truta arco-íris um novo experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento completo (similar ao experimento 2), contendo todos os controles necessários.

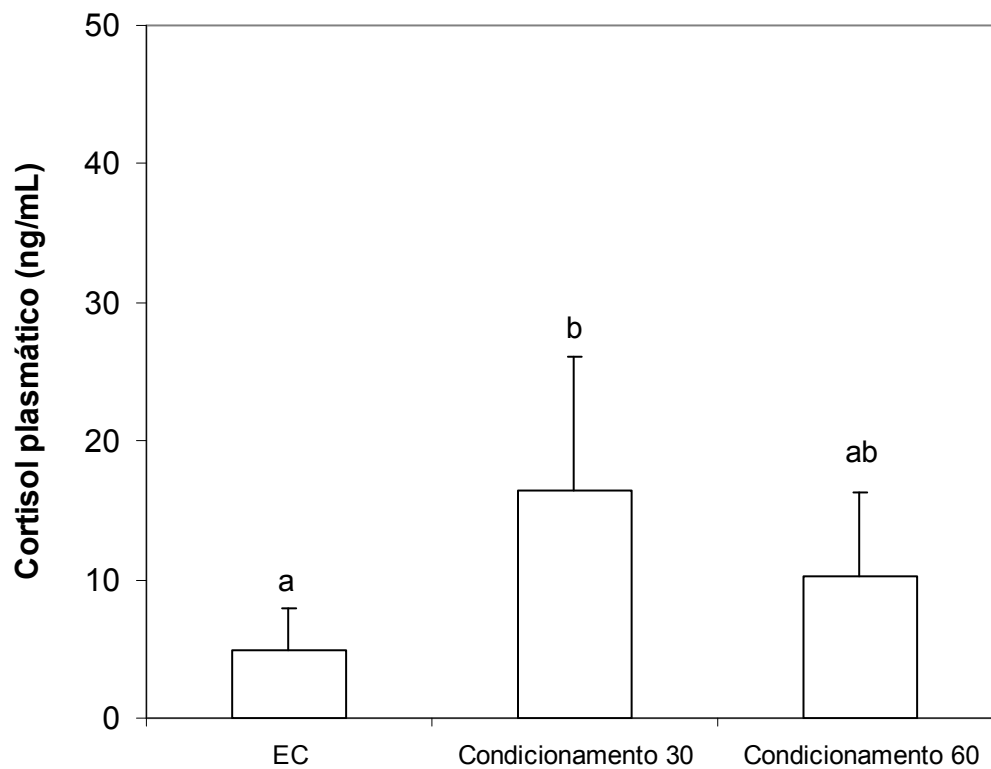


Figura 3. Resposta de estresse condicionada na truta arco-íris. Valores médios (\pm DP) que não compartilham uma mesma letra são estatisticamente diferentes (ANOVA; $F_{(2;15)} = 4,24$; $P = 0,035$). Estímulo condicionado (EC) = jato d'água; estímulo não-condicionado (EN) = confinamento.

Experimento 4

Métodos e resultados

Trinta trutas arco-íris providas do estoque do CEH, peso de $500,9 \text{ g} \pm 88,2 \text{ g}$, comprimento total de $34,7 \text{ cm} \pm 1,8 \text{ cm}$, sexualmente imaturas, de ambos os sexos e idade de 2 anos, foram alojadas nos tanques experimentais, em condições similares às do experimento 2. Antes da experimentação os peixes foram alimentados 3 vezes por semana. Dez dias foram dados aos peixes para ajustarem-se às condições dos tanques experimentais. O delineamento experimental foi também similar ao do experimento 2, mas os procedimentos utilizados para o condicionamento (EC, EN e dias de pareamento entre EC e EN) foram iguais aos do experimento 3. Os procedimentos para coleta de sangue, processamento das amostras, biometria e sexagem dos animais foram similares aos descritos para o experimento 2. Porém, neste caso, além do cortisol foi também quantificada a glicose plasmática nos animais (Método de Trinder, 1969).

Os dados do presente experimento foram comparados utilizando-se teste de ANOVA para experimentos completamente casualizados, complementado por teste HSD de Tukey. Os níveis médios de cortisol plasmático dos grupos EN₁₁ e Condicionamento foram iguais entre si e maiores quando comparado com os níveis dos demais grupos que, por sua vez, foram estatisticamente similares entre si (Figura 4; $F_{(4;24)} = 15,37$; $P < 0,0001$). Nenhuma diferença estatística foi observada quando considerados os níveis plasmáticos de glicose (Figura 5; $F_{(4;25)} = 1,199$; $P = 0,34$).

Esses resultados confirmam que o EC utilizado não foi um estressor por si só, mas que evocou a RC após período de condicionamento (pareamento entre EC-EN). Porém, tal efeito ocorreu apenas na quantificação do cortisol plasmático, mas não da glicose sangüínea. Assim, confirma-se que o modelo testado para condicionamento pavloviano nas trutas arco-íris em isolamento social foi adequado, como previamente demonstrado para o peixe tilápia-do-Nilo (Moreira & Volpato, 2004). Com isso, pode-se seguir a investigação para se avaliar a participação dos níveis de cortisol na memória da truta arco-íris. A seguir, procurou-se determinar a concentração adequada de cortisol exógeno a ser implantado nos peixes.

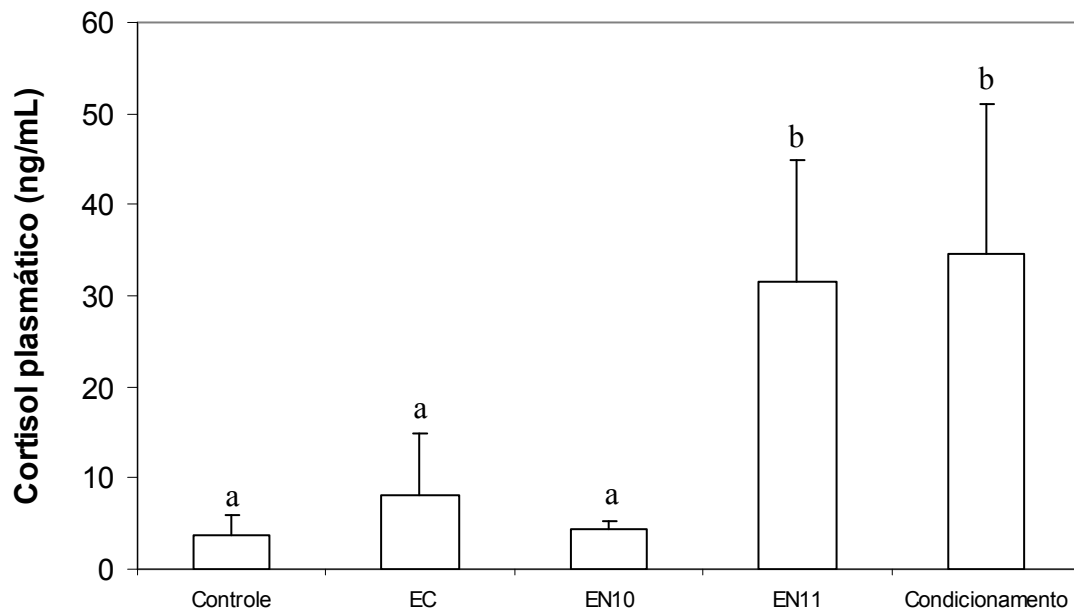


Figura 4. Resposta de estresse condicionada na truta arco-íris. Valores médios (\pm DP) de cortisol plasmática que não compartilham uma mesma letra são estatisticamente diferentes (ANOVA; $F_{(4;25)} = 15.37$; $P < 0,0001$). Estímulo condicionado (EC) = jato d'água; estímulo não-condicionado (EN) = confinamento.

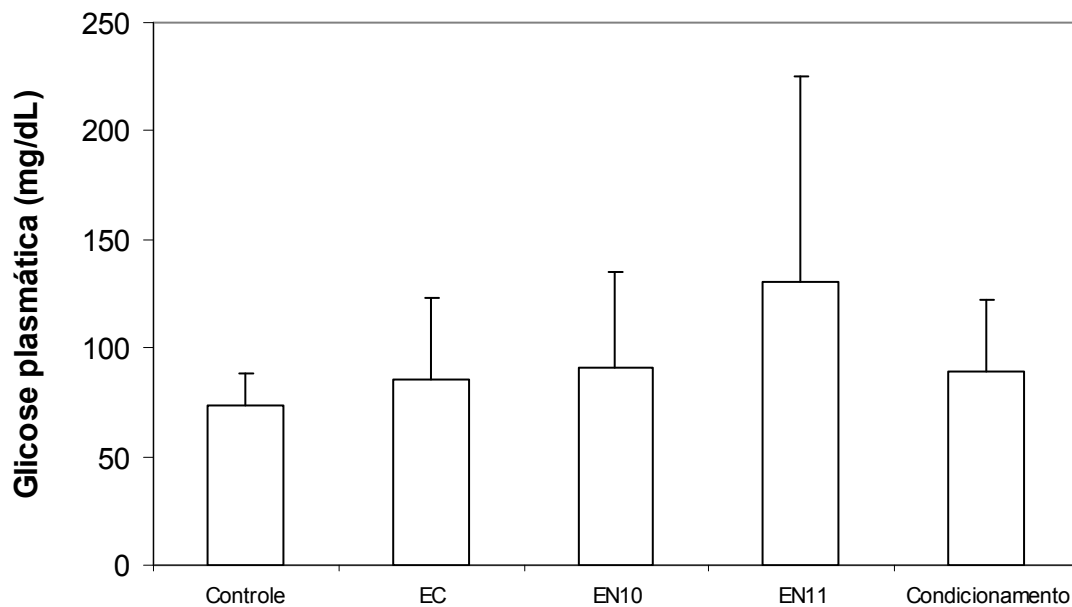


Figura 5. Resposta de estresse condicionada na truta arco-íris. Os valores médios (\pm DP) de glicose plasmática não foram estatisticamente diferentes (ANOVA; $F_{(4;24)} = 1,199$; $P = 0,34$).

Etapa 2: testando o implante de cortisol

Nesta etapa foi avaliada a concentração de cortisol ideal a ser implantada nas trutas para futuros testes do efeito da elevação crônica dos níveis plasmáticos de cortisol na RC. A concentração adequada foi considerada aquela que permitiu detectar resposta de estresse nos peixes, em termos de elevação plasmática de cortisol, mesmo que esses já possuíssem a linha basal dos níveis plasmáticos de cortisol elevada. Um total de dois experimentos foi realizado até obtermos uma concentração adequada. A estratégia básica desses experimentos foi implantar intra-peritonealmente o cortisol nos peixes e avaliar semanalmente os níveis de cortisol basais e após confinamento.

Num primeiro experimento, observou-se que nas concentrações utilizadas (30, 60 ou 120 mg de hidrocortisona/mL de óleo de coco) houve desenvolvimento de doenças e alta mortalidade, o que sugere estado de imunossupressão, uma característica dos efeitos crônicos do cortisol (Barton, 2002). Além disso, a reatividade do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal não foi evidente, não estando de acordo com as características necessárias para os implantes, como dito anteriormente. As concentrações utilizadas foram demasiadamente elevadas para serem utilizadas nos outros testes e um novo estudo para determinação da concentração ideal do implante foi necessário. A seguir serão relatados apenas os resultados do teste do implante que foi bem sucedido.

Métodos e resultados

Foram utilizadas 33 trutas arco-íris providas do estoque do CEH, peso de 519,4 g \pm 124,9 g, comprimento total 35,8 cm \pm 2,4 cm, sexualmente imaturas, de ambos os sexos e idade de 2 anos. Vinte e sete dessas trutas receberam cortisol exógeno (n = 21) ou veículo (Sham, n = 6) e as demais permaneceram sem implante. Todas foram alojadas nos tanques experimentais em condições iguais às utilizadas na Etapa 1.

A fonte de cortisol exógena foi obtida misturando-se a quantidade desejada de hidrocortisona (sigma, CAS# 50-23-7) em óleo de coco (veículo; sigma, CAS# 8001-31-8). Três diferentes concentrações de cortisol foram testadas (n = 7 peixes cada): 4 mg/mL, 8 mg/mL e 16 mg/mL. No grupo Sham os peixes receberam 1 mL de veículo (óleo de coco). Para a implantação, os peixes foram previamente anestesiados (2-fenoxietanol, 10 mL/ 5L de água) e 1 mL da solução de cortisol foi aplicado através de uma pequena incisão abdominal. Os procedimentos para coleta de sangue e estocagem do plasma e aferição das medidas biométricas e sexagem foram como descrito na Etapa 1.

Os níveis basais de cortisol e glicose entre os diferentes tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA. Os níveis plasmáticos de cortisol induzidos pela implantação foram primeiramente avaliados no 8^o dia após a implantação. Tais valores estão na Figura 6 e mostram que apenas o grupo 16 mg/mL forneceu uma concentração plasmática de cortisol estatisticamente maior que a dos controles (Kruskal-Wallis ANOVA; P < 0,05).

Baseado nisso, apenas para os tratamentos controle, sham e 16 mg/mL continuaram a ser avaliados no 14^o, 21^o e 29^o dias após a implantação, quando avaliou-se também os níveis de glicose. Nesse seguimento, para se avaliar se os peixes implantados com cortisol (16 mg/mL) permaneciam reativos em termos de elevação do cortisol plasmático frente a estressor, os peixes dos grupos Sham e 16 mg/mL foram expostos ao mesmo estressor (baixamento da água do tanque), como usado no condicionamento da Etapa 1 (experimentos 2, 3 e 4). Após coleta de sangue para os valores basais, os peixes recebiam esse estressor e 30 min após nova coleta de sangue era realizada.

As figuras 7 e 8 mostram, respectivamente, os valores basais de cortisol e glicose obtidos ao longo do tempo. Nota-se que o cortisol plasmático continuou mais elevado no grupo 16 mg/mL. No caso da glicose, houve uma tendência de elevação progressiva ao longo do tempo no tratamento 16 mg/mL, sendo significativamente maior que os outros dois grupos apenas no 29^o dia após a implantação.

A resposta ao confinamento nos grupos estudados está expressa na figura 9. No caso dos níveis de cortisol ou glicose antes e após confinamento os tratamentos foram comparados utilizando-se teste de Wilcoxon, enquanto que os níveis basais desses parâmetros entre os grupos Sham e 16 mg/mL foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. Observa-se que o confinamento induziu elevação dos níveis de cortisol e glicose em comparação à situação pré-exposição ao estressor para ambos os tratamentos em todos os dias de amostragem, exceto para os níveis de cortisol do tratamento 16 mg/mL no 21^o dia. Considerando essa exceção do

21º dia, elaborou-se análise de “cut-off” para os valores de cortisol, conforme descrito em Moreira et al. (2004), classificando-se individualmente os peixes como “estressados” ou “não stressados”. Dessa análise, constatou-se que a relação “estressados”：“não stressados” foi de 6:1, 5:2 e 6:1, respectivamente nos dias 14, 21 e 29.

No conjunto, os resultados indicam que o implante de 16 mg/mL não aboliu a reatividade do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal ao estresse. Assim, considerou-se essa concentração de implante adequada para o teste dos efeitos de cortisol na RC em trutas arco-íris, o que foi feito no experimento a seguir.

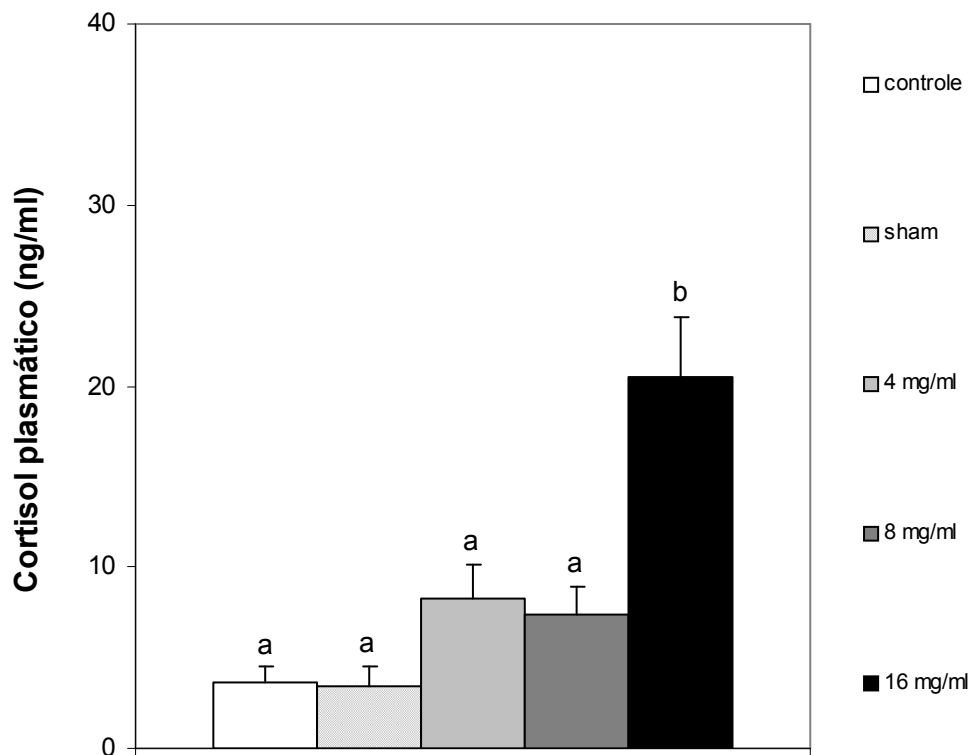


Figura 6. Efeito de implante de hidrocortisona nos níveis plasmáticos de cortisol na truta arco-íris 8 dias após aplicação desse implante. Valores médios (\pm DP) de cortisol plasmático que não compartilham uma mesma letra são estatisticamente diferentes (Kruskal-Wallis ANOVA; $P < 0,05$).

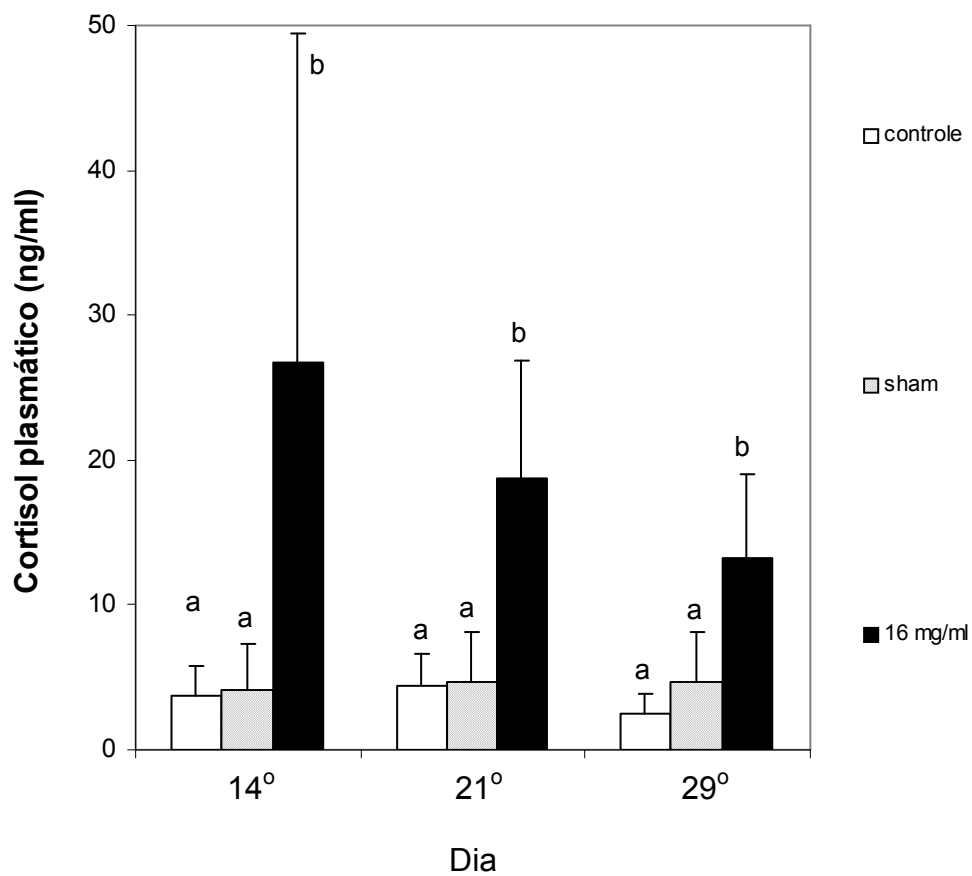


Figura 7. Efeito de implante de hidrocortisona nos níveis plasmáticos de cortisol na truta Arco-íris. Valores médios (\pm DP) de cortisol plasmático que não compartilham uma mesma letra são estatisticamente diferentes (Kruskal-Wallis ANOVA; $P < 0,05$).

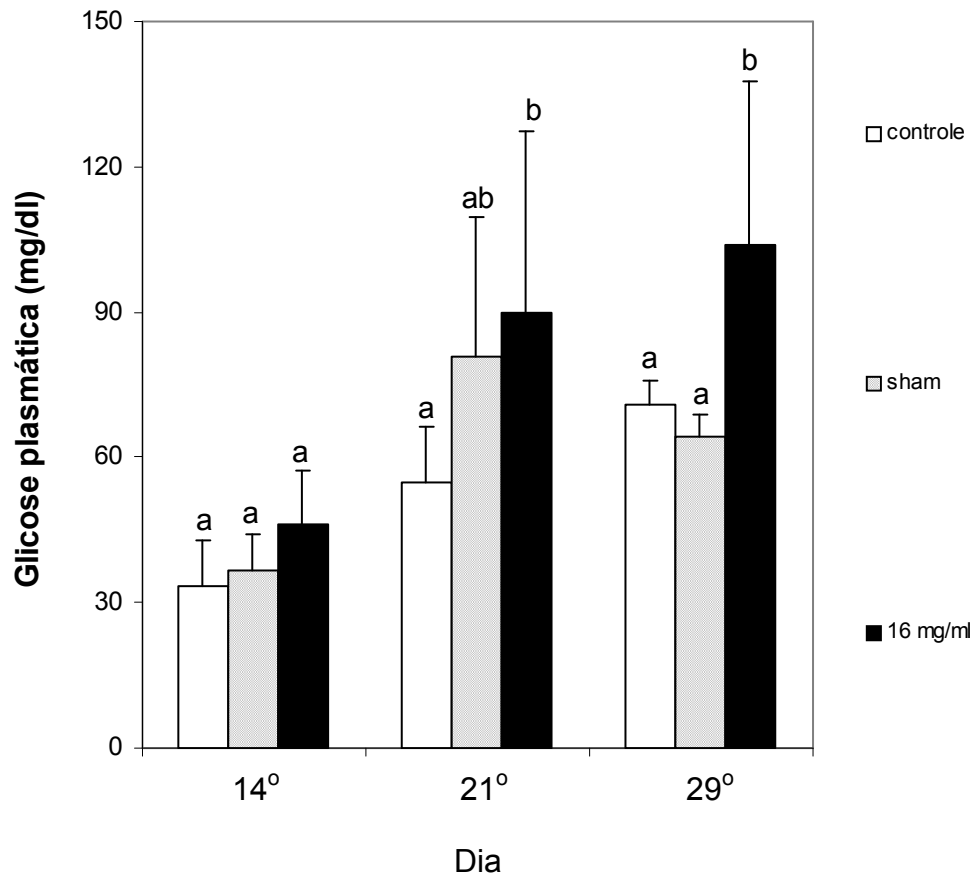


Figura 8. Efeito de implante de hidrocortisona nos níveis plasmáticos basais de glicose na truta arco-íris. Valores médios (\pm DP) de glicose plasmática que não compartilham uma mesma letra são estatisticamente diferentes (Kruskal-Wallis ANOVA; $P < 0,05$).

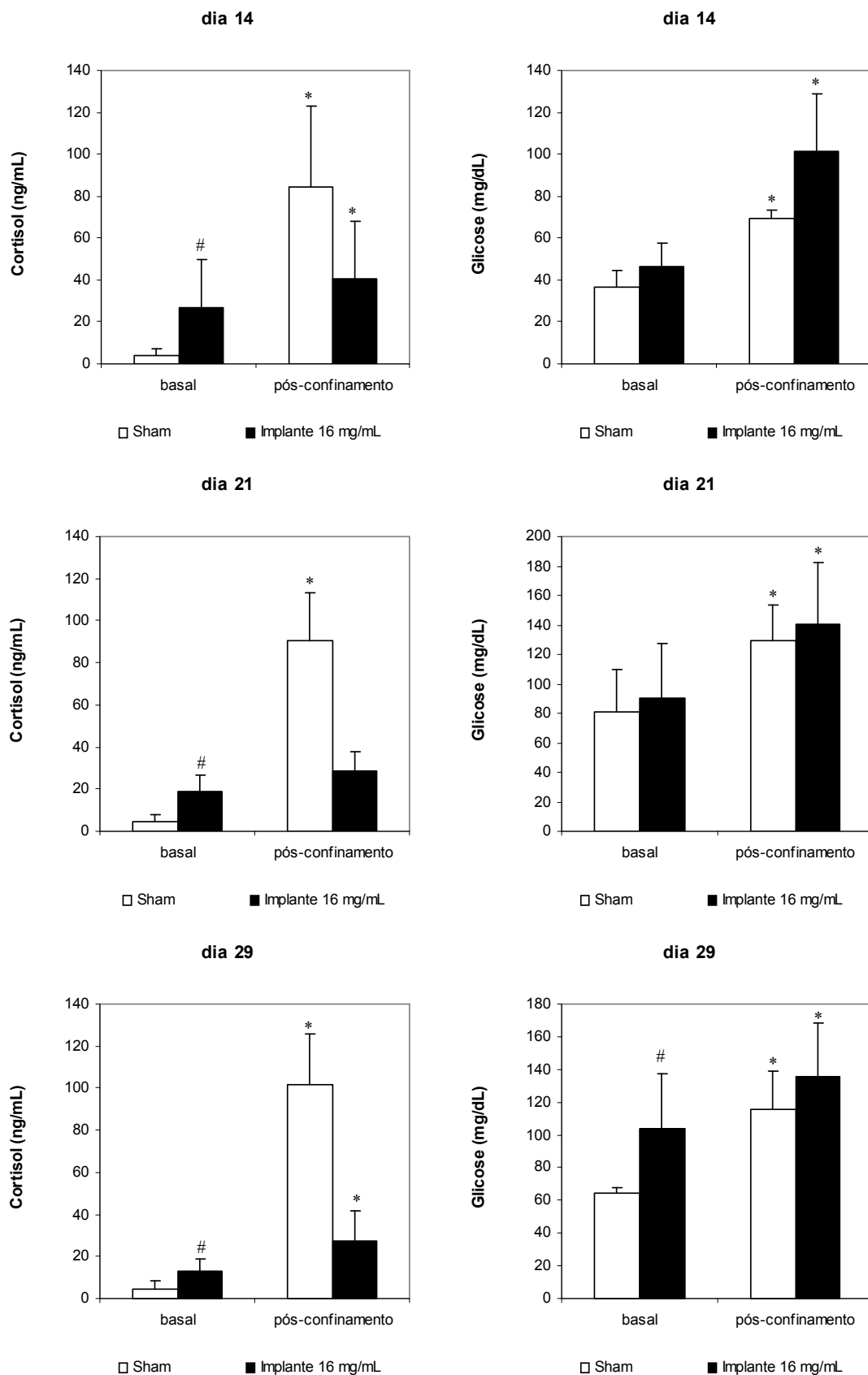


Figura 9. Valores médios (\pm DP) de glicose e cortisol plasmático em resposta ao estresse em truta arco-íris implantada ou não com hidrocortisona.

* $P < 0,05$, Teste de Wilcoxon; # $P < 0,05$, Teste U de Mann-Whitney.

Etapa 3: efeitos do cortisol na resposta de estresse condicionada em trutas arco-íris

Métodos e resultados

Trinta trutas arco-íris providas do estoque do CEH, peso médio de 553,1 g \pm 119,2 g, comprimento total de 37,1 cm \pm 2,1 cm, sexualmente imaturas, de ambos os sexos e idade de 2 anos, foram alojadas conforme descrito na Etapa 1.

Basicamente, foram repetidos os mesmos procedimentos realizados no experimento 4 da Etapa 1 para o condicionamento, mantendo-se o mesmo EC e EN e o mesmo tempo de condicionamento (10 dias). Quatro tratamentos experimentais foram conduzidos (n = 8 peixes cada): 1) Controle Sham, os peixes receberam o implante sham (apenas o veículo – óleo de coco) e não foram condicionados; 2) Controle Cortisol, os peixes receberam o implante de 16 mg/mL de cortisol e também não foram condicionados; 3) Condicionamento Sham, os peixes receberam o implante sham e foram submetidos a 10 dias de condicionamento; 4) Condicionamento Cortisol, peixes implantados com 16 mg/mL de cortisol foram submetidos a 10 dias de condicionamento. O sangue de todos os peixes foi amostrado no primeiro dia após o término do condicionamento (no 11^o dia) e posteriormente no 5^o, 9^o, 13^o, 21^o, 27^o e 35^o dias. Como realizado no experimento 4 da etapa 1, após o condicionamento o EC era apresentado sem a imposição do confinamento (EN) aos peixes dos grupos com condicionamento (Condicionamento Sham e

Condicionamento Cortisol) e o sangue coletado exatamente 30 min após a apresentação desse sinal. Os procedimentos para coleta de sangue e estocagem do plasma e aferição das medidas biométricas e sexagem foram como descrito na Etapa 1.

Os resultados de cortisol plasmático estão apresentados na figura 10. Como os grupos implantados com cortisol apresentavam valores basais maiores que as condições Sham (estratégia metodológica para avaliar o efeito do cortisol na memória), a análise da RC não pode ser feita pela comparação da magnitude dos grupos condicionados (Condicionamento Sham x Condicionamento Cortisol). Nesse caso, a análise contemplou apenas a existência ou não do condicionamento em cada grupo. Para essa constatação, cada um deles foi comparado com o respectivo controle: Condicionamento Sham x Controle Sham e Condicionamento Cortisol x Controle Cortisol. Todas essas comparações foram feitas pelo teste t de Student para amostras independentes.

Observou-se que durante a experimentação os níveis basais do controle cortisol foram sempre estatisticamente maiores que os níveis do controle sham (figura 10). Isso confirma que o implante forneceu eficientemente uma condição basal de cortisol diferente entre os tratamentos. Os níveis de cortisol para ambos os grupos condicionados foram estatisticamente maiores que seus respectivos controles na amostragem do 1º dia após o período de condicionamento, indicando a RC em ambas as condições. Embora os níveis de cortisol do grupo condicionamento sham tenham continuado maiores em relação a seu controle até a última amostragem (no 35º dia após o período de condicionamento), no grupo

cortisol a RC não ocorreu a partir da segunda amostragem (5º dia após o condicionamento).

Quanto à glicose plasmática, nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos ao longo do experimento (Figura 11). Ou seja, assim como observado no experimento 4 da etapa 1, esta não foi detectada como resposta de estresse em termos de RC em trutas arco-íris.

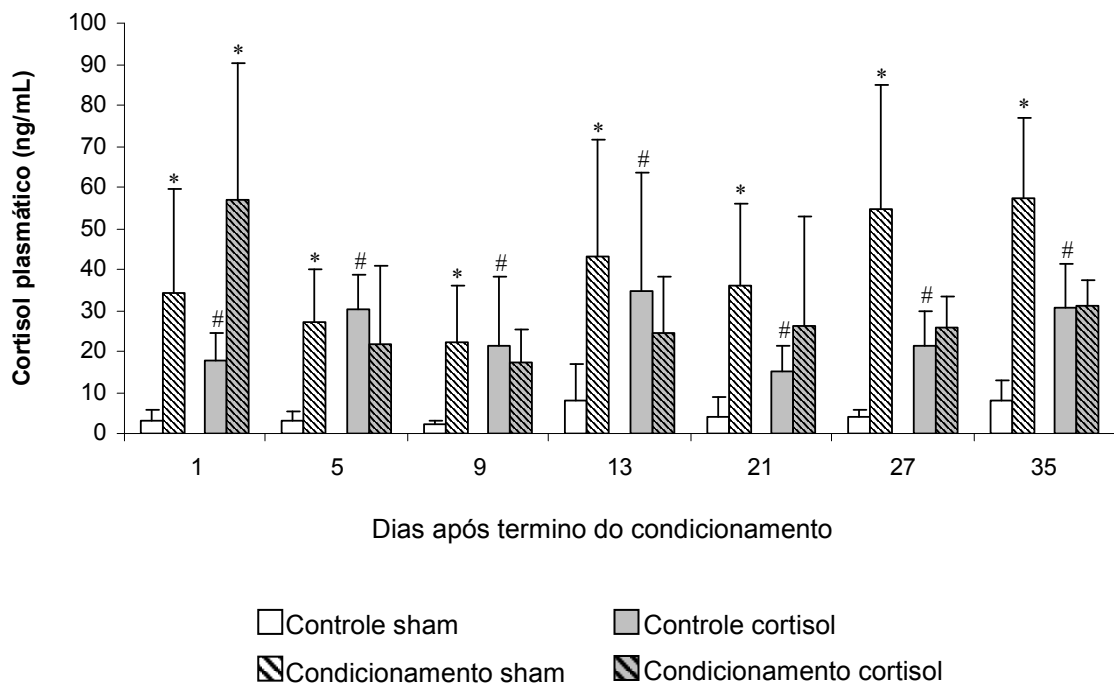


Figura 10. Efeitos do implante de hidrocortisona na resposta de estresse condicionada em truta arco-íris. Valores médios (\pm DP) de cortisol foram comparados usando-se teste T de Student para amostra independente: * $P < 0,05$, controle *versus* condicionado; # $P < 0,05$, controle cortisol *versus* controle sham. Estímulo condicionado (EC) = jato d'água; estímulo não-condicionado (EN) = confinamento.

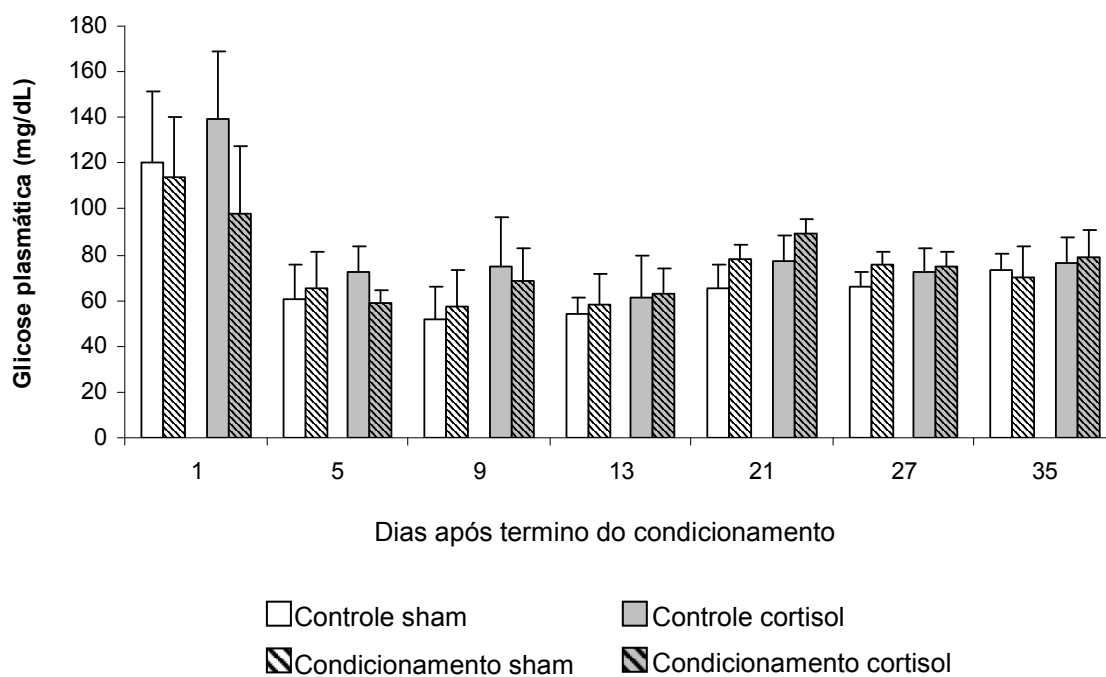


Figura 11. Efeitos do implante de hidrocortisona na resposta de estresse condicionada em truta arco-íris. Valores médios (\pm DP) de glicose foram comparados usando-se teste T de Student para amostra independente. Nenhuma diferença estatística foi encontrada. Estímulo condicionado (EC) = jato d'água; estímulo não-condicionado (EN) = confinamento.

Discussão

O presente estudo conclui que a administração de cortisol em truta arco-íris prejudica a recuperação mnemônica de uma resposta de estresse condicionada. Esta é a primeira demonstração de um corticosteróide prejudicando a memória em um vertebrado não-mamífero. No caso dos mamíferos, tal efeito é bem constatado, como pode ser visto em Dachir et al. (1993), Luine et al. (1993, 1994), Arbel et al. (1994), Bodnoff et al. (1995), Conrad et al. (1996), Krugers et al. (1997), Belanoff et al. (2001), Roozendaal et al. (2001) e Roozendaal (2003). A descrição desse efeito em peixes é sugestivo de tratar-se de um fenômeno geral dos vertebrados.

No presente estudo, inicialmente demonstrou-se o condicionamento pavloviano de uma resposta de estresse em trutas arco-íris mantidas individualmente em tanques (Etapa 1). Os níveis de cortisol plasmático aumentaram significativamente quando apresentado o EC proposto (jato d'água direcionado à superfície da água do tanque), sem a necessidade da presença do EN (confinamento), após um período de condicionamento de 10 dias (pareamento dos estímulos EC-EN). O EC utilizado não foi estressor, pois sua aplicação, mesmo que em dias sucessivos, não elevou os níveis de cortisol. A aplicação do EN durante 10 dias consecutivos não ativou cronicamente o eixo-HPI, pois o plasma amostrado um dia após esse período de condicionamento não tinha níveis elevados de cortisol. Assim, esse modelo é adequado para testar os efeitos do cortisol nessa RC das trutas. De outro lado, a glicose não foi um bom indicador nesse tipo de teste, sugerindo que a resposta adrenérgica nesse tipo de reação ao estresse (RC) possa não

estar presente, uma vez que a glicose é um indicador indireto da atividade das catecolaminas durante estresse agudo (Reid et al., 1992). No entanto, este aspecto necessita mais investigações.

A etapa seguinte deste estudo determinou que a dose de 16 mg/mL foi a adequada para se induzir elevação dos níveis de cortisol para que seu efeito sobre o condicionamento pudesse ser investigado (Etapa 2). Mais ainda, nessa etapa demonstrou-se que esses níveis elevados de cortisol não abolem a resposta de elevação do cortisol frente ao estressor, o que também era uma condição necessária para o seguimento do estudo.

Após essas padronizações, na última etapa do presente estudo foi avaliado o efeito da elevação dos níveis de cortisol na retenção da RC. Tanto o grupo cujos peixes receberam implante de cortisol quanto os que só receberam o veículo apresentaram RC 1 dia após o período de condicionamento. Contudo, a partir da segunda amostragem (5º dia após o condicionamento) apenas o grupo com cortisol não apresentou a RC, o que mostra que o cortisol diminuiu o tempo de retenção dessa RC.

Apesar desse efeito sobre a memória, o presente estudo é limitado para se avaliar em que fase da memória tal efeito pode ter atuado. A memória é dividida em: aquisição, consolidação e extinção. A aquisição é inferida da recuperação de um traço de memória (a resposta condicionada, no caso). Porém, essa recuperação pode ocorrer apenas em curto espaço de tempo, não tendo ocorrido a consolidação. Caso ocorra consolidação, a memória perdurará por mais tempo, chegando a atingir a formação de memória intermediária a longo prazo, ou caso os traços tornem-se permanentes, a memória será de longo prazo. Contudo a memória pode ser

extinta, quando os traços de memória são perdidos. Como o implante de cortisol foi aplicado antes do período de condicionamento, fica impossível avaliar exatamente a fase em que o cortisol trouxe prejuízo para a memória.

Aqui ambos os grupos condicionamento sham e cortisol exibiram a RC, mostrando claramente que o cortisol não afetou a fase de aquisição da RC. Por outro lado, 4 dias sem reforço da associação EC-EN (o intervalo de tempo entre a primeira e a segunda amostragem de sangue) já foi suficiente para extinção da RC nos peixes com implante de cortisol. Esse aspecto pode ser considerado por duas hipóteses. Numa delas, o cortisol poderia ter prejudicado a consolidação dessa RC, assim prejudicando a formação de memória de longo prazo. Na outra, mesmo havendo a consolidação da RC, o cortisol poderia ter facilitado a extinção da RC após a retirada do pareamento EC-EN. Há estudos abundantes em mamíferos demonstrando efeitos prejudiciais da elevação crônica de glicocorticóides na consolidação da memória (Bodnoff et al., 1995; Conrad et al., 1996; Park et al., 2001), os quais nos levariam a considerar mais provável a primeira hipótese. Contudo, embora conseqüências negativas da elevação crônica de cortisol em mamíferos sejam mais freqüentes, em alguns tipos de condicionamento, especialmente sob condição estressante, esse hormônio pode melhorar a consolidação da memória (Conrad et al., 1999). Além disso, como recentemente observado, trutas arco-íris selecionadas para alta reatividade ao estresse em termos da magnitude dos níveis de cortisol têm extinção da RC antes das trutas selecionadas para baixa reatividade (Moreira et al., 2004), indicando que o cortisol poderia desempenhar algum papel facilitador na extinção da memória em peixes. Isso reforça a segunda hipótese

levantada acima. No entanto, a adequação dessas duas hipóteses ainda permanece para ser esclarecida em estudos futuros.

Referências

- Alcock JA, 1997. Animal behavior: An evolutionary approach. Sinauer Associates. Inc., Massachusetts.
- Alvarenga CMD, Volpato GL, 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiol. Behav.* 57, 75-80.
- Arbel I, Kadar T, Silbermann M, Levy A, 1994. The effects of long-term corticosterone administration on hippocampal morphology and cognitive performance of middle-aged rats. *Brain Res.* 657, 227-235.
- Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, Souza SMG, Lulhier F, 1999. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquacult. Res.* 30, 887-892.
- Barton BA, Iwama GK, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 10, 3-26.
- Barton BA, 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrat. Comp. Biol.* 42, 517-525.
- Belanoff JK, Gross K, Yager A, Schatzberg AF, 2001. Corticosteroids and cognition. *J. Psych. Res.* 35, 127-145.
- Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ, 1995. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial-learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J. Neurosci.* 15, 61-69.
- Bonga SEW, 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Boujard T, Leatherland JF, 1992. Circadian-rhythms and feeding time in fishes. *Env. Biol. Fish.* 35, 109-131.

- Bry C, 1982. Daily variations in plasma-cortisol levels of individual female rainbow-trout *salmo-gairdneri* - evidence for a post-feeding peak in well-adapted fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 462-468.
- Carrieri MP, Volpato GL, 1991. Does snatching frequency really indicate food ingestion in the Nile tilapia? *Physiol. Behav.* 50, 489-492.
- Chrousos GP, Gold PW, 1992. The concepts of stress and stress system disorders - overview of physical and behavioral homeostasis *J. Am. Med. Assoc.* 267, 1244-1252.
- Conrad CD, Galea LAM, Kuroda Y, McEwen BS, 1996. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav. Neurosci.* 110, 1321-1334.
- Conrad CD, Magarinos AM, LeDoux JE, McEwen BS, 1999. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy *Behav. Neurosci.* 113, 902-913.
- Côrrea SA, Fernandes MO, Iseki KK, 2003. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1725-1731.
- Dachir S, Kadar T, Robinzon B, Levy A, 1993. Cognitive deficits induced in young-rats by long-term corticosterone administration. *Behav. Neural Biol.* 60, 103-109.
- Fernandes MO, Volpato GL, 1993. Heterogeneous growth in Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiol. Behav.* 54, 319-323.

- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW, 1992. Mechanisms of stress - a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16, 115-130.
- Krugers HJ, Douma BRK, Andringa G, Bohus B, Korf J, Luiten PGM, 1997. Exposure to chronic psychosocial stress and corticosterone in the rat: Effects on spatial discrimination learning and hippocampal protein kinase C gamma immunoreactivity. *Hippocampus* 7, 427-436.
- Luine VN, Spencer RL, Mcewen BS, 1993. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res.* 616, 65-70.
- Luine V, Villegas M, Martinez C, Mcewen BS, 1994. Stress-dependent impairments of spatial memory - role of 5-HT brain corticosteroid receptors. *Ann. New York Acad. Sci.* 746, 403-404.
- Merighe GKF, Pereira-da-Silva EM, Negrão JÁ, Ribeiro S, 2004. Effect of background color on the social stress of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.* 33, 828-837.
- Moberg, G.P., 2000. Biological response to stress: Implications for animal welfare. In: Moberg GP, Mench JA. (Eds.), *The Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CAB International, British Library, London, pp. 1-21.
- Moreira PSA, Pulman KGT, Pottinger TG, 2004. Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress. *Horm. Behav.* 46, 450-457.
- Moreira PSA, Volpato GL, 2004. Conditioning of stress in Nile tilapia. *J. Fish Biol.* 64, 961-969.

- Overli O, Winberg S, Damsgard B, Jobling M, 1998. Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): role of brain serotonergic activity and social interactions Can. J. Zool. 76, 1366-1370.
- Park CR, Campbell AM, Diamond DM, 2001. Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. Biol. Psych. 50, 994-1004.
- Pavlov IP, 1927. Conditioned Reflexes. Oxford University Press, London.
- Pickering AD, 1981. The concept of biological stress. In: Pickering AD. (Ed.), Stress and Fish. London: Academic Press, pp. 1-10.
- Pottinger TG, Carrick TR, 2001. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. Horm. Behav. 40, 419-427.
- Reddy PK, Leatherland JF, 1994. Does the time of feeding affect the diurnal rhythms of plasma hormone and glucose concentration and hepatic glycogen content of rainbow trout. Fish Physiol. Biochem. 13, 133-140.
- Reddy PK, Leatherland JF, 1995. Influence of the combination of time of feeding and ration level on the diurnal hormone rhythms in rainbow trout Fish Physiol. Biochem. 14, 25-36.
- Reid SD, Moon TW, Perry SF, 1992. Rainbow-trout hepatocyte beta-adrenoceptors, catecholamine responsiveness, and effects of cortisol. Am. J. Physiol. 262, R794-R799.
- Roosendaal B, 2003. Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval Progress in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych. 27, 1213-1223.

- Roozendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL, 2001. Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat. Neurosci.* 4, 1169-1171.
- Sakakura Y, Tsukamoto K, 1999. Ontogeny of aggressive behaviour in schools of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Environ. Biol. Fish.* 56, 231-242.
- Schreck CB, 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering AD (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press, pp. 295-321.
- Sloman KA, Gilmour KM, Taylor AC, Metcalfe NB, 2000a. Physiological effects of dominance hierarchies within groups of brown trout, *Salmo trutta*, held under simulated natural conditions *Fish Physiol. Biochem.* 22, 11-20.
- Sloman KA, Gilmour KM, Metcalfe NB, Taylor AC, 2000b. Does socially induced stress in rainbow trout cause chloride cell proliferation? *J. Fish Biol.* 56, 725-738.
- Sloman KA, Motherwell G, O'Connor KI, Taylor A, 2000c. The effect of social stress on the Standard Metabolic Rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta* *Fish Physiol. Biochem* 23, 49-53.
- Sloman KA, Metcalfe NB, Taylor AC, Gilmour KM, 2001. Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 383-389
- Trinder P, 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J. Clin. Pathol.* 22, 158-161.

Volpato GL, Fernandes MO, 1994. Social control of growth in fish. Braz. J. Med. Biol. Res. 27, 797-810.

Volpato GL, Frioli PMA, Carrieri MP, 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and a general view about the causal mechanisms. Bol. Fisiol. Anim. 13, 7-22.