



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Alterações comportamentais no nado livre de camarões *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre: experimento piloto

LETÍCIA MASSARIOLI DE LIMA

Uberlândia - MG

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Alterações comportamentais no nado livre de camarões *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre: experimento piloto

LETÍCIA MASSARIOLI DE LIMA

Orientador: Luiz Borges Bispo-da-Silva
Instituto de Ciências Biomédicas
ICBIM/UFU

Uberlândia - MG

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



LETÍCIA MASSARIOLI DE LIMA

Alterações comportamentais no nado livre de camarões *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre: experimento piloto

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como pré-requisito para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia pelo
curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 26 de novembro de 2024

Dedico este TCC a todos aqueles que acreditaram em mim, minha família, meu namorado, meus amigos, minha psicóloga e meus gatos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu namorado, que esteve ao meu lado durante toda a jornada deste TCC, a minha psicóloga que me aconselhou muito ao longo desta jornada, meus amigos que fizeram muitas piadas sobre camarões e se disponibilizaram caso eu necessitasse de auxílio, por mais que nenhum deles tivesse conhecimentos da área.

Agradeço à Prof^a. Dra. Ariádine Cristine de Almeida, sem a qual não teríamos os camarões. Professora, seus conhecimentos foram essenciais para o início dos experimentos. Sou grato também ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva, sem o qual tudo isto não seria possível.

A todos que proferiram palavras de encorajamento ao longo desta jornada, à Tatiana, Secretária do Curso de Graduação em Biotecnologia, que foi de muito auxílio em esclarecer dúvidas e ajudar com questões burocráticas.

Por fim, agradeço a minha família, especialmente a minha mãe que me deu apoio todos estes anos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Procura por abrigo por camarões *Macrobrachium* expostos ou não previamente ao estímulo tátil aversivo. 24

Tabela 2 – Número de camarões *Macrobrachium* que apresentaram ao menos uma resposta de fuga ao estímulo mecânico aplicado no dorso, considerando a exposição prévia ou não ao estímulo tátil aversivo. 24

LISTA DE IMAGENS

Figura 1 - APARATO PARA SUBMISSÃO DOS ANIMAIS AO ESTÍMULO AVERSIVO	15
Figura 2 - CAMPO ABERTO	16
Figura 3 - ABRIGO	17
Figura 4 - LINHA DO TEMPO	19
Figura 5 - TEMPO DE PERMANÊNCIA EM CADA QUADRANTE APRESENTADO POR CAMARÕES <i>MACROBRACHIUM</i> EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO TÁTIL AVERSIVO.	20
Figura 6 - MOBILIDADE POR QUADRANTE APRESENTADA POR CAMARÕES <i>MACROBRACHIUM</i> EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO TÁTIL AVERSIVO.	21
Figura 7 - MOBILIDADE GERAL APRESENTADA POR CAMARÕES <i>MACROBRACHIUM</i> EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO TÁTIL AVERSIVO.	22
Figura 8 - COMPORTAMENTO, NO CAMPO ABERTO, DE CAMARÕES <i>MACROBRACHIUM</i> EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO TÁTIL AVERSIVO.	23

LIMA, Leticia Massarioli De. **Alterações comportamentais no nado livre de camarões *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre: experimento piloto.** Monografia para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

RESUMO

Eventos aversivos frequentemente desencadeiam comportamentos associados à ansiedade, e os processos de aprendizado e memória ligados a esses eventos são cruciais para a sobrevivência animal. Neste estudo, investigamos a formação de memória aversiva e as alterações comportamentais relacionadas ao medo e à ansiedade em camarões *Macrobrachium*, submetidos ou não a um estímulo tátil ameaçador que restringia o nado livre. Durante a sessão de condicionamento, camarões do grupo experimental (n = 14) foram expostos a estímulos táteis aversivos ao entrarem no quadrante frontal de um dispositivo dividido em três seções: frontal, central e posterior. O quadrante posterior possuía uma pista ambiental. O grupo controle (n = 12) foi colocado no mesmo aparato, mas sem exposição ao estímulo aversivo. Após 20 minutos de condicionamento, o comportamento foi registrado por mais 10 minutos, sem estímulos, avaliando-se o tempo de permanência e a mobilidade em cada quadrante nos intervalos de 1, 3 e 10 minutos. Na sessão de teste, realizada 24 horas depois, os camarões foram reintroduzidos no mesmo equipamento, e seu comportamento foi reavaliado. Posteriormente, os animais foram transferidos para um campo aberto, onde outros parâmetros foram analisados, a saber: o tempo de permanência na área central, a latência para sair do centro, a proximidade com a parede do aparelho, a duração da imobilidade próxima à parede e o número de quadrantes cruzados. Também foram avaliados o comportamento de busca por abrigo e a resposta de fuga ao estímulo tátil aplicado na região dorsal do corpo dos animais. Os camarões expostos ao estímulo aversivo passaram significativamente mais tempo no quadrante oposto ao local onde foram estressados (ou seja, no quadrante posterior) e menos tempo na frente do equipamento durante o terceiro minuto de avaliação. Foi observado aumento na tigmotaxia nos camarões do grupo experimental, que permaneceram mais tempo próximos à parede do aparato e apresentaram maior imobilidade nesse local em comparação ao grupo controle. No entanto, a exposição ao estímulo aversivo não resultou em mudanças significativas no comportamento de busca por abrigo ou de fuga. Esses resultados sugerem que *Macrobrachium* spp. perceberam o estímulo apresentado no teste de condicionamento como uma ameaça, exibindo comportamentos análogos à ansiedade descrita em vertebrados.

Embora as alterações comportamentais tenham persistido por 24 horas após a exposição, a retenção de memória aversiva foi limitada a um período muito curto (3 minutos).

Palavras-chave: camarões, experimento, comportamento aversivo, memória, ansiedade, decapoda.

ABSTRACT

Aversive events often elicit behaviors associated with anxiety, and the learning and memory processes tied to such events are critical for animal survival. In this study, we investigated the formation of aversive memory and behavioral changes related to fear and anxiety in shrimp of the genus *Macrobrachium* subjected to or exempt from a threatening tactile stimulus that restricted free swimming. During the conditioning session, shrimp in the experimental group (n = 14) were exposed to aversive tactile stimuli upon entering the frontal quadrant of a device divided into three sections: frontal, central, and posterior. The posterior quadrant was characterized by an environmental cue. The control group (n = 12) was placed in the same apparatus but was not exposed to the aversive stimulus. Following 20 minutes of conditioning, behavior was recorded for an additional 10 minutes without stimuli, assessing the time spent and mobility in each quadrant at intervals of 1, 3, and 10 minutes. In the test session, conducted 24 hours later, the shrimp were reintroduced to the same apparatus, and their behavior was reassessed. Subsequently, the animals were transferred to an open field, where additional parameters were evaluated, including the time spent in the central area, latency to leave the center, proximity to the apparatus walls, immobility duration near the walls, and the number of quadrant crossings. Shelter-seeking behavior and escape responses to tactile stimulation on the dorsal region were also assessed. Shrimp exposed to the aversive stimulus spent significantly more time in the quadrant opposite to where the stressor was applied (i.e., the posterior quadrant) and less time in the frontal section during the third minute of evaluation. Increased thigmotaxis was observed in the experimental shrimp, which remained closer to the apparatus walls where it exhibited greater immobility compared to the control group. However, exposure to the aversive stimulus did not result in significant changes in shelter-seeking or escape behaviors. These findings suggest that *Macrobrachium* spp. perceived the stimulus as a threat, displaying behaviors analogous to anxiety observed in vertebrates. While behavioral changes persisted for 24 hours post-exposure, aversive memory retention was limited to a very short term (3 minutes).

Keywords: shrimps, experiment, aversive behavior, memory, anxiety, decapod.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral:	17
3.2. Objetivos específicos:	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Animais:	18
4.2. Preparo inicial	19
4.3. Teste de condicionamento aversivo	19
4.4. Teste de Campo Aberto	21
4.4.1 Teste de busca por abrigo	22
4.4.2 Teste de resposta de escape (fuga)	22
4.5. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	25
5.1. Aversão condicionada ao local	25
5.1.1. Tempo de permanência	25
5.1.2. Tempo de mobilidade	26
5.2. Campo aberto	28
5.2.1. Teste de procura por abrigo	29
5.2.2. Teste de resposta de escape (fuga)	29
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
 APÊNDICE	 40
 ANEXO - Licença permanente para coleta de material zoológico	 40

1. INTRODUÇÃO

As memórias são um reflexo de nossas vidas, experiências, interações e hábitos, capazes de gerar alterações comportamentais e essenciais no processo de aprendizagem (Einchenbaum *et al.*, 2011).

Os animais invertebrados compreendem uma vasta diversidade de espécies que ocupam diferentes ambientes, destacando-se entre elas o grupo dos crustáceos, caracterizado por ampla variação em tamanho, hábitos e organização social. Esses organismos podem ser grandes ou pequenos, diurnos ou noturnos, e ocupar ambientes de água salgada ou doce. Por se tratar de um grupo altamente heterogêneo e adaptado a ambientes complexos, os crustáceos dependem de estratégias eficientes de localização, evitação e fuga. (Ruppert, 1996).

Em todo o reino animal, é possível identificar diferentes formas de aprendizado. Embora a maioria dos estudos nesta área tenha sido realizada com espécies de vertebrados, o uso de invertebrados como modelo experimental tem se tornado cada vez mais frequente na literatura especializada (Perry; Barron; Cheng; 2013). Apesar de apresentarem menor complexidade neuroanatômica e neurofuncional, esses organismos possuem um repertório comportamental diversificado e habilidades de aprendizagem que viabilizam estudos relevantes no campo da neurociência (Perry; Barron; Cheng; 2013). Além disso, o uso de invertebrados torna as pesquisas mais econômicas, facilita o controle das condições experimentais e representa uma alternativa eticamente mais aceitável em comparação ao uso de vertebrados (Perry; Barron; Cheng; 2013). Com relação à questão ética, é importante destacar que, no Brasil, o uso de animais em pesquisa científica é regulamentado pela **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**, conhecida como **Lei Arouca**, vigente desde sua sanção. Essa legislação aplica-se exclusivamente a animais vertebrados, conforme estabelecido no artigo 2º: "*O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata, observada a legislação ambiental.*"

De acordo com Perry, Barron e Cheng (2013):

O espectro de habilidades de aprendizagem exploradas e documentadas em invertebrados abrange desde as formas mais simples de aprendizagem não associativa (habituação e sensibilização), passando pela aprendizagem associativa bem conhecida (tanto clássica quanto instrumental [operante]), até outras formas de aprendizagem descritas como mais cognitivas, complexas ou especializadas, como a aprendizagem baseada em números e a aprendizagem relacional (Perry; Barron; Cheng, 2013, p. 561, tradução nossa).

A aprendizagem não-associativa é a forma mais básica de aprendizagem, ocorrendo quando há alterações na resposta a um único estímulo. Os dois principais tipos são: habituação, que reduz a resposta ao estímulo, e sensibilização, que a intensifica (Perry; Barron; Cheng; 2013). Por exemplo, há muito se sabe que rotíferos, invertebrados microscópicos com um sistema nervoso simples de cerca de 200 neurônios, apresentam uma diminuição gradual na resposta contrátil quando submetidos a estímulos táteis repetitivos (Applewhite, 1968).

Na aprendizagem associativa, o animal aprende que um estímulo ou resposta está ligado a um evento ou consequência. Existem dois tipos principais: condicionamento clássico, que envolve a associação entre estímulos – neste caso, a aprendizagem requer que os animais associem preditores externos a um determinado resultado; condicionamento operante, que relaciona comportamentos às suas consequências – ou seja, a aprendizagem decorre do comportamento do animal. Assim, no condicionamento clássico, como associar o fornecimento de alimentos açucarados (estímulo incondicionado) à luz (estímulo neutro), o animal aprende a prever eventos. Já no condicionamento operante, como pressionar uma alavanca para obter comida, o animal relaciona uma ação voluntária a uma recompensa. O condicionamento operante é considerado mais complexo, pois inclui elementos do clássico (Perry; Barron; Cheng; 2013). Como exemplos ilustrativos de aprendizagem associativa em crustáceos, destaca-se que os caranguejos (*Carcinus maenas*) apresentam inibição da extensão natural dos olhos após treinamento aversivo com jatos de ar (que induzem reflexo de retirada) (Abramson; Feinman, 1987), além de aprenderem a pressionar uma alavanca para obter alimento (Abramson; Feinman, 1990). Já os lagostins (*Procambarus clarkii* e *Cambarus diogenes*) são capazes de mover suas pinças para posições específicas como estratégia para evitar choques elétricos (Stafstrom; Gerstein, 1977). Adicionalmente, indivíduos da espécie *P. clarkii* aprendem tanto a operar uma alavanca para acessar alimento (Olson; Strandberg, 1979) quanto a caminhar para frente para evitar choques (Kawai; Kono; Sugimoto, 2004). Por

fim, as lagostas (*Homarus americanus*) aprendem a aplicar força com suas pinças sobre uma barra sensora como forma de obter comida (Tomina; Takahata, 2010).

Conforme descrito para os caranguejos *C. maenas* e *Coenobita compressus* (Davies et al., 2019; Vargas-Vargas et al., 2023) e lagostins (*Orconectes rusticus*) (Tierney; Lee, 2011; Tierney; Andrews, 2013), crustáceos demonstram capacidade de aprendizagem espacial e formação de memória de longo prazo, com duração de pelo menos uma semana em alguns casos (Tierney; Andrews, 2013). Essas habilidades foram evidenciadas em experimentos envolvendo a resolução de labirintos sob diferentes condições experimentais, destacando a complexidade cognitiva desses organismos.

Os animais são continuamente expostos a ameaças que podem provocar dor e, ocasionalmente, danos corporais e morte. A habilidade de reconhecer e evitar sinais precursores de perigo, bem como de reagir de maneira adequada a estímulos nocivos, desempenham um papel essencial na prevenção de lesões, predação e, conseqüentemente, na manutenção da vida. Portanto, em cenários ambientais dinâmicos, é essencial que o sistema nervoso – mesmo os menos complexos – tenha a capacidade de detectar novas ameaças e registrar essas experiências na memória (Pribadi; Chalasani, 2022).

O medo pode ser entendido funcionalmente como um estado interno provocado por estímulos que indicam ameaça, resultando em comportamentos que reduzem o risco. Respostas ao medo podem ser inatas (como ratos que evitam o odor de gatos, mesmo sem nunca terem sido atacados), ou aprendidas (quando um estímulo neutro se torna associado ao perigo). Essa definição de medo permite aplicar o conceito a diversas espécies, priorizando estímulos e respostas adaptativas ao ambiente (Pribadi; Chalasani, 2022).

Segundo Beckers et al. (2023), o medo e a ansiedade são emoções intimamente relacionadas e filogeneticamente adaptativas, experimentadas em resposta a uma ameaça próxima/iminente ou a uma ameaça mais distante/futura, respectivamente. Cabe destacar que a aprendizagem associativa desempenha um papel crucial na determinação do medo (Beckers et al., 2023) e, provavelmente, exerce influência significativa no desenvolvimento de estados emocionais ansiosos.

Até meados da década passada, comportamentos associados à ansiedade não haviam sido caracterizados e validados em invertebrados. Contudo, em 2014, Fossat et al. publicaram um estudo na prestigiada revista *Science*, no qual demonstraram que, após exposição a choques elétricos, lagostins (*P. clarkii*) evitaram os braços iluminados e aversivos de um labirinto aquático em forma de cruz. Assim, os autores concluíram que “o comportamento de

evitação induzido por estresse em lagostins *exibe notáveis semelhanças com a ansiedade em vertebrados. No labirinto elevado em forma de cruz, um paradigma similar ao labirinto*” empregado pelos pesquisadores, *“o comportamento de roedores após a exposição a choques elétricos assemelha-se ao dos lagostins”*. Verificaram que *“assim como em roedores, o comportamento ansioso dos lagostins foi sensível ao CDZ [clordiazepóxido] administrado sistemicamente, um potente ansiolítico benzodiazepínico que modula os receptores GABA [ácido gama-aminobutírico] tipo A em vertebrados”*. Cabe salientar que o GABA também é um neurotransmissor inibitório em crustáceos e que nestes animais, os receptores para GABA são sensíveis aos benzodiazepínicos (Snyder; Watson; Peeke, 2000). Em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisa identificou, na mesma espécie de lagostim, comportamentos semelhantes à ansiedade associados à interação social; novamente, as alterações observadas foram sensíveis à administração de benzodiazepínico (Bacqué-Cazenave et al., 2017). Em ambientes restritos, confrontos entre indivíduos geram hierarquias de dominância e submissão. Enquanto os animais submissos exibem comportamentos indicativos de ansiedade no labirinto aquático em forma de cruz, os dominantes não demonstram tais respostas (Bacqué-Cazenave et al., 2017).

Nesse contexto, um estado semelhante à ansiedade foi sugerido para o crustáceo anfípode *Gammarus fossarum*, pois, após exposição a choques elétricos, os animais passaram a permanecer mais tempo em abrigos, mesmo na ausência de risco de predação (Perrot-Minnot et al., 2017). Mais recentemente, Maza, Urbano e Delorenzi (2023) utilizaram um labirinto aquático em forma de cruz, similar ao descrito por Fossat et al. (2014), e, empregando a luz como estímulo aversivo, demonstraram comportamentos sugestivos de ansiedade em caranguejos (*Neohelice granulata*).

Portanto, os dados obtidos até o momento corroboram a visão atual de que crustáceos podem adquirir memórias aversivas associadas ao desenvolvimento de respostas comportamentais que se assemelham à ansiedade.

2. JUSTIFICATIVA

A avaliação de memória aversiva e comportamentos sugestivos de ansiedade em crustáceos possibilita ampliar nossos conhecimentos em pelo menos três áreas distintas do conhecimento: ecologia, pesquisa pré-clínica e neurociência comparada. De fato, como esses animais habitam ambientes complexos, onde evitar ameaças é essencial para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo (Ruppert, 1996), compreender suas respostas adaptativas, como fuga e uso de abrigos, pode esclarecer mecanismos evolutivos e ecológicos que sustentam sua permanência em diferentes habitats. Os crustáceos apresentam vantagens como modelos experimentais devido à simplicidade de seus sistemas nervosos, aliada à expressão de comportamentos sensíveis a fármacos ansiolíticos (Snyder; Watson; Peeke, 2000; Bacqué-Cazenave et al., 2017), tornando-os úteis no desenvolvimento de novas terapias para os transtornos de ansiedade. Análises comportamentais e farmacológicas em crustáceos podem evidenciar conservações evolutivas de mecanismos relacionados ao medo e à ansiedade, permitindo identificar paralelos com sistemas mais complexos, como os de vertebrados. Portanto, esses estudos ampliam o conhecimento sobre biologia, comportamento e aplicações biomédicas, promovendo avanços em diversas áreas do saber, sendo, ainda, mais econômicos e eticamente aceitos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar as alterações comportamentais em *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre.

3.2. Objetivos específicos:

- Verificar a capacidade de aquisição e retenção de memória aversiva em *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre;
- Avaliar o comportamento em campo aberto de *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre;
- Avaliar a resposta de escape de *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre;
- Avaliar o comportamento de busca por abrigo de *Macrobrachium* spp. expostos agudamente a estímulo tátil ameaçador que restringe o nado livre.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Macrobrachium amazonicum e *Macrobrachium pantanalense* são duas espécies de camarões de água doce que ocorrem no Brasil. A hipótese de que uma subpopulação de *M. amazonicum* constituiria uma nova espécie, denominada *M. pantanalense*, foi proposta em 2013 por Dos Santos, Hayd e Anger, com base exclusivamente em diferenças morfológicas. Dados recentes corroboram que essas subpopulações de fato representam espécies distintas, mas questionam a validade da abordagem original, fundamentada em análises morfológicas mais simples, para a diferenciação taxonômica (Nogueira, 2023). Esses estudos consideram que *M. amazonicum* e *M. pantanalense* apresentam alta similaridade morfológica e baixo distanciamento genético, reforçando a necessidade de uma abordagem integrativa para fins taxonômicos (Nogueira, 2023). Dada a possibilidade de coexistência dessas duas espécies na natureza, referimo-nos, no presente estudo, apenas ao gênero – *Macrobrachium* – já que nossa amostra é composta exclusivamente por indivíduos selvagens não submetidos à classificação taxonômica para identificação da espécie.

Indivíduos de ambos os sexos pertencentes ao gênero *Macrobrachium* (n = 45) foram coletados no período da tarde, em 12/04/2024, no Recanto das Águas, rio Araguari, localizado no município de Uberlândia, Minas-Gerais (MG). A coleta foi realizada com o auxílio da bióloga Prof^a. Dra. Ariádine Cristine de Almeida, colaboradora deste estudo, que possui licença permanente para coleta de material zoológico emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), conforme registro no SISBIO (licença nº 73517-5; ANEXO I).

O transporte dos camarões foi realizado em um galão de plástico opaco, onde os animais permaneceram por 24 horas antes de serem transferidos para um aquário de dimensões: 20 x 43 x 30 cm (figura 1), instalado no laboratório de INVERTEBRADOS da UFU no campus umuarama. O aquário foi preparado com 50% de água filtrada do local de origem e 50% de água destilada, com o objetivo de minimizar o estresse dos animais. O ambiente do aquário foi enriquecido com rochas, pedaços de tubos de PVC para servir de abrigo e um tronco de resina decorativo que também funcionava como refúgio. Equipamentos essenciais incluíram bomba de circulação de água, filtro mecânico, químico e biológico,

bomba de aeração, luz LED de 3,5 W (controlada por temporizador para manter um ciclo claro-escuro de 12 horas – das 7h30 às 19h30), termômetro e ar-condicionado no laboratório.

Os camarões foram alimentados uma vez ao dia com ração Tetra Colorbits Gran®, fornecida no fundo do aquário com auxílio de um tubo de PVC que direcionava a ração para uma placa de Petri. O período de aclimação às condições laboratoriais foi de três semanas. Durante esse período, a temperatura da água foi mantida em $21,0 \pm 1,5$ °C, e outros parâmetros físico-químicos foram monitorados e controlados: pH = $6,9 \pm 0,2$; dureza (Gh) = 3,0 °dH; amônia (NH_3) = $0,2 \pm 0,2$ ppm; e nitrito (NO_2^-) = $0,01 \pm 0,01$ ppm.

Para manter a qualidade da água, trocas de 50% do volume foram realizadas a cada três dias ou sempre que os níveis de NH_3 e/ou NO_2^- excediam os limites críticos estabelecidos pelos kits comerciais (3,5-6,5 ppm ou 0,5 ppm, respectivamente). Essas condições críticas ocorreram apenas nos últimos quatro dias do período de aclimação. As trocas de água foram realizadas com o auxílio de um sifão, que também permitia a remoção de detritos acumulados no fundo do aquário.

A avaliação dos parâmetros físico-químicos era realizada diariamente ao final do dia (antes das 19h30), utilizando kits comerciais (da Labcon® e da OceanTech®). Ao término do período de aclimação e durante os experimentos, 19 dos 45 animais morreram.

Figura 1 - AQUÁRIO ONDE OS CAMARÕES FORAM MANTIDOS



legenda: aquário onde os camarões foram mantidos durante o experimento, na foto vemos também a luz led, filtro, o termômetro, pedaços de tubo de PVC, cascalho e decorações

4.2. Preparo inicial

Os 29 animais sobreviventes no final do período de aclimação foram divididos em seis subgrupos: três experimentais ($n = 4/5$) e três controles ($n = 4/5$), totalizando experimental com $n = 14$ e controle $n=12$. Dois subgrupos foram testados simultaneamente, sendo sempre um grupo experimental (submetido ao estímulo mecânico) e um controle (não submetido ao estímulo mecânico). Cada conjunto de testes a que um animal foi submetido teve duração de dois dias, totalizando seis dias de experimentos realizados de forma consecutiva. O tamanho corporal dos animais de ambos os grupos não diferiu significativamente.

Os animais submetidos aos testes foram separados dos demais com auxílio de rede e mantidos em potes plásticos opacos de 1,5 litros, contendo água com condições equivalentes às do aquário principal em termos de pH, dureza, NH_3 , NO_2^- , luminosidade e aeração (oxigenação). Água em iguais condições foi utilizada nos aparatos dos testes e o fornecimento

de ração também foi mantido igual ao do aquário nos períodos entre os ensaios. Durante todos os experimentos, a água utilizada nos aparatos de teste e nos recipientes foi trocada após cada manobra ou avaliação para garantir a qualidade das condições experimentais e evitar possíveis interferências deixadas pelos animais previamente analisados. A altura da coluna de água nos aparelhos foi sempre de 6 cm.

4.3. Teste de condicionamento aversivo

Os animais (4-5 simultaneamente) foram colocados em um recipiente intermediário, onde permaneceram por 5 minutos antes de serem transferidos para o aparato experimental. A transferência foi realizada com cuidado, despejando-se a água junto com os animais em um recipiente retangular transparente de plástico (dimensões: 10 x 24 x 5,5 cm; capacidade de aprox. 1,25 L), dividido em 3 partes de mesmo tamanho marcadas no recipiente com uma caneta preta, equipado com uma tampa também de plástico transparente. A tampa do recipiente teve seu terço inicial removido, de modo que, durante o teste, apenas dois terços do equipamento permaneceram cobertos. A porção descoberta (terço inicial) foi denominada frente, enquanto o restante da tampa foi dividido em duas partes iguais, denominadas centro e fundo. Na região posterior (quadrante do fundo), um pequeno objeto cilíndrico (3 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura) foi submerso em uma posição fixa, servindo como pista ambiental (Figura 2). Durante os experimentos, o equipamento foi mantido tampado.

Figura 2 - APARATO EMPREGADO NO TESTE DE CONDICIONAMENTO AVERSIVO

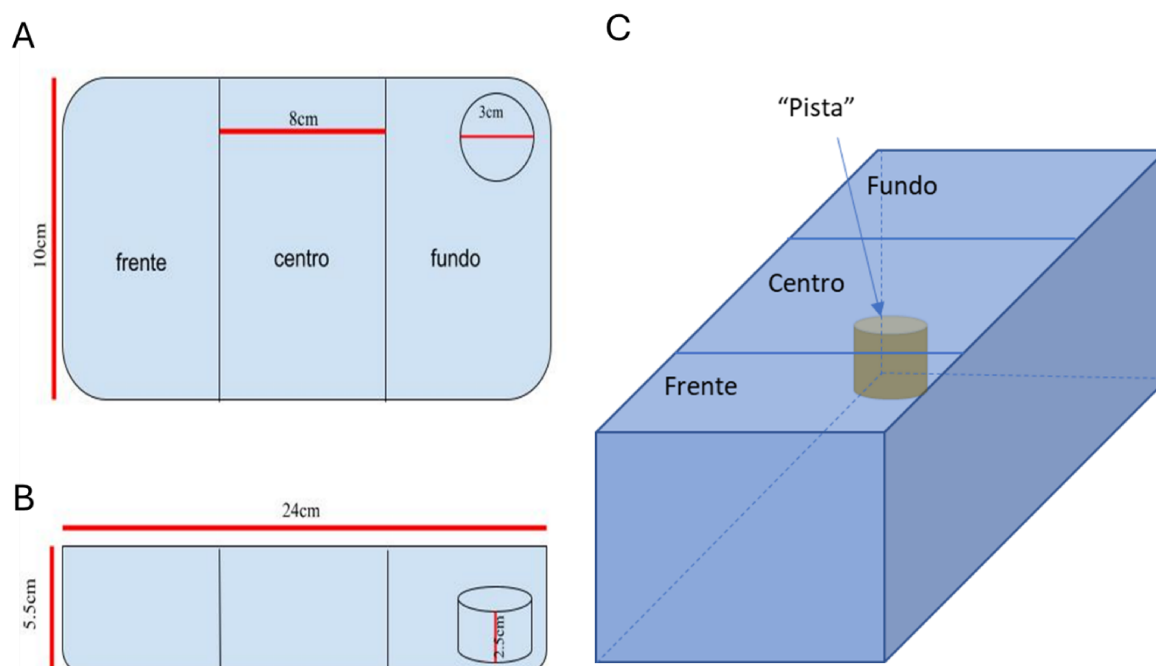


Ilustração esquemática do aparato utilizado no teste de condicionamento aversivo, indicando a divisão dos quadrantes e a localização do objeto empregado como pista ambiental. Os animais eram expostos ao estímulo aversivo quando adentravam totalmente o terço anterior (frente) do aparato. A: vista superior; B: vista lateral; C: representação tridimensional.

No primeiro dia do experimento (sessão de condicionamento ou treino), um estímulo tátil aversivo foi aplicado aos camarões do grupo experimental. Esse estímulo consistia em golpes e empurrões não injuriosos, direcionados manualmente com uma espátula de metal sempre que o animal adentrasse completamente o quadrante frontal (frente) do equipamento. O estímulo era interrompido assim que o animal deixava o quadrante, seja recuando ou fugindo. A sessão de condicionamento teve duração de 20 minutos. Os animais do grupo controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, incluindo a presença do experimentador na mesma posição adotada por ele durante a manipulação dos animais do grupo experimental, mas sem a aplicação do estímulo tátil aversivo. Após os 20 minutos de condicionamento, tanto os animais experimentais quanto os controles permaneceram por mais 10 minutos no aparato, agora sem a presença do experimentador, para o registro do comportamento. Durante esse período, foram avaliados o tempo de permanência e a mobilidade dos animais em cada quadrante, nos tempos de 1, 3 e 10 minutos.

No segundo dia (sessão de teste), decorridas 24 horas da fase de condicionamento, os animais foram novamente transferidos para o mesmo equipamento, seguindo o procedimento descrito anteriormente. O comportamento dos animais foi então registrado durante 10 minutos e neste período, foram avaliados novamente o tempo de permanência e a mobilidade dos camarões em cada quadrante, nos tempos de 1, 3 e 10 minutos. Cabe ressaltar que na sessão de teste, nenhum estímulo aversivo foi apresentado aos animais.

4.4. Teste de Campo Aberto

Para os testes realizados no campo aberto, seguimos o protocolo descrito por Takahashi (2022). No dia da sessão de teste, imediatamente após o término dos 10 minutos de permanência dos animais no aparato de condicionamento aversivo, cada animal foi transferido individualmente com o auxílio de uma rede para o centro do campo aberto onde permaneceram livres para realizar seu nado por 2 minutos. O campo aberto consistia em um recipiente redondo de plástico transparente, com 24 cm de diâmetro e 10 cm de altura, cujo assoalho foi demarcado em 12 quadrantes para facilitar a análise comportamental (Figura 3).

Figura 3 - CAMPO ABERTO

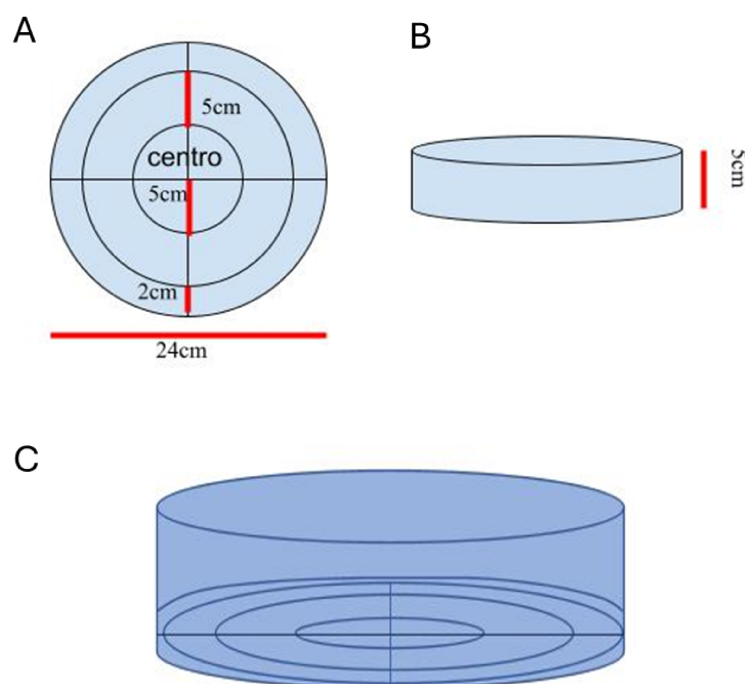


Ilustração esquemática do aparato utilizado no teste de campo aberto. Os animais eram inicialmente colocados no centro do aparelho e seu comportamento era avaliado durante um período de 2 minutos. A: vista superior; B: vista lateral; C representação tridimensional.

Neste teste, foram avaliados os seguintes parâmetros: (i) tempo total de permanência no centro do equipamento; (ii) latência para que o animal deixasse o centro do aparelho (fuga do centro); (iii) tempo total em contato ou proximidade com a parede do campo aberto (tigmotaxia), considerando-se proximidade sempre que a cabeça e parte do corpo do animal estivessem dentro da área delimitada entre a parede e a demarcação mais externa do equipamento (2 cm de largura; Figura 3); e (iv) número total de quadrantes percorridos pelo animal.

4.4.1. Teste de busca por abrigo

Também avaliamos o comportamento de busca por abrigo. Para isso, ao final do teste de campo aberto, inserimos, no mesmo aparato, um pedaço de cano de PVC (Figura 4), com 2,5 cm de diâmetro interno e 6 cm de comprimento, previamente retirado do aquário onde os animais eram mantidos. O cano era posicionado de frente para o animal, no canto oposto à sua localização inicial, independentemente de onde o camarão estivesse. A busca por abrigo foi registrada durante um período de 2 minutos. Foi considerado que o animal havia adentrado o abrigo quando ele tinha mais de 50% da sua estrutura corporal dentro do cano.

Figura 4 - ABRIGO

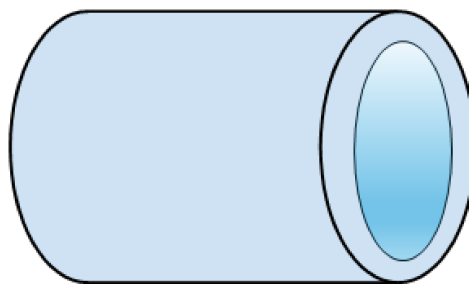


Ilustração esquemática do esconderijo empregado no teste de busca por abrigo.

4.4.2. Teste de resposta de escape (fuga)

Ao final, imediatamente após o teste de busca por abrigo, com o animal ainda no campo aberto e após a remoção do esconderijo, avaliamos o comportamento de fuga conforme descrito por Takahashi (2022). Nesse teste, era aplicado um estímulo aversivo no dorso do animal, encostando rapidamente a ponta de uma pipeta de vidro do tipo Pasteur na região dorsal. Registramos, então, se o animal realizava o movimento de fuga característico,

ou seja, um nado para trás impulsionado pelo movimento da cauda, em resposta a cada estímulo aplicado. O teste consistiu na aplicação de três estímulos mecânicos consecutivos. Sempre que o animal respondia com um movimento de fuga, o próximo estímulo era aplicado assim que o movimento cessasse. Caso o animal não respondesse a um estímulo, outro era imediatamente apresentado. Os parâmetros analisados foram: (i) a taxa de escape (%), classificada como 0% (nenhum escape em 3 tentativas), 33,33% (1 escape em 3 tentativas), 66,66% (2 escapes em 3 tentativas) ou 100% (3 escapes em 3 tentativas); (ii) o número de animais que apresentaram, ou não, pelo menos uma fuga.

4.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Como os dados não apresentaram distribuição normal, conforme indicado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para a comparação dos comportamentos avaliados nos testes de condicionamento aversivo e campo aberto. Dados do tipo "tudo ou nada" (como a procura ou não por abrigo e a apresentação ou não de pelo menos uma fuga no teste de resposta de escape) foram organizados e apresentados em tabelas de contingência e analisados pelo teste exato de Fisher. Os demais dados foram apresentados como mediana com percentis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 5 - LINHA DO TEMPO

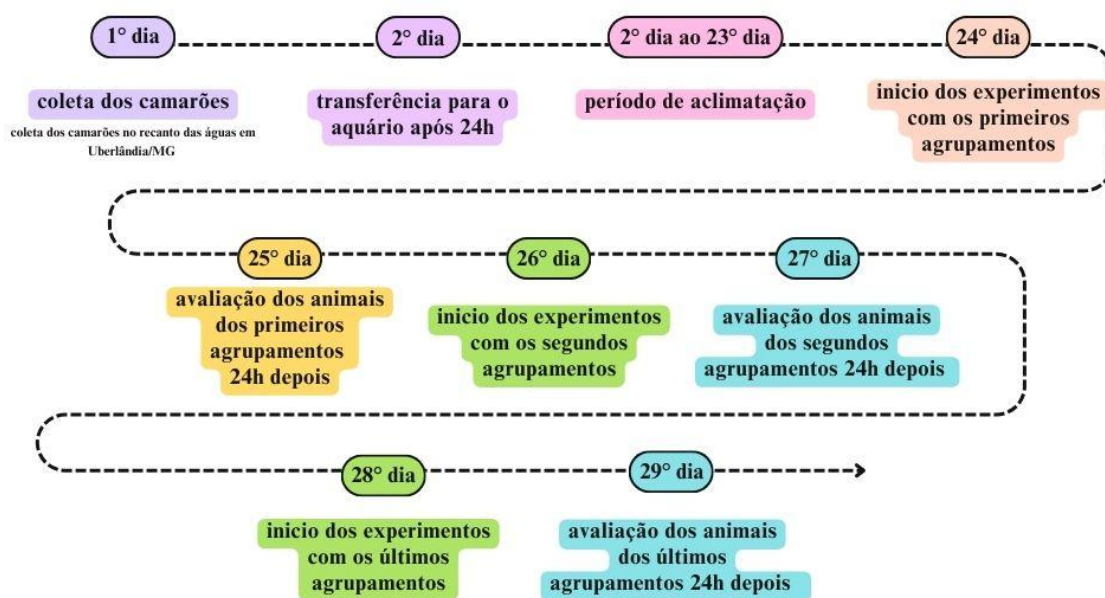


Imagem ilustrativa da cronologia experimental.

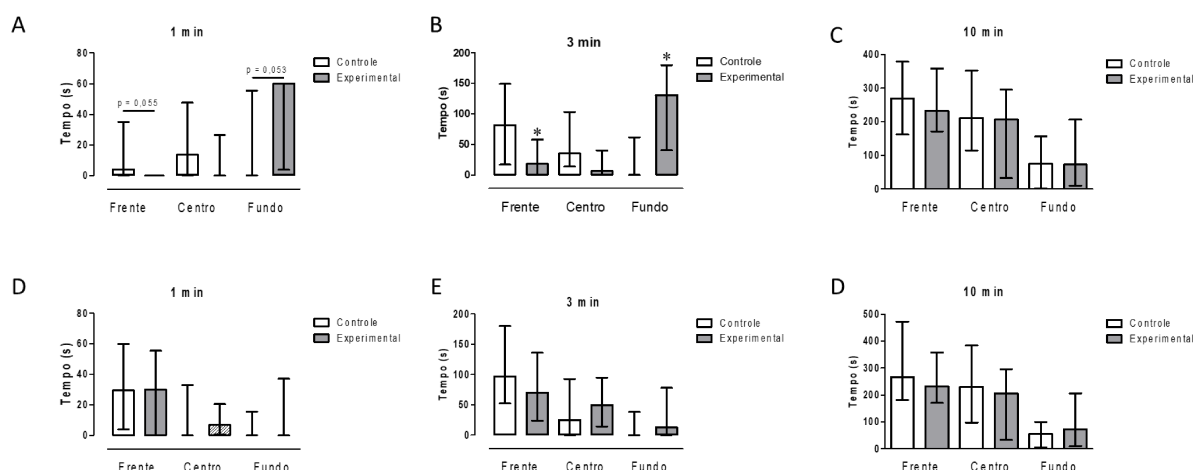
5. RESULTADOS

5.1. Aversão condicionada ao local

5.1.1. Tempo de permanência

Observamos uma tendência de diminuição no tempo de permanência na parte frontal do equipamento ($p = 0,055$), acompanhada por uma tendência de aumento no tempo de permanência no fundo ($p = 0,053$), no intervalo de 1 minuto após a cessação do estímulo aversivo (Figura 6A). Além disso, o tempo de permanência dos animais experimentais no fundo do aparato durante a sessão de condicionamento foi significativamente maior apenas no intervalo de 3 minutos após o término da apresentação do estímulo tátil aversivo (Figura 6B). Uma redução significativa no tempo de permanência na frente do equipamento também foi detectada apenas neste período (Figura 6B). Nenhuma diferença significativa neste parâmetro foi observada entre os grupos durante os 10 minutos da sessão de condicionamento (Figura 6C), nem ao longo de todo o experimento na sessão de teste (Figuras 6D, E e F).

Figura 6 - TEMPO DE PERMANÊNCIA NOS QUADRANTES DO APARATO DE CAMARÕES *MACROBRACHIUM*, SUBMETIDOS OU NÃO À EXPOSIÇÃO PRÉVIA AO ESTÍMULO AVERSIVO.

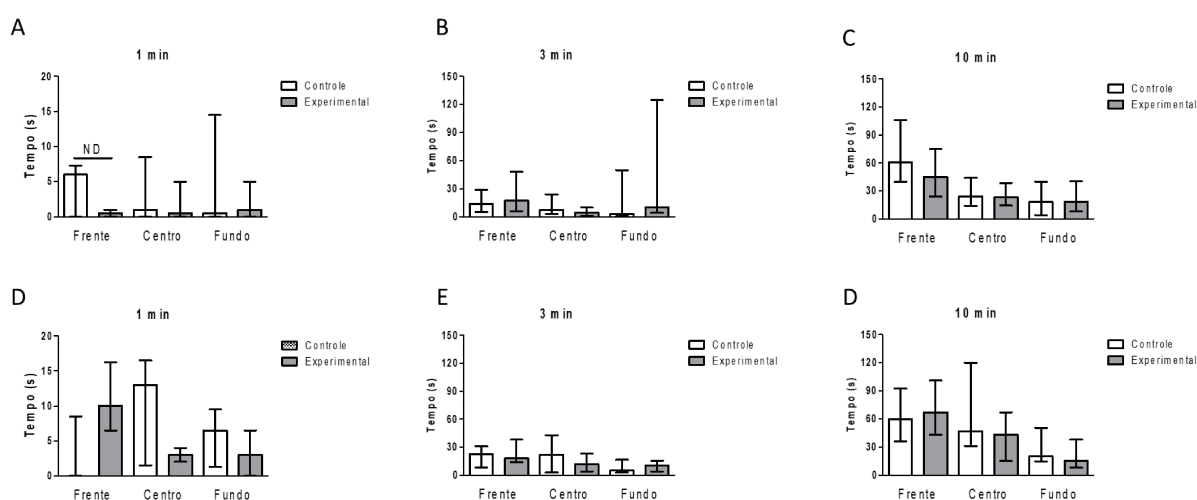


Tempo gasto pelos animais em cada quadrante do equipamento (frente, centro e fundo) durante os períodos de 1, 3 e 10 minutos na sessão de condicionamento (A, B e C) e na sessão de teste (D, E e F). Os dados estão representados pela mediana e percentis; * $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney). $N = 12-14$.

5.1.2. Tempo de mobilidade

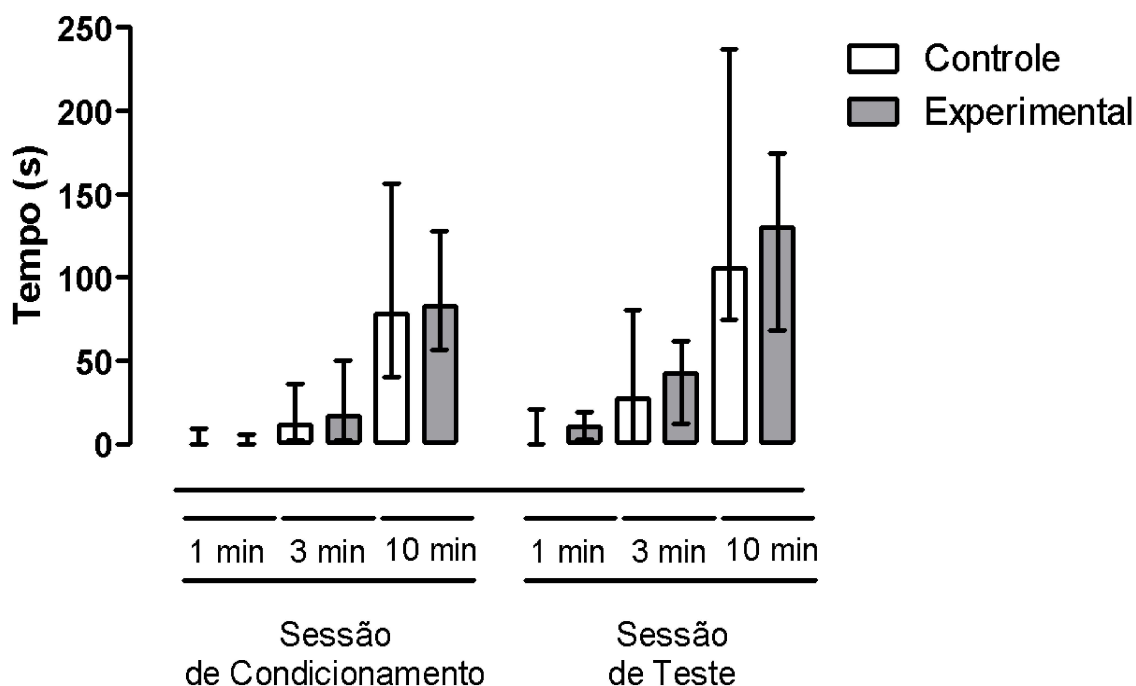
A mobilidade dos animais em cada quadrante (Figura 7) e a mobilidade geral (total) (Figura 8) não foram significativamente alteradas pela exposição dos animais ao estímulo tátil aversivo, tanto na sessão de condicionamento quanto na sessão de teste.

Figura 7 - MOBILIDADE POR QUADRANTE APRESENTADA POR CAMARÕES *MACROBRACHIUM* EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO AVERSIVO.



Tempo de mobilidade dos animais em cada quadrante do equipamento (frente, centro e fundo) durante os períodos de 1, 3 e 10 minutos na sessão de condicionamento (A, B e C) e na sessão de teste (D, E e F). Os dados estão representados pela mediana e percentis. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney). ND: não determinado devido ao número de animais presentes no quadrante em questão durante o tempo de avaliação ($n = 2$ animais). Os dados estão representados pela mediana e percentis. $N = 2-14$.

Figura 8 - MOBILIDADE GERAL APRESENTADA POR CAMARÕES *MACROBRACHIUM*, EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO TÁTIL AVERSIVO.

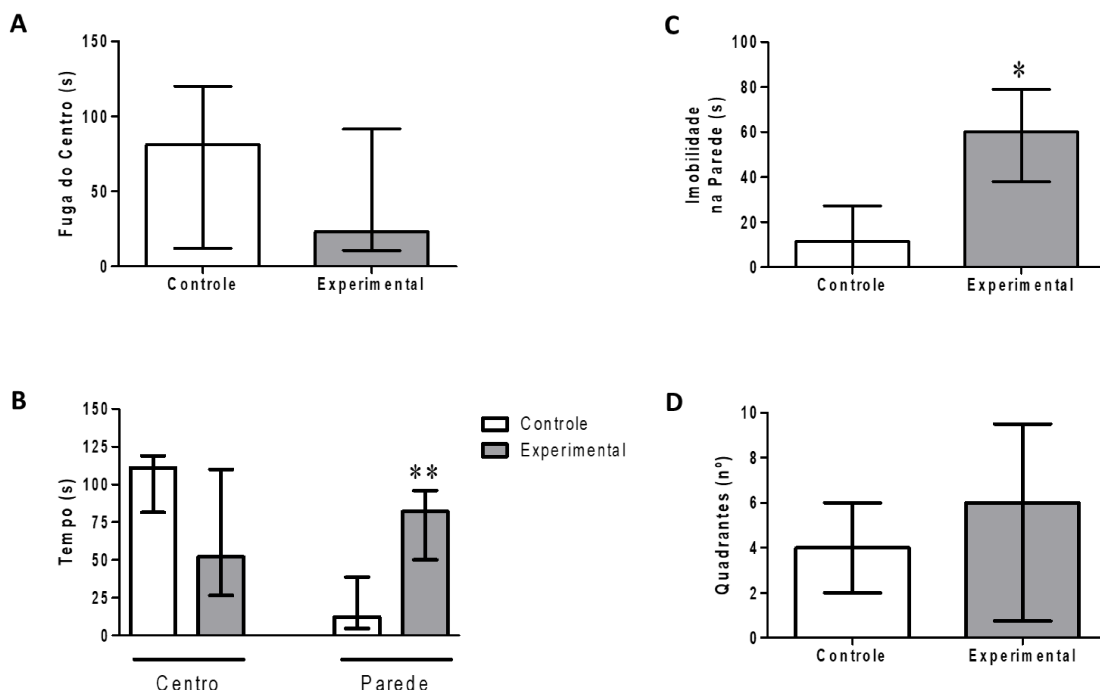


Tempo de mobilidade total dos animais considerando todos os quadrantes durante os períodos de 1, 3 e 10 minutos na sessão de condicionamento ou na sessão de teste. Os dados estão representados pela mediana e percentis. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney). $N = 12-14$.

5.2. Campo aberto

A exposição ao estímulo tátil aversivo não alterou o tempo de fuga dos animais do centro do campo aberto (Figura 9A), mas aumentou o tempo gasto por eles próximos à parede do aparato (Figura 9B), assim como o tempo de imobilidade nesse local (Figura 9C). Além disso, o tempo de permanência no centro (Figura 9D) e o número de quadrantes percorridos durante 2 minutos não foram modificados pelo estímulo aversivo.

Figura 9 – COMPORTAMENTO, NO CAMPO ABERTO, DE CAMARÕES MACROBRACHIUM EXPOSTOS OU NÃO PREVIAMENTE AO ESTÍMULO TÁTIL AVERSIVO.



São apresentados: o tempo de fuga dos animais do centro do campo aberto (Figura 9A), o tempo gasto pelos animais no centro ou próximo à parede do aparato (Figura 9B), o tempo de imobilidade junto à parede (Figura 9C) e o número total de quadrantes percorridos durante 2 minutos (Figura 9D). Os dados estão representados pela mediana e percentis; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (teste de Mann-Whitney). $N = 12-14$.

5.2.1. Teste de procura por abrigo

A exposição prévia dos animais ao estímulo tátil aversivo não modificou o comportamento de busca por abrigo dos animais (Tabela 1).

Tabela 1 – Procura por abrigo por camarões *Macrobrachium* expostos ou não previamente ao estímulo tátil aversivo.

comportamento	Controle	Experimental	
Procura abrigo	0	4	4
Não procura abrigo	12	10	22
Total	12	14	26

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos; $p > 0,05$ (teste exato de Fisher).¹

¹Cabe salientar que, devido ao número reduzido de indivíduos que buscaram abrigo durante os 2 minutos, decidimos não avaliar o tempo decorrido até a busca pelo abrigo. Optamos, em vez disso, por verificar se havia diferença entre os grupos controle e experimental quanto ao número de animais que escolheram se esconder.

5.2.2. Teste de resposta de escape (fuga)

A exposição prévia ao estímulo tátil aversivo não alterou significativamente o comportamento de fuga (escape) dos animais em resposta ao estímulo mecânico aplicado ao dorso (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de camarões *Macrobrachium* que apresentaram ao menos uma resposta de fuga ao estímulo mecânico aplicado no dorso, considerando a exposição prévia ou não ao estímulo tátil aversivo.

comportamento	Controle	Experimental	
Apresenta fuga	8	12	20
Não apresenta fuga	4	2	6
Total	12	14	26

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos; $p > 0,05$ (teste exato de Fisher).

6. DISCUSSÃO

Na aprendizagem aversiva, “*uma aversão é criada em relação a um comportamento alvo, associando-o a um estímulo desagradável, como um choque elétrico*” (Litvin et al., 2008). A aprendizagem por evitação (ou esquiva) normalmente envolve o cancelamento de um evento aversivo iminente, o que pode ocorrer tanto pela emissão quanto pela inibição de uma resposta experimentalmente definida (Krypotos et al., 2015). A esquiva passiva, uma modalidade de aprendizagem aversiva, foi amplamente demonstrada em diferentes espécies, como roedores (Walters; Abel, 1971), peixes (Manuel et al., 2014) e crustáceos, incluindo caranguejos da espécie *Chasmagnathus granulatus* (Denti; Dimant; Maldonado, 1988; Kawai; Kono; Sugimoto, 2004). Nesses estudos, os animais evitavam ou apresentavam maior latência para ingressar em um compartimento associado a choques elétricos, quando comparado a um compartimento sem pareamento com o estímulo aversivo. Outro tipo de aprendizagem aversiva, a esquiva ativa, também foi identificado em lagostins (*P. clarkii*), que escapavam de choques elétricos associados a estímulos luminosos (Kawai; Kono; Sugimoto, 2004).

É importante destacar que o comportamento de fuga se caracteriza pelo afastamento de um animal diante de um evento aversivo já em curso, enquanto o comportamento de esquiva refere-se à tentativa de evitar um evento nocivo futuro, previsto por um estímulo deflagrador (também denominado por alguns autores como antecedente). A proximidade temporal ou factualidade da ameaça é o que distingue a esquiva da fuga: na esquiva, a ameaça é iminente ou potencial; na fuga, ela já está em andamento (Krypotos et al., 2015).

No presente estudo, desenvolvemos e utilizamos um aparato específico (Figura 2) com o objetivo de associar um estímulo aversivo à entrada dos animais em uma região determinada do aparelho, a fim de avaliar a capacidade dos camarões de adquirir memória associada ao evento aversivo. Embora a maioria dos estudos utilize correntes elétricas para induzir experiências desagradáveis, optamos por empregar um estímulo tátil associado a um componente visual. Essa escolha se baseia no fato de que, na natureza, camarões e outros animais frequentemente recorrem à visão e, especialmente, ao tato para detectar ameaças de indivíduos da mesma espécie ou predadores, acionando respostas comportamentais subsequentes. De fato, em nosso estudo, respostas de fuga ao contato físico na região dorsal dos camarões foram observadas com alta frequência, corroborando tanto os dados disponíveis na literatura (Takahashi, 2022) quanto a pertinência da escolha do estímulo.

A exposição aguda foi suficiente para que os animais associassem o ambiente (parte frontal do aparato) ao estímulo tátil aversivo, como evidenciado pela tendência ou pelo aumento significativo no tempo de permanência na parte posterior do equipamento nos primeiro e terceiro minutos, respectivamente, após a exposição ao estímulo. Além disso, observamos uma tendência à redução do tempo de permanência na parte frontal do aparelho no primeiro minuto, com uma diminuição significativamente maior no período de três minutos nos animais estressados. No entanto, não houve retenção de memória ao estímulo aversivo tátil decorridas 24 horas, pois os animais experimentais não apresentaram esquiva passiva nos tempos avaliados (1, 3 e 10 minutos) após serem novamente colocados no aparato, como evidenciado pela ausência de diferenças significativas entre os grupos no tempo de permanência dos camarões nos três quadrantes do equipamento.

Embora a exposição a um único choque elétrico tenha sido capaz de produzir esquiva passiva em caranguejos da espécie *C. granulatus* (Denti; Dimant; Maldonado, 1988) e em lagostins da espécie *Procambarus virginalis* (Okada et al., 2021), a aprendizagem aversiva é um fenômeno que geralmente requer exposições repetidas a estímulos desagradáveis ou perigosos, como demonstrado em estudos com diferentes espécies (Walters; Abel, 1971; Kawai; Kono; Sugimoto, 2004; Manuel et al., 2014). Uma possível explicação para as nossas observações é que a exposição aguda utilizada (20 minutos em uma única sessão) tenha sido insuficiente para induzir retenção prolongada de memória ao evento aversivo. Além disso, a qualidade e/ou intensidade do estímulo empregado podem não ter sido adequadas. Embora o intervalo de reavaliação do teste (24 horas) possa ser considerado um fator para explicar a ausência de memória detectável, já que esta poderia ter sofrido extinção, acreditamos que inspeções mais precoces sob as mesmas condições não seriam produtivas. Isso se justifica pelo fato de que, em nosso estudo, o tempo de retenção da memória dos camarões após exposição aguda ao estímulo aversivo foi de apenas 3 minutos. A literatura aponta que a retenção de memória em caranguejos e lagostins submetidos a um único choque elétrico pode durar até 3 e 24 horas, respectivamente (Denti; Dimant; Maldonado, 1988; Okada et al., 2021). As diferenças observadas entre o nosso estudo e esses achados provavelmente estão relacionadas não apenas às espécies avaliadas, mas também à intensidade significativamente maior do estímulo aversivo utilizado naqueles casos (Denti; Dimant; Maldonado, 1988; Okada et al., 2021).

Contudo, ao serem expostos a um ambiente novo, mesmo após 24 horas do estímulo aversivo, os animais experimentais continuaram a apresentar diferenças comportamentais

significativas em relação ao grupo controle. Observamos que os animais estressados apresentaram maior tigmotaxia, ou seja, permaneceram mais tempo próximos à parede do campo aberto (Figura 9B). Este comportamento é influenciado por fármacos ansiolíticos ou ansiogênicos, que podem reduzir ou aumentar sua intensidade, respectivamente, tanto em roedores (Simon; Dupuis; Costentin, 1994) quanto em peixes (Schnörr et al., 2012). Adicionalmente, a tigmotaxia também foi relatada em humanos. Pacientes com transtornos de ansiedade, como a agorafobia – marcada, entre outros fatores, pelo medo excessivo de espaços abertos – apresentaram maior tigmotaxia durante caminhadas pela cidade, evitando atravessar áreas abertas, como uma praça, enquanto indivíduos saudáveis optaram por trajetos mais curtos, que incluíam essas áreas (Walz; Mühlberger; Pauli, 2016). Assim, considerando sua validação farmacológica em peixes (Schnörr et al., 2012) e mamíferos (Simon; Dupuis; Costentin, 1994), o aumento da tigmotaxia observado em nosso estudo sugere os indivíduos de *Macrobrachium* podem ter desenvolvido um estado semelhante à ansiedade, descrito em vertebrados de diferentes espécies (Simon; Dupuis; Costentin, 1994; Schnörr et al., 2012; Walz; Mühlberger; Pauli, 2016). Isso indica que o estímulo tátil que empregamos foi possivelmente interpretado como ameaçador pelos camarões do referido gênero. Por fim, é relevante destacar que alterações na tigmotaxia avaliadas em campo aberto 24 horas após a exposição repetida a estímulos ameaçadores (como perseguição com rede) também foram observadas em camarões da espécie *Neocaridina denticulata* (Takahashi, 2022).

Além de permanecerem por mais tempo próximos às paredes do campo aberto, os animais do grupo experimental apresentaram maior imobilidade nessa região em comparação ao grupo controle (Figura 9C). A imobilidade é um comportamento comumente observado em crustáceos e tem sido interpretada como um mecanismo de defesa contra a predação (Bergey; Weis, 2006). De maneira similar, lagostins (*P. clarkii*) submetidos a choques elétricos não apenas evitaram os braços iluminados e aversivos de um labirinto aquático em cruz, como também frequentemente pararam antes de entrar nesses braços e optaram por não o fazer (Fossat et al., 2014). Esse comportamento se assemelha à avaliação de risco descrita em roedores no clássico labirinto em cruz elevado (Rodgers; Dalvi, 1997). É importante destacar que a mobilidade geral dos animais previamente estressados no campo aberto não foi significativamente alterada (Figura 9D). Assim, o aumento da imobilidade observado nos camarões não pode ser atribuído a uma redução geral na atividade locomotora dos animais. Dessa forma, a diminuição na mobilidade próxima à parede do campo aberto reforça a hipótese de que camarões *Macrobrachium* desenvolveram um estado semelhante à ansiedade.

Contudo, validações farmacológicas são essenciais para fortalecer essa hipótese, e experimentos futuros devem avaliar a sensibilidade dessas alterações comportamentais, incluindo o aumento da tigmotaxia, a fármacos ansiolíticos.

O nível de estresse ao qual os animais do nosso estudo foram submetidos não foi suficiente para induzir busca por abrigo (Tabela 1). Os animais estavam habituados ao fragmento de cano empregado como esconderijo, pois ele já estava presente no aquário durante o período de aclimação e era frequentemente utilizado como refúgio, comportamento típico de camarões, inclusive *Macrobrachium* (Carvalho-Batista et al., 2023; Mariappan et al., 2003). Como as alterações comportamentais observadas nos animais sugerem que eles desenvolveram um estado semelhante à ansiedade, seria esperado que os camarões demonstrassem maior busca por abrigo. A ausência em observar tal comportamento pode ser atribuída não apenas à insuficiência do estímulo aplicado, mas também à habituação dos animais ao campo aberto. Deve-se considerar que os camarões estavam no aparelho experimental por 2 minutos antes que a possibilidade de refúgio fosse introduzida (com a inserção do cano). Esse período pode ter sido suficiente para reduzir o nível de estresse causado pela exposição ao ambiente novo, diminuindo também a motivação para buscar abrigo. A habituação parece ocorrer rapidamente nesses animais nas condições experimentais que empregamos, conforme sugerido pela observação de que, após 3 minutos da interrupção da ameaça, camarões estressados começaram a exibir comportamentos semelhantes aos do grupo controle no teste de condicionamento aversivo. Outra hipótese relevante é o dimorfismo sexual. Estudos mostram que, exceto em fêmeas ovígeras, indivíduos do sexo feminino da espécie *Macrobrachium nobilii* têm menor probabilidade de adquirir e manter abrigos em comparação aos machos (Mariappan et al., 2003). Como nosso estudo não separou os animais por sexo, esse fator pode ter influenciado os resultados. Estudos futuros devem considerar essa variável para esclarecer possíveis diferenças sexuais na resposta à busca por refúgio.

De maneira também inesperada, os animais submetidos ao estímulo tátil ameaçador não exibiram uma resposta de escape mais pronunciada que a dos controles (Tabela 2). Resultados semelhantes foram relatados por Takahashi (2022) ao estudar camarões da espécie *N. denticulata*, que mostraram uma tendência maior em apresentar tigmotaxia e redução significativa da mobilidade na área central do campo aberto 24 horas após sucessivas perseguições com rede, mas não demonstraram aumento na resposta de escape frente a estímulos mecânicos. Dito de outra forma, os animais no estudo de Takahashi (2022) também apresentaram comportamentos associados à ansiedade, mas não escaparam com maior

frequência frente a uma ameaça. Em nosso experimento, observamos que os animais controles exibiram uma taxa de escape particularmente elevada. Apesar do período significativo de adaptação ao laboratório antes do início dos experimentos (21 dias), é possível que, por se tratar de animais selvagens habituados a ameaças frequentes em seu habitat (como aves e peixes predadores), esses camarões já apresentem um comportamento intrinsecamente "arisco". Esse fator pode indicar que a resposta de escape está próxima de seu limite máximo de expressão comportamental, tornando-a pouco sensível a estímulos adicionais. Por outro lado, a resposta de escape pode ser útil em avaliações futuras que visem validar estratégias para redução do estresse, incluindo intervenções farmacológicas com ansiolíticos.

7. CONCLUSÕES

Os dados deste estudo piloto sugerem que camarões *Macrobrachium* expostos agudamente a estímulo tátil que restringiu o nado livre desenvolveram um estado semelhante à ansiedade observada em vertebrados de diversas espécies. Dessa forma, é provável que o estímulo empregado tenha sido interpretado como uma ameaça pelos camarões.

Embora a ameaça tenha induzido retenção de memória de curtíssimo prazo (3 minutos) as alterações comportamentais observadas 24 horas após a exposição ao estímulo aversivo indicam algum grau de permanência cognitiva associada a ele.

Além disso, a alta taxa de escape observada nos indivíduos controle de *Macrobrachium* spp. sugere que esse comportamento pode ser pouco sensível à exposição a estímulos estressantes, mas ainda assim pode ser útil na avaliação de estratégias destinadas a reduzir a reatividade comportamental dos camarões.

Os resultados apresentados neste estudo piloto precisam ser confirmados e validados farmacologicamente, por meio do uso de fármacos ansiolíticos, além de experimentos que exponham os animais repetidamente ao estímulo ameaçador e/ou utilizem estímulos mais intensos, como a exposição a choques elétricos, técnica amplamente empregada na literatura.

Por fim, o possível dimorfismo sexual, especialmente relacionado ao comportamento de busca por abrigo, deve ser considerado nas futuras avaliações comportamentais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, Charles I.; FEINMAN, Richard D. Operant punishment of eye elevation in the green crab, *Carcinus maenas*. **Behavioral and neural biology**, v. 48, n. 2, p. 259-277, 1987.

ABRAMSON, Charles I.; FEINMAN, Richard D. Lever-press conditioning in the crab. **Physiology & behavior**, v. 48, n. 2, p. 267-272, 1990.

APPLEWHITE, Philip B. Non-local nature of habituation in a rotifer and protozoan. **Nature**, v. 217, n. 5125, p. 287-288, 1968.

BACQUÉ-CAZENAVE, Julien et al. Social harassment induces anxiety-like behaviour in crayfish. **Scientific reports**, v. 7, 2017

BECKERS, Tom et al. Understanding clinical fear and anxiety through the lens of human fear conditioning. **Nature Reviews Psychology**, v. 2, n. 4, p. 233-245, 2023.

BERGEY, Lauren; WEIS, Judith S. Immobility in five species of fiddler crabs, genus *Uca*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 26, n. 1, p. 82-84, 2006.

CARVALHO-BATISTA, Abner et al. Shelter preference and variation in the daily activity pattern of the ornamental shrimp *Neocaridina davidi* (Caridea: Atyidae). **Nauplius**, v. 31,, 2023.

DAVIES, Ross et al. Maze learning and memory in a decapod crustacean. **Biology letters**, v. 15, 2019.

DENTI, Alicia; DIMANT, Beatriz; MALDONADO, Hector. Passive avoidance learning in the crab *Chasmagnathus granulatus*. **Physiology & behavior**, v. 43, n. 3, p. 317-320, 1988.

DOS SANTOS, Antonina; HAYD, Liliam; ANGER, Klaus. A new species of *Macrobrachium* Spence Bate, 1868 (Decapoda, Palaemonidae), *M. pantanalense*, from the Pantanal, Brazil. **Zootaxa**, v. 3700, n. 4, p. 534-546, 2013.

EICHENBAUM, Howard. The cognitive neuroscience of memory: An introduction. Oxford University Press, 2011.

FOSSAT, Pascal et al. Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. **Science**, v. 344, n. 6189, p. 1293-1297, 2014.

KAWAI, Nobuyuki; KONO, Reiko; SUGIMOTO, Sanae. Avoidance learning in the crayfish (*Procambarus clarkii*) depends on the predatory imminence of the unconditioned stimulus: a behavior systems approach to learning in invertebrates. **Behavioural Brain Research**, v. 150, n. 1-2, p. 229-237, 2004.

KRYPTOS, Angelos-Miltiadis et al. Avoidance learning: a review of theoretical models and recent developments. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 9, p. 189, 2015.

LITVIN, Y. et al. Aversive Learning. Binder, MD, Hirokawa, N., Windhorst, U.(eds) **Encyclopedia of Neuroscience**, 2008.

MARIAPPAN, Pitchaimuthu; BALASUNDARAM, Chellam. Sheltering behaviour of *Macrobrachium nobilii* (Henderson and Matthai, 1910). **acta ethologica**, v. 5, p. 89-94, 2003.

MANUEL, Remy et al. Inhibitory avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*): effects of shock intensity and unraveling differences in task performance. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 341-352, 2014.

MAZA, Francisco Javier; URBANO, Francisco José; DELORENZI, Alejandro. Aversive memory conditioning induces fluoxetine-dependent anxiety-like states in the crab *Neohelice granulata*. **Journal of Experimental Biology**, v. 226, 2023.

NOGUEIRA, Caio dos Santos. A análise interdisciplinar comparativa entre os camarões *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) e *Macrobrachium pantanalense* (Dos Santos, Hayd & Anger, 2013) suporta a diferenciação interespecífica?. 2023.

OKADA, Shione et al. Aversive operant conditioning alters the phototactic orientation of the marbled crayfish. **Journal of Experimental Biology**, v. 224, 2021.

OLSON, G. S.; STRANDBERG, R. Instrumental conditioning in crayfish: Lever pulling for food. In: **Soc Neurosci Abstr.** 1979. p. 257.

PERRY, Clint J.; BARRON, Andrew B.; CHENG, Ken. Invertebrate learning and cognition: relating phenomena to neural substrate. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 4, n. 5, p. 561-582, 2013.

PRIBADI, Amy K.; CHALASANI, Sreekanth H. Fear conditioning in invertebrates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 16, 2022.

RODGERS, R. J.; DALVI, Allan. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

RUPPERT, Edward. **Zoologia dos invertebrados**. 1996.

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 2, p. 367-374, 2012.

SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural brain research**, v. 61, n. 1, p. 59-64, 1994.

SNYDER, Mark J.; WATSON, Susan; PEEKE, Harman VS. Lobster locomotor activity as a measure of GABAAreceptor modulation. **Marine & Freshwater Behaviour & Phy**, v. 34, n. 1, p. 37-51, 2000.

STAFSTROM, Carl E.; GERSTEIN, George L. A paradigm for position learning in the crayfish claw. **Brain research**, 1977.

TAKAHASHI, Kohji. Changes in the anxiety-like and fearful behavior of shrimp following daily threatening experiences. **Animal cognition**, v. 25, n. 2, p. 319-327, 2022.

TIERNEY, Ann Jane; LEE, Jennifer. Spatial learning in a T-maze by the crayfish *Orconectes rusticus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 125, n. 1, p. 31, 2011.

TIERNEY, Ann Jane; ANDREWS, Kate. Spatial behavior in male and female crayfish (*Orconectes rusticus*): learning strategies and memory duration. **Animal cognition**, v. 16, p. 23-34, 2013.

TOMINA, Yusuke; TAKAHATA, Masakazu. A behavioral analysis of force-controlled operant tasks in American lobster. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 1, p. 108-116, 2010.

VARGAS-VARGAS, Ilse Lorena et al. Evidence of long-term allocentric spatial memory in the Terrestrial Hermit Crab *Coenobita compressus*. **Plos one**, v. 18, 2023.

WALTERS, Gary C.; ABEL, Ernest L. Passive avoidance learning in rats, mice, gerbils, and hamsters. **Psychonomic Science**, v. 22, n. 5, p. 269-270, 1971.

WALZ, Nora; MÜHLBERGER, Andreas; PAULI, Paul. A human open field test reveals thigmotaxis related to agoraphobic fear. **Biological psychiatry**, v. 80, n. 5, p. 390-397, 2016.

APÊNDICE

ANEXO I - [Licença permanente para coleta de material zoológico](#)

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 73517-5

Data da Emissão: 17/06/2024 19:49:29

Dados do titular

Nome: Ariádine Cristine de Almeida	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Todos os membros da equipe de pesquisa devem estar cientes das recomendações e boas práticas a serem seguidas neste momento de emergência zoonossanitária no Brasil devido à gripe aviária. Informe-se na página do CEMAVE na Internet: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cemave/destaques/gripe-aviaria/gripe-aviaria-1 .
3	Este documento não dispensa o cumprimento da Lei nº 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.
4	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia (Decreto nº 98.830, de 15/01/90).
5	A licença permanente não é válida para: a) realização de atividades envolvendo táxons que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna; e e) manejo para conservação de fauna e flora silvestre in situ previsto em plano de ação nacional do Instituto Chico Mendes, programa de manejo populacional do Instituto Chico Mendes ou plano de manejo de unidade de conservação federal. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
6	Os titulares da licença permanente para a coleta de material zoológico devem declarar, por meio do Sisbio, o Registro de Expedição, sendo-lhes concedido automaticamente o comprovante.
7	Este documento NÃO exige o titular de cumprir as obrigações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde serão realizadas as atividades.
8	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos
9	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa nº 7/2021/GABIN/ICMBIO, que Estabelece normas para a atividade de marcação de aves silvestres na natureza no território nacional e para utilização do Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres - SNA
10	O pesquisador titular da licença permanente pode ser co-responsabilizado pelas condutas e atividades lesivas ao meio ambiente dos membros da equipe
11	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
12	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
13	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação do disposto nesta portaria ou em legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, pode, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou cassada pelo Instituto Chico Mendes, por meio da Coordenação Gestora do Sisbio, e está sujeito às sanções previstas na legislação vigente.
14	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício efetivo do pesquisador com a instituição científica nacional que tenha por lei a atribuição de coletar material zoológico.
15	Caso seja identificada a ocorrência de espécie exótica dentro ou no entorno de UNIDADE DE CONSERVAÇÃO FEDERAL, além de descrever no relatório de atividades, o pesquisador deve informar à equipe gestora com maior brevidade possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0735170520240617

Página 1/3

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 73517-5	Data da Emissão: 17/06/2024 19:49:29
-----------------	--------------------------------------

Dados do titular

Nome: Ariádine Cristine de Almeida	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Classe	Animalia > Arthropoda > Malacostraca

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade do Estado de Minas Gerais	Laboratório
2	Universidade Federal de Uberlândia	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 73517-5	Data da Emissão: 17/06/2024 19:49:29
-----------------	--------------------------------------

Dados do titular

Nome: Ariádine Cristine de Almeida	[REDACTED]
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com Portaria ICMBIO Nº 748, Art. 24. A coleta imprevista de amostras biológicas, espécimes ou de material abiótico em unidades de conservação e cavernas, não contemplados na autorização ou na licença permanente, deve ser imediatamente anotada em campo específico do documento.

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0735170520240617

Página 3/3