

Priscilla Aparecida Dantas Araujo

Aspectos comportamentais e fisiológicos da
aprendizagem não associativa em
Holothuroidea

Behavioral and physiological aspects of non-associative
learning in Holothuroidea

São Paulo
2022

Priscilla Aparecida Dantas Araujo

Aspectos comportamentais e fisiológicos da
aprendizagem não associativa em
Holothuroidea

Behavioral and physiological aspects of non-associative
learning in Holothuroidea

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
a obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na área de
Fisiologia Geral.

Orientador(a): Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

São Paulo
2022

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo autor.

Aparecida Dantas Araujo, Priscilla
Aspectos comportamentais e fisiológicos da
aprendizagem não associativa em holothuroidea /
Priscilla Aparecida Dantas Araujo; orientador
Marcio Reis Custódio -- São Paulo, 2022.
87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo. Programa
de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. comportamento. 2. aprendizagem. 3. habituação.
I. Reis Custódio, Marcio, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação: Elisabete da Cruz Neves - CRB -
8/6228

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr (a)

Prof (a). Dr (a)

Prof (a). Dr (a)

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Orientador(a)

“A minha mãe Vera (em memória),
que queria tanto ver esse momento...

Mas eu sei que não importa
onde você está agora,
com certeza está orgulhosa de mim.”

“Ao meu namorado Diego
que esteve presente em tudo e em todos os
momentos e me ajudou de todas as maneiras.”

“O segredo, querida Alice, é rodear-se de pessoas que te façam sorrir o coração. É então, só então que estarás no país das maravilhas”

Lewis Carroll

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer muito ao meu orientador Márcio Reis Custódio, por aceitar trabalhar com comportamento desde a iniciação, os puxões de orelhas quando necessário, aos ensinamentos de coletas, pelas conversas e por ser um grande orientador.

Aos meus pais Vera (em memória) e Fernando, meu irmão Bruno (cherie) e o Rafael pelo apoio e ajuda em alguns momentos. Vou te contar, terminar essa dissertação foi uma grande luta devido a tudo que aconteceu, e eu não poderia deixar de agradecer eternamente a minha mãe por todo apoio que ela me deu até o final. O sonho dela era me ver na minha defesa e com o diploma... Bem mãezinha, você está me vendo do céu... Te Amo e Obrigada por tudo!

Ao meu namorado Diego que vem me incentivando há muitos anos e me ajudou em diversos momentos, desde os bons e ruins, ao desespero de experimentos errados, a vários dias de coletas e carregar água do mar, impossível agradecer o suficiente. MUITO OBRIGADA.

Ao Dr. Vinicius Queiroz, amigo de lab, orientador de tcc, coorientador do mestrado, parceiro de coleta e muito mais, obrigada por toda a sua ajuda desde que eu entrei no laboratório e muito mais.

Ao pessoal do laboratório, que tornam meus dias super alegres, com as coletas divertidas e ótimas experiências, muito obrigada Gabriel, Michelle, Mariana, Beatriz, Liv, as agregadas, Licia e Priscila e ao técnico Vagner, que sempre nos ajudou com as suas "gambiarras".

A minha querida amiga Dr. Priscila Rocco, por todo companheirismo, conversas, almoços juntas, desabafos e por toda a ajuda e aulas para entender o funcionamento dos antidepressivos e neurotransmissores, muito obrigadaaaa!!

Ao Dr. Antelmo Fernandes de Souza, por toda a sua ajuda desde o começo do mestrado, muitas coisas eu não teria conseguido sem você. Muito Obrigada!

As minhas amigas da vida, Tatiane e Viviane, que me apoiam e me acompanham a anos, e por mais que tenha distância, sempre estamos juntas.

À Alessandra Majer, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos professores Maria Aparecida Visconti, Zulma Ferreira Silva e Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes pelas dicas e comentários na banca de qualificação.

Aos funcionários do Cebimar, Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia, por permitir o uso da infraestrutura para realização do projeto. Também agradeço enormemente a Capes que me concedeu e manteve minha bolsa de pesquisa durante tempos incertos.

A agência capes pelo financiamento, sem ela este projeto não teria sido possível.

A todos que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho: muito obrigada.

SUMÁRIO

Organização da dissertação	11
Resumo geral	12
Abstract	13
Introdução	14
Aprendizagem não associativa	14
Aprendizagem associativa	16
Estudos de aprendizagem em invertebrados	18
Objetivos	21
Referencias	22
Capítulo 1 – Non-associative learning in Holothuroidea the establishment of an echinoderm as a model and the effect of a different parameters on the process	29
Abstract	29
Introduction	30
Materials and methods	33
Preliminary tests and model choice	34
Habituation process in <i>Holothuria grisea</i>	35
Species and age effect on the habituation process in Holothuroidea	36
Statistical analyses	37
Results	37
The habituation process in <i>Holothuria grisea</i>	37
Species and age effect on the habituation process.....	39
Discussion.....	43
References	48
Capítulo 2 – Como diferentes parâmetros afetam o comportamento defensivo em <i>Holothuria grisea</i>	55
Resumo	56
Introdução	56
Materiais e métodos	59
Coleta e manutenção de animais	59
Efeito do local de estimulação sobre a habituação do comportamento defensivo	58
Efeito da experiência prévia sobre a habituação do comportamento defensivo	60
Efeito do fotoperíodo sobre a habituação do comportamento defensivo	61
Parâmetros avaliados e análises estatísticas	61
Resultados	62
Efeito do local de estimulação sobre a habituação do comportamento defensivo	62
Efeito da experiência prévia sobre a habituação do comportamento defensivo	63
Efeito do fotoperíodo sobre o processo de habituação oral e caudal	68
Discussão	69
Conclusão	72
Referências	74
Discussão geral e perspectivas	83
Referências	86

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1

Figure 1. *Holothuria grisea* during the habituation process. **A** – Animal completely relaxed in the arena, before trial; **B** – Relaxed animal leaning the tentacles on the glass wall; **C** – Semi-relaxed animal, with a partially opened mouth leaning on the glass wall; **D** – Animal after the first mechanical stimulation, showing the tapered oral region. **Legend:** **AP** = Ambulacral podia; **M** = mouth; **OR** = Oral region, **Pa** = Papillae; **TAR** = Tapered anterior region; **Te** = Tentacle. **Scale:** **A = 3 cm B and D = 2 cm; C = 1,5 cm**.....38

Figure 2. Main parameters analyzed during the habituation process in different species of Holothuroidea. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) among species.....42

Figure 3. Habituation parameters in individuals of *Holothuria grisea* of different ages. A-D – Correlation between habituation parameters and body length. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) among species.....43

Table 1. Behavioral characteristics of relaxed and disturbed animals.....35

Table 2. Main parameters analyzed during the habituation process. Values are expressed as Mean \pm Standard Deviation followed by Minimum and Maximum. Legend: HF = Habituation Frequency; HT = Habituation Time; SRT = Spontaneous Recovery Time; TRA = Time to Respond Again; MTTR = Mean Time of Tentacle Response39

Table 3. Specific Time of Tentacle Response (STTR) to each mechanical stimulation (MS) during the habituation process. Values are expressed as Mean \pm Standard Deviation followed by Minimum and Maximum.....41

Capítulo 2

Figura 1: Efeito da estimulação de diferentes regiões sobre o processo de habituação caudal e oral da *Holothuria grisea*. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....63

Figura 2: Efeito da experiência prévia de curto prazo sobre o processo de habituação oral e caudal em *Holothuria grisea*. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes habituações orais, enquanto letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) na região caudal. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre regiões oral e caudal. No gráfico, somente os resultados mais expressivos são mostrados (1°, 2° e última habituação), mas os resultados completos podem ser vistos na Tabela 2.....65

Figura 3: Efeito da experiência prévia de longo prazo sobre o processo de habituação oral e caudal em *Holothuria grisea*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) na mesma região corporal. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre regiões corporais.....67

Figura 4: Efeito do fotoperíodo sobre o processo de habituação oral em *Holothuria grisea*. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....68

Tabela 1: Principais parâmetros analisados durante o processo de habituação caudal e oral da *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.....63

Tabela 2: Parâmetros analisados durante as sessões de habituação oral e caudal na espécie *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.....65

Tabela 3: Principais parâmetros analisados durante o processo de habituação de longo prazo na região oral e caudal da *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.....67

Tabela 4: Principais parâmetros analisados durante as sessões de habituação em relação ao claro e escuro da *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.....68

Figura 1: Parâmetros de habituação com diferentes concentrações dos fármacos – fluoxetina e sertralina e o neurotransmissor serotonina (em $\mu\text{g/g}$). As cores indicam as diferentes concentrações. Letras ‘a’ indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (wild type), enquanto as letras ‘b’ indicam diferenças estatísticas significativas referentes ao grupo de solução salina ($p < 0,05$).....85

Além dos tópicos Introdução Geral, esta monografia tem mais dois capítulos escritos sob a forma de manuscritos que estão sendo submetidos para publicação. A formatação de cada um dos textos está de acordo com a revista a qual se pretende submetê-los.

O capítulo 1 intitulado “Aprendizagem não associativa em holothuria: o estabelecimento de um equinoderma como modelo e o efeito de diferentes parâmetros no processo” traz novas informações sobre os mecanismos básicos da aprendizagem, investigando como a idade afeta a habituação, além de fornecer parâmetros úteis para abordar o processo.

O capítulo 2 intitulado “Como diferentes parâmetros afetam o comportamento defensivo em equinodermos? Insights em relação à aprendizagem não associativa em *Holothuria grisea*” traz informações sobre o quanto a experiência prévia e o fotoperíodo podem modular o comportamento defensivo na espécie *Holothuria grisea*.

Resumo Geral

A aprendizagem pode ser definida como um processo pelo qual uma atividade tem origem ou é modificada e ela é dividida em dois mecanismos principais, que são a aprendizagem não associativa e associativa. O primeiro é considerado a forma mais simples do aprendizado, sendo dividido em dois subgrupos – habituação e sensibilização. A habituação é a forma mais simples, na qual um estímulo único e simples é apresentado repetidamente, já a sensibilização é mais complexa, na qual o indivíduo aprende a fortalecer as suas respostas após a aplicação repetida a um estímulo mais alarmante. Entretanto, na aprendizagem associativa, um indivíduo aprende sobre a relação entre dois estímulos e eventos, citando as duas principais, o condicionamento clássico ocorre por meio de associações entre um estímulo ambiental e um estímulo que não acontece naturalmente, enquanto o condicionamento operante é utilizado reforços para elevar ou decair a probabilidade de que um comportamento volte a ocorrer no futuro. Ambos os reforços têm como propósito ensinar e reforçar um determinado comportamento. Muito do conhecimento acerca do processo de aprendizagem advém de estudos com invertebrados, porém para os equinodermos o conhecimento se restringe a poucos trabalhos experimentais de cunho comportamental. Este trabalho teve como objetivo trazer novas informações sobre os mecanismos básicos de aprendizagem em Echinodermata, investigando como a idade e as espécies afetam a habituação, bem como fornecer parâmetros úteis para abordar o processo.

Palavras-chave: Aprendizagem, comportamento, equinodermos, habituação, invertebrado.

Abstract

Learning can be defined as a process by which an activity originates or is modified, and it is divided into two main mechanisms, which are non-associative and associative learning. The first is considered the simplest form of learning, being divided into two subgroups – habituation and sensitization. Habituation is the simplest form, in which a single, simple stimulus is repeatedly presented, while sensitization is more complex, in which the individual learns to strengthen their responses after repeated application to a more alarming stimulus. However, in associative learning, an individual learns about the relationship between two stimuli and events, citing the two main ones, classical conditioning occurs through associations between an environmental stimulus and a stimulus that does not occur naturally, while operant conditioning is used as reinforcements to raise or lower the probability that a behavior will reoccur in the future. Both reinforcements are intended to teach and reinforce a certain behavior. Much of the knowledge about the learning process comes from studies with invertebrates, but for echinoderms, knowledge is restricted to a few experimental works of a behavioral nature. This work aimed to bring new information about the basic learning mechanisms in Echinodermata, investigating how age and species affect habituation, as well as providing useful parameters to approach the process.

Keywords: Learning, behavior, echinoderm, habituation, invertebrate.

Aprendizagem pode ser definida como um processo pelo qual uma atividade tem origem ou é modificada pela reação a um dado estímulo ou situação (Hilgard, 1973). Não há uma definição sobre aprendizagem que seja universalmente aceita, porém, um ponto de vista importante sobre a aprendizagem é capturado na definição de Domjan (2006), que denomina que “a aprendizagem é uma das mudanças nos mecanismos de comportamento envolvendo estímulos específicos e/ou respostas que resultam da experiência com esses estímulos ou respostas semelhantes”

O processo de aprendizagem pode ser dividido em dois mecanismos principais: aprendizagem não associativa e a associativa. O primeiro é considerado uma forma menos complexa de aprendizagem, na qual há um estímulo seguido de uma resposta, como na habituação e na sensibilização. Por outro lado, na aprendizagem associativa, um indivíduo aprende sobre a relação entre dois estímulos ou eventos. Neste último estão incluídos o condicionamento clássico e o operante (Hawkins e Byrne, 2015).

Aprendizagem não associativa

Aprendizagem não associativa é considerada como uma forma mais simples e essencial da aprendizagem, que não necessita de associações e emparelhamento com outros estímulos, fazendo com que haja uma alteração na resposta após a exibição de um único estímulo. Há dois tipos principais de aprendizagem não associativa: a habituação e a sensibilização. (Pereira e Van der Kooy, 2013; Loannou e Hadjcharalambous, 2021; Squire e Kandel, 2003).

A habituação é a forma mais simples do aprendizado não associativo, e pode ser definida como uma “diminuição progressiva da amplitude ou da frequência de uma resposta motora à estimulação sensorial repetida, e não é causada nem por adaptação do receptor sensorial nem pela fadiga motora” (Schmid *et al.*, 2015). Foram os estudos de Thompson e Spencer (1966) e Thompson e Groves (1970) que estabeleceram as bases teóricas do processo

de habituação, e posteriormente foram atualizadas com o trabalho de Rankin *et al.* (2009).

Vários estudos já mostraram que a habituação pode ser uma modificação comportamental prolongada (e.g. Davis, 1978; Jordan e Leaton, 1983), o que indica que a duração deste comportamento pode variar. Assim, a habituação pode ser de curto prazo (*short-term* - ST), durando entre segundos a horas, e sendo avaliada por meio do declínio da resposta dentro da sessão de teste; ou pode ser de longo prazo (*long-term* - LT), se estendendo entre dias a semanas, e sendo uma retenção da diminuição da resposta demonstrada na sessão teste (Sato, 1995; Hermitte, 1999).

A sensibilização é uma forma relativamente mais complexa de aprendizado não associativo, quando comparado a habituação. Na sensibilização, o indivíduo aprende a fortalecer as suas respostas após a aplicação repetida de um estímulo mais alarmante que o outro, o que induz um aumento na reatividade reflexa (Castellucci, 1989; Sato, 1995), e a extensão deste fenômeno depende, em parte, da intensidade deste estímulo extra (Pinsker *et al.*, 1970). Similarmente à habituação, a sensibilização também envolve a manutenção das respostas de curto e longo prazo (Sá e Madalha, 2009), e uma repetição de uma experiência pode modificar a memória de ST em memória de LT. Por exemplo, um único choque na cauda do molusco *Aplysia californica* pode diminuir a memória de ST que geralmente chega a durar minutos, enquanto uma série de choques com um espaçamento de tempo produz uma sensibilização LT que chega a durar entre dias a semanas, podendo perdurar por mais tempo (Traina, 2020).

Ambos os tipos de aprendizagem não associativa, *i.e.* habituação e sensibilização, são processos de ampla manifestação ao longo da evolução, sendo observado desde protozoários (Applewhite, 1971) até mamíferos (Vianna *et al.*, 2000; Beck *et al.*, 2002). Tal fato suporta a hipótese de que a manifestação comportamental destes processos é crítica à sobrevivência e não foi consideravelmente modificada através da evolução, pressupondo que os mecanismos celulares podem ter sido fortemente conservados através das diversas linhagens evolutivas (Rose e Rankin, 2001). Num contexto fisiológico/evolutivo, a relevância da habituação e da sensibilização parece residir em sua capacidade de possibilitar que um determinado organismo

aprenda sobre o seu meio. No caso da habituação, o organismo evitaria respostas desnecessárias a estímulos inofensivos do ambiente (Frost *et al.*, 2006), ajudando-o a aprender como e quando responder a possíveis estímulos nocivos (Srinivasa e Mohanraju, 2011). Similarmente, a sensibilização também pode ter um valor adaptativo, principalmente quando ajuda a evitar que o organismo passe por situações custosas e/ou perigosas. Por exemplo, estar sensibilizado ao som das abelhas pode ajudar com que um elefante evite os danos causados pelas suas ferroadas (Blumstein, 2016).

Por fim, embora alguns autores considerem somente habituação e sensibilização como os únicos tipos de aprendizagem não associativa (e.g. Sinervo, 2007; Poon e Schmid, 2012), outros autores pontuam que a aprendizagem associativa pode apresentar categorias adicionais, tais como desabilitação e pseudocondicionamento (Overmier, 2002; Wright, 1998). A desabilitação pode ser definida como o retorno da resposta da habituação, sendo comumente usada como um método de confirmação da ocorrência de habituação (Kenzer *et al.*, 2013). É regularmente usado para apontar se a diminuição na resposta foi devido à habituação ou a possíveis outros processos fisiológicos, tais como a fadiga muscular ou adaptação sensorial, sendo recuperada só com o passar do tempo (Frost *et al.*, 2006; Bullock *et al.*, 2009; Srinivasa e Mohanraju, 2011). Já o pseudocondicionamento, um processo descrito desde 1934 (Sears, 1934) e posteriormente detalhado em 1938 (Grether, 1938), pode ser definido como “o fortalecimento de uma resposta a um estímulo previamente neutro por meio da elicitação repetida da resposta por outro estímulo sem apresentação pareada dos dois estímulos (Cook, 1966). No entanto, o estudo do pseudocondicionamento tem sido bem restrito, sendo utilizado como um tipo de controle em estudos de condicionamento clássico.

Aprendizagem associativa

Na aprendizagem associativa, que também pode ser conhecida como condicionamento, há uma associação entre estímulos, podendo ser um ou dois estímulos, ou um estímulo e uma resposta (Andrade *et al.*, 2011). Similarmente à aprendizagem não associativa, a associativa também

apresenta algumas subdivisões, onde pode-se citar o condicionamento clássico ou Pavloviano e o condicionamento operante. O condicionamento clássico ocorre por meio de associações entre um estímulo ambiental e um estímulo que acontece naturalmente, o qual dificilmente ocorreria antes do processo de condicionamento. Por exemplo, na primeira parte deste processo é necessário um estímulo que ocorra naturalmente, e que irá provocar inconscientemente uma resposta. Durante estes processos, um estímulo dito como não condicionado resulta em uma resposta incondicionada. Neste ponto há também um estímulo neutro, que não produz nenhum efeito (ainda), não até que este estímulo esteja emparelhado com um estímulo incondicionado. Após um período de treinamento, o animal é capaz de associar os diferentes estímulos, sendo capaz de prever o segundo após o acontecimento do primeiro (Gustavson *et al.*, 1974; Garcia *et al.*, 1966). Um exemplo clássico é visto no experimento realizado por Pavlov. No primeiro processo, é dada a comida ao cachorro, um estímulo incondicional (comida) provoca uma resposta incondicional (salivação); começando o condicionamento, o som de um sino antes da apresentação da comida faz com que o cachorro salive. Um estímulo neutro (o som), por si só não seria capaz de provocar a salivação, é percebido pelo cachorro poucos segundos antes que o alimento seja dado a ele (o estímulo natural) que causa a salivação. Depois de uma série de repetições, quando o cachorro ouve o sino (estímulo condicionado), começa a salivar (resposta condicionada), antes que a comida seja dada, havendo assim a aprendizagem (Pavlov, 2003).

O condicionamento operante trata-se de uma forma de aprendizagem que se utiliza reforços positivos e negativos, e/ou punições, para aumentar ou diminuir a probabilidade de que um comportamento volte a ocorrer no futuro (Santos, 2020). Ambos os reforços têm como finalidade ensinar e reforçar um determinado comportamento, para que o organismo aprenda qual o comportamento mais adequado para chegar a um determinado propósito (Skinner, 1974). No reforço positivo, quando o procedimento desejado é atingido, uma recompensa é inserida, enquanto o condicionamento baseado em reforço negativo implica na eliminação de um estímulo desagradável. Já a punição tem como objetivo a eliminação de um determinado comportamento, fazendo que, com o passar do tempo, a possibilidade de ele ocorrer

novamente diminua. Por exemplo, quando um rato de laboratório pressiona um botão azul, ele recebe um pouco de comida como recompensa, mas quando ele aperta o botão vermelho ele recebe um choque elétrico. Como resultado, ele aprende a apertar o botão azul, mas evita o botão vermelho (Myers, 1999; Skinner, 1974; Santos, 2020). Ainda que tenha sido primeiramente descoberto em experimentos com mamíferos (*viz. Canis lúpus familiaris* – Pavlov, 1932), estes tipos mais complexos de aprendizagem – i.e. aprendizagem associativa – também têm sido mostrados por ocorrer em invertebrados (Hennessey *et al.*, 1979).

Estudos de aprendizagem com invertebrados

Diferentemente do que se poderia imaginar, muito do conhecimento acerca do processo de aprendizagem advém de estudos utilizando invertebrados (Schatz *et al.*, 1994; Faber *et al.*, 1999; Benjamin *et al.*, 2000). O uso destes modelos tem possibilitado um melhor entendimento dos aspectos comportamentais e fisiológicos relativos ao processo de aprendizagem e de formação de memória (Laurent, 1999; Menzel e Benjamin, 2013). De fato, um dos trabalhos pioneiros na área de aprendizagem foi realizado com um molusco, a espécie *Aplysia californica* (Carew *et al.*, 1972).

Existem diversas características que tornam os invertebrados importantes modelos de estudo na área de aprendizagem, tais como a possibilidade de acompanhar, identificar e/ou manipular as atividades dos neurônios (Burell e Sahly, 2001). Embora os invertebrados apresentem um sistema nervoso menos complexo em nível celular e molecular, num contexto que contém menos neurônios quando comparado ao sistema nervoso/cérebro de um vertebrado, seus neurônios são no geral tão complexos como os de qualquer vertebrado (Laurent, 1999; Burell e Sahly, 2001; Ashiley e Robertson, 2019). Desta forma, a baixa complexidade anatômica e fisiológica dos invertebrados favorece o seu uso como modelos de estudo (Hawkins *et al.*, 1983; Cassel, 2010). Esses circuitos e mecanismos neurais/celulares têm sido amplamente estudados com os invertebrados, tanto referente aos processos de aprendizagem não associativa (Kandel, 1991; 2012; Silva *et al.*, 1998;

Zaccardi *et al.*, 2001), como na aprendizagem associativa (Hawkins *et al.*, 1983; Loy *et al.*, 2021; Walters *et al.*, 1981; Dukas, 1999).

Neste contexto encontram-se os Echinodermata, organismos marinhos, bentônicos, com simetria radial pentâmera quando adultos (Pawson, 2007). Análises filogenéticas os colocam como deuterostômios, sendo um dos grupos de invertebrados mais próximos evolutivamente dos cordados (Edgecombe *et al.*, 2001). Consequentemente são evolutivamente mais relacionados com os vertebrados que os invertebrados comumente utilizados nos experimentos de aprendizagem, tais como o molusco *Aplysia*, o inseto *Drosophila melanogaster*, ou o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Roberts e Glanzman, 2003; Kasuya *et al.*, 2009 e; Ardiel e Rankin, 2010).

No filo Echinodermata, que agrupa animais tão comuns como estrelas e ouriços-do-mar, o sistema nervoso é descentralizado e bastante simplificado, sendo composto por um anel nervoso circum-oral a partir do qual se estendem nervos radiais para cada um dos braços ou regiões correspondentes a depender do grupo (e.g. ambúacro nos Holothuroidea) (Booolotiam, 1966). Porém, apesar de todas as características supracitadas, as quais os tornam modelos interessantes para estudos no âmbito da aprendizagem, poucos são os trabalhos já publicados com os equinodermos nesta área (Perry *et al.*, 2013).

Dentre o que se sabe para este grupo, o conhecimento se restringe a poucos trabalhos, sendo um deles uma observação pontual, e o outro um trabalho experimental, relacionados ao condicionamento clássico. Por exemplo, foi registrado que o ouriço-do-mar *Arbacia punctulata* reage negativamente a uma grande intensidade de luz (Holmes, 1912), enquanto o outro estudo mostrou que a estrela do mar *Luidia clathrata*, que possui uma fotorresposta negativa, é capaz de associar à escuridão com o alimento (McClintock e Lawrence, 1982). Com relação aos mecanismos eletrofisiológicos inerentes do processo de aprendizagem, nada é conhecido para os Echinodermata (Perry *et al.*, 2013).

Isso demonstra que embora o filo Echinodermata pareça ter sido negligenciado em estudos de aprendizagem, estes organismos – similarmente a outros invertebrados – podem ser modelos viáveis para experimentos na área, uma vez que publicações prévias indicam que estes organismos são

capazes de aprender (McClintock e Lawrence, 1982). Visto que equinodermos são evolutivamente mais relacionados aos vertebrados que os modelos atualmente mais estudados, informações sobre os mecanismos básicos de aprendizagem podem ser obtidos da utilização do grupo como modelo de estudo. No entanto, três aspectos importantes devem estar estabelecidos, antes que as pesquisas em aprendizagem utilizando equinodermos possa se desenvolver, que seriam: (1) o estabelecimento de um organismo modelo com características que favoreçam a sua utilização, tais como ampla distribuição, facilidade de acesso em campo, que seja de fácil manuseio, e também de fácil manutenção em laboratório; (2) o conhecimento de uma atividade ou comportamento presente neste organismo, que possa ser modulado; e (3) o estabelecimento de parâmetros que permitam avaliar se esta atividade ou comportamento escolhido foi alterado após os protocolos experimentais. Assim, em vista do tão pouco que é conhecido para os Echinodermata, a investigação e o estabelecimento destes aspectos trarão novas informações sobre os mecanismos de aprendizagem nos equinodermos.

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é trazer novas informações sobre os mecanismos básicos de aprendizagem em Echinodermata. Especificamente, este trabalho aborda as seguintes questões:

1- A investigação do melhor modelo entre diferentes equinodermos para experimentos de aprendizagem não associativa, bem como investigar se a idade do organismo afeta o processo e fornecer parâmetros úteis para abordar a habituação.

2- O estudo da resposta comportamental defensiva, bem como se a experiência prévia é capaz de afetar a intensidade da resposta defensiva e, também se parâmetros ambientais podem modular essa resposta.

Referências

- Al-Imari L, Gerlai R. (2008). Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 189(1): 216-219.
- Applewhite, P. B. (1971). Similarities in protozoan and flatworm habituation behaviour. *Nature New Biology*, 230(17), 284-285.
- Ardiel, E. L., & Rankin, C. H. (2010). An elegant mind: learning and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & memory*, 17(4), 191-201.
- Beck, K. D., Brennan, F. X., & Servatius, R. J. (2002). Effects of stress on nonassociative learning processes in male and female rats. *Integrative Physiological & Behavioral Science*, 37(2), 128-139.
- Benjamin, P. R., Staras, K., & Kemenes, G. (2000). A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learning & Memory*, 7(3), 124-131.
- Beulig, A., & Fowler, J. (2008). Fish on Prozac: effect of serotonin reuptake inhibitors on cognition in goldfish. *Behavioral neuroscience*, 122(2), 426.
- Blumstein, D. T. (2016). Habituation and sensitization: new thoughts about old ideas. *Animal behaviour*, 120, 255-262.
- Bullock, A. L., McKeown, C. L., and Robertson, M. W. (2009). Habituation and dishabituation to a vibrational stimulus by a millipede, *Orthoporus texicolens*. *Transaction of the Illinois State Academy of Science.*, 102(3-4), 199-204.
- Burrell, B. D., & Sahley, C. L. (2001). Learning in simple systems. *Current opinion in neurobiology*, 11(6), 757-764.]
- Boalotian, R. A. (1966). *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, N.Y. 822p.
- Carew, T. J., Castellucci, V. F., and Kandel, E. R. (1972). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science*, 202(4374): 1306-1308.

- Cassel, J. C. (2010). 9- Experimental Studies on the Role (s) of Serotonin in Learning and Memory Functions. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 21, 429-447.
- Cook, R. F. 1966. Pseudoconditioning of the GSR. Master's thesis submitted to the Department of Psychology, Kansas State University. (25 pp).
- Davis, M. (1970). Effects of interstimulus interval length and variability on startle response habituation in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 72: 177–192.
- Domjan, M. (2010). The principles of learning and behavior. 7Th Ed. Belmont, CA. Thomson Wardsworth.
- Edgecombe, G.D., Giribet, G., Dunn, C. W., Hejnol, A., Kristensen, R. M., Neves, R. C., Rouse, G. W., Worsaae, K., and Sørensen, M. V. (2011). Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution*. 11(2), 151-172.
- Erickson, M. T., & Walters, E. T. (1988). Differential expression of pseudoconditioning and sensitization by siphon responses in *Aplysia*: novel response selection after training. *Journal of Neuroscience*, 8(8), 3000-3010.
- Faber, T., Joerger, j., & Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural presentations of odors in the insect brain. *Natural neuroscience*. 2(1), 74-78.
- Frost W. N., Brandon C. L., Mongeluzi D. L. (1998) Sensitization of the Tritonia escape swim. *Neurobiology of Learning and Memory*. 69:126–35.
- Garcia, J., & Koelling, R. A. (1966). Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic science*, 4(1), 123-124.
- Geer, J.H. (1966). Effect of interstimulus intervals and rest-period length upon habituation of the orienting response. *Journal of Experimental Psychology*. 72: 617–619
- Gustavson, C. R., Garcia, J., Hankins, W. G., & Rusiniak, K. W. (1974). Coyote predation control by aversive conditioning. *Science*, 184, 581-583.
- Grether, W. F. (1938). Pseudo-conditioning without paired stimulation encountered in attempted backward conditioning. *Journal of Comparative Psychology*, 25(1), 91–96. doi:10.1037/h0063605.

- Jordan, W. P., & Leaton, R. N. (1983). Habituation of the acoustic startle response in rats after lesions in the mesencephalic reticular formation or in the inferior colliculus. *Behavioral Neuroscience*, 97(5), 710.
- Hackl, A. N., & Robertson, M. W. (2019). Habituation and dishabituation to a heat stimulus by woodlice, *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Armadillidiidae). *Bios*, 90(4), 239-244.
- Harvey, J. A. (2003). Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in learning. *Learning & Memory*, 10(5), 355-362.
- Hawkins, R. D., and Byrne, J. H. (2015). Associative learning in invertebrates. Cold Spring Harbor. *Perspectives Biology*, 7(5): a021709.
- Hermitte, G., Pedreira, M. E., Tomsic, D., & Maldonado, H. (1999). Context Shift and Protein Synthesis Inhibition Disrupt Long-Term Habituation after Spaced, but Not Massed, Training in the Crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of learning and memory*, 71(1), 34-49.
- Hilgard, E. (1973). *Teorias da Aprendizagem* 5 ed. São Paulo: E.P.U. p. 3
- Holmes, S. J. (1912). Phototaxis in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *Journal of Animal Behavior*, 2(2), 126.
- Kandel, E. R. (1991) Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality *Principles of neural science*, 3, 1009-1031.
- Kandel E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CRE-1, CRE-2, and CRE-3. *Molecular brain*, 5(1), 14.
- Kasuya, J., Ishimoto, H., & Kitamoto, T. (2009). Neuronal mechanisms of learning and memory revealed by spatial and temporal suppression of neurotransmission using shibirets1, a temperature-sensitive dynamin mutant gene in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11.
- Kenzer, A.L., Ghezzi, P.M., and Fuller, T. (2013). Stimulus specificity and dishabituation of operant responding in humans. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 100, 61–78.
- Kimble, G.A; Ost, J. W. (1961). A conditioned inhibitory process in eyelid conditioning. *Journal of Experimental Psychology*, 61(2), p.150.

- Kuzirian, A. M., Child, F. M., Epstein, H. T., Smith, P. J., & Tamse, C. T. (1996). Lead affects learning by *Hermisenda crassicornis*. *The Biological Bulletin*, 191(2), 260-261.
- Laurent, G. (1999). Dendritic processing in invertebrates: a link to function. In *Dendrites* (pp. 290-309). Oxford University Press.
- Menzel, R., & Benjamin, P. R. (2013). Beyond the cellular alphabet of learning and memory in invertebrates. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 22, pp. 3-5). Elsevier.
- Miller, N. E., (1967). Certain facts of learning relevant to the search for its physical basis. In Quarten, G. C., Melnechuk, T., and Schmitt, F. O. (eds.). *The Neurosciences: A Study Program*, Rockefeller University Press, New York.
- McClintock, J. B., & Lawrence, J. M. (1982). Photoresponse and associative learning in *Luidia clathrata* Say (Echinodermata: Asteroidea). *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 9(1), 13-21.
- Pavlov, I. P. (1931). The reply of a physiologist to psychologists. *Psychological Review*, 39(2), 91-127.
- Pavlov, I. P. (2003) *Conditioned Reflexes*. 2 ed. Nova Iorque: *Dover Publications*,
- Pawson, D.L. (2007) Phylum Echinodermata. *Zootaxa* p. 749-764.
- Perry, C. J., Barron, A.B., and Cheng, K. (2013) Invertebrate learning and cognition: relating phenomena to neural substrate. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science* 4(5), 561-582.
- Peeke, H.V.S. and Peeke, S.C. 1973. Habituation in fish with special reference to intraspecific aggressive behavior. In *Habituation 1* (ed. H.V.S. Peeke and M.J. Herz), pp. 59–83. Academic Press, San Diego, CA.
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., & Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the GM-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, 167(3926), 1740-1742.
- Rankin, C. H. (2004). Invertebrate learning: what can't a worm learn? *Current biology*, 14(15), R617-R618.
- Reith, M. E. (Ed.). (2000). *Cerebral Signal Transduction: From First to Fourth Messengers*. *Springer Science & Business Media*.

- Rose, J. K., and C. H. Rankin. 2001. Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*. 8: 63– 69
- Sá, C. S. C., & Medalha, C. C. (2009). Aprendizagem e memória–contexto motor. *Revista Neurociências*, 103.
- Santos, J. V. D. S. (2020). Estudo da aplicação do condicionamento operante de skinner no desenvolvimento atitudinal de cadetes de cavalaria da academia militar das agulhas negras.
- Sears, R. R. 1934. Effect of optic lobe ablation on the visuomotor behavior of goldfish. *Journal of Comparative Psychology.*, 1934,17, 233-265.
- Sato, T. (1995) Habituação e Sensibilização Comportamental. Dissertação (Mestrado em Psicologia) Universidade de São Paulo. V.6, n1. P231-276.
- Schatz, B., Beugnam, G., & Lachaud, J. P. (1994) Time-place learning by an invertebrate, the ant *ectatomma reidum*. *Roger Animal Behavior*. 48(1), 236-238.
- Skinner, B. F. (1974) Sobre o Behaviorismo. São Paulo: Cultrix,
- Squire, L. R.; Kandel, E. R. (2003) Memória: da mente às moléculas. Porto Alegre: Artmed.
- Srinivasa, Y.B. & Mohanraju, J. (2011). To coil, or not to – activity associated ambiguity in defense responses of millipedes. *Journal Insect Behaviour* 24, 488–496
- Stopfer, M., Chen, X., Tai, Y. T., Huang, G. S., & Carew, T. J. (1996). Site specificity of short-term and long-term habituation in the tail-elicited siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 16(16), 4923-4932.
- Powers, A. S. (2014). Brain mechanisms of learning in reptiles. In *Neurobiology of comparative cognition* (pp. 175-196). *Psychology Press*
- Traina, G. (2020). Learning processes in elementary nervous systems. *Journal of Integrative Neuroscience*, 19(4), 673-678.
- Thorpe, W. H. (1963) Learning and instinct in animals. London: Methuen. Totowa, New Jersey.

- Thompson, R. F., and Spencer, W. A. (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73(1): 16.
- Thorpe, W. H. (1963) Learning and instinct in animals. London: Methuen. Totowa, New Jersey.
- Vianna, M. R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., De Paris, F., Furman, M., ... & Izquierdo, I. (2000). Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & memory*, 7(5), 333-340.
- Welsh, S. E., Romano, A. G., & Harvey, J. A. (1998). Effects of serotonin 5-HT_{2A/2C} antagonists on associative learning in the rabbit. *Psychopharmacology*, 137(2), 157-163.
- Weyrer, S., Rutzler, K., & Rieger, R. (1999). Serotonin in Porifera? Evidence from developing *Tedania ignis*, the Caribbean fire sponge (Demospongiae). *Memoirs of Queensland Museum*, 44: 659-666.
- Zanella, L. (1997). Aprendizagem: uma introdução. *Psicologia e Educação: o significado do aprender*, 6.

Capítulo 1 – Non-associative learning in Holothuroidea: the establishment of an echinoderm as a model and the effect of different parameters on the process.

Capítulo 1

Non-associative learning in Holothuroidea: the establishment of an echinoderm as a model and the effect of different parameters on the process.

Será submetida na *Frontiers in Marine Biology*

Priscilla, A. Dantas¹, Vinicius Queiroz^{1*}, André P.C. Carvalho² André F. Helene¹ and Marcio R. Custódio¹

1 – Department of Physiology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

2 – Department of Experimental Psychology, Institute of Psychology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract: Habituation, the simplest form of non-associative learning, is defined as a decrease in the response to a series of non-harmful stimuli. Although the less complex anatomical and physiological aspects make the invertebrates valuable models in the field of habituation, protostome species comprise the most well-studied species. By contrast, there are very few works addressing habituation in deuterostome invertebrates, and the establishment of a deuterostome model is still necessary. Thus, this study focused on establishing a simplified deuterostome model – an echinoderm – for studies on non-associative learning. The aim was to bring new information about basic learning mechanisms in Echinodermata, investigating how age and species affect the habituation, as well as provide useful parameters to address the process. Eight species belonging to the five classes were studied, and *Holothuria grisea*, *Isostichopus badionotus*, and *Chiridota rotifera* showed clear signs of habituation. A comparative approach of the habituation process showed that *H. grisea* and *C. rotifera*, in general, displayed opposite trends, while *I. badionotus* showed an intermediate pattern. By contrast, the habituation process was quite similar regardless of the age of the individuals, which contradicted our *a priori* assumptions. *Holothuria grisea* was chosen as the

main model, and six parameters were evaluated. Our results confirm holothurians as a valuable deuterostome model, and that the influence of different species and ages on the habituation of echinoderms deserves further detailed studies. Considering that age affects learning on other animals, the complete understanding of this process in echinoderms may bring insights to other fields of biology.

Keywords: Age, behavior, habituation, *Holothuria grisea*, physiology.

Running title: Non-associative learning in Holothuroidea

***Corresponding author:** Vinicius Queiroz, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, Rua do Matão, Travessa 14, n° 101, Cidade Universitária, CEP 05508-090, São Paulo (SP), Brazil. E-mail: vinicius_ufba@yahoo.com.br

INTRODUCTION

Due to its multi-factorial nature, it has been difficult to find a comprehensive definition of the learning process. One of the best is provided by Domjan (2010) which states that: “*Learning is an enduring change in the mechanisms of behavior involving specific stimuli and/or responses that results from prior experience with those or similar stimuli and responses*”. In this sense, the process can be divided into two main mechanisms: associative and non-associative. In the first, an individual learns about the relationship between two different stimuli or events (Hawkins and Byrne, 2015). In the latter, which is considered a less complex form of learning, the stimulus is simply followed by an answer (Abramson, 1994). Comprising the non-associative processes, we have habituation, sensitization, and dishabituation. The first has been considered the simplest form of non-associative learning and may be shortly defined as a decrease in the response to a series of non-harmful stimuli, while sensitization is the opposite, *i.e.* an increase in these responses (Eisenstein *et al.*, 2001). By contrast, dishabituation may be understood as the recovery of the

original level of response to a habituated stimulus, due to the presentation of a different one (Rosas, 2017).

Habituation, which can vary from short-term (seconds to hours) to long-term (days to weeks – Castellucci *et al.*, 1978), is quite widespread among animals, being observed in groups as diverse as protozoa (Wood, 1973) and vertebrates (Moyer, 1963; Clayton e Hinde, 1967). Evolutionarily, this process is quite important to animal survival. In a multisensory perspective, for organisms receiving multiple environmental cues, the habituation process could be responsible for basic learning in differentiating harmful and non-harmful environmental stimuli (Gray, 2005; Bullock *et al.*, 2009). For example, Bullock *et al.* (2009), stated that “avoiding predation becomes more likely by focusing on stimuli produced by predators; less threatening stimuli do not trigger a response, thus reducing the amount of time expended on irrelevant stimuli (Gray, 2005)”. Thus, habituation might be viewed as a physiologically relevant process, by avoiding a stressful constant alarm state, as well as the waste of energy in costly but unnecessary escape reactions (Ardiel *et al.*, 2017).

Although habituation is well known in many vertebrate groups (Gubernick and Wright, 1979; Laming and McKinney, 1990), the invertebrates have been decisive for understanding its basic mechanisms (Hawkins *et al.*, 1983; Cassel, 2010). This occurs mainly because of the inherent low anatomical and physiological complexity of invertebrate taxa (Glanzman, 2009). Consequently, much of the knowledge about these processes comes from studies using a few invertebrate models such as the nematode *Caenorhabditis elegans*, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and the sea slug *Aplysia californica* (Schatz *et al.*, 1994; Faber *et al.*, 2008; Commins, 2018).

For *A. californica*, even the basic mechanisms of the habituation process are known in a multilevel perspective, ranging from behavioral to cellular and molecular. For example, it is well-known that (1) after continuous stimulation, the animal decreases the strength of gill withdrawal response; (2) that this response may persist for more than three weeks (long-term); (3) that 24 sensory neurons and six motor neurons comprise the circuitry of this response, and (4) that the inactivation of calcium channels is involved in the decrease of neurotransmitter release from the sensory to the motor neurons (Castellucci *et al.*, 1978; Commins, 2018). For *C. elegans* and *Drosophila*, even genetic

aspects related to this learning process have been understood (Ardiel *et al.*, 2017, 2017; Fenckova *et al.*, 2019). However, such detailed knowledge is absent for most invertebrate phyla, as is the case for echinoderms (Perry *et al.*, 2013).

The phylum Echinodermata comprises benthic marine invertebrates as common as sea stars, whose remarkable pentamerous symmetry in adult individuals is their trademark (Pawson, 2007). Although a consensus on the phylogenetic relationship inside Deuterostomia is far from being obtained (Schlegel *et al.*, 2014), evolutionary analyzes have commonly placed Echinodermata, along with Hemichordata (*i.e.* Ambulacraria), as a sister group of Chordata (Brown *et al.*, 2008; Edgecombe *et al.*, 2011). Due to their strategic evolutionary position, these animals have been used or at least suggested as model organisms in the most diverse fields, such as regeneration (García-Arrarás e Dolmatov, 2010) and aging (Ram *et al.*, 2018). Even so, the phylum has received little attention in studies addressing the learning process (Perry *et al.*, 2013). Echinoderms have a decentralized and rather simplified nervous system, which consists of a circum-oral nerve ring from which radial nerves extend to each of the arms, or corresponding regions (Booolotiam, 1966). Nevertheless, even with these characteristics that could make echinoderms interesting models for non-associative learning, there is little published information (Perry *et al.*, 2013).

To the best of our knowledge, only two studies addressed non-associative learning in echinoderms: one reported that the sea urchin *Arbacia punctulata* reacts negatively to great light intensity (Holmes, 1912), and the second that the holothurian *Cucumaria pulcherrima* reacts to stimulation on the tentacles (Grave, 1905). However, both works were based only on a few isolated laboratory observations. This scarcity of studies with echinoderms, mainly the experimental ones, made us question if these animals can be in fact habituated, and if they fit as good models in studies of non-associative learning. Thus, the rationale for this study was threefold: (1) to establish a simplified deuterostome model to studies on non-associative learning; (2) bring new information about the basic learning mechanisms in Echinodermata, as well as provide useful parameters to address the process; (3), investigate if distinct species habituate differently and if the age of the individuals affect habituation.

To define the model organisms, preliminary experiments were made with species belonging to different echinoderms' classes: *Tropiometra carinata carinata* (Crinoidea), *Echinaster brasiliensis* (Asteroidea), *Ophinereis reticulata* (Ophiuroidea), *Echinometra lucunter*, *Lytechinus variegatus* (Echinoidea), and the holothurians *Holothuria grisea*, *Isostichopus badionotus*, and *Chiridota rotifera*. From these species, the holothuroids showed the best results, and among them, *H. grisea* was chosen as the model organism due to its relative abundance and easy maintenance. Then the habituation process was described qualitatively and quantitatively, and we investigated how different species react, and if the age of *H. grisea* (here translated by its length) affects the habituation process. Based on the literature, we believe that each species will display distinct trends during habituation and that older and young individuals will show consistent differences. To answer these questions, adult individuals of *H. grisea* were compared with adult specimens of *Isostichopus badionotus* and *Chiridota rotifera*. Posteriorly, individuals of *H. grisea* were separated into young, intermediate, and adults, according to their relaxed body length, and the characteristics related to the habituation process were described.

MATERIALS AND METHODS

Animal collection and maintenance

All animals were collected under the license permit (SISBIO N° 28917-1) at Cabelo Gordo (23° 49.58' S, 45° 25.31' W) and Segredo (23° 49.65' S, 45° 25.36' W) beaches, in the São Sebastião Channel. Five animals of each species were maintained at room temperature, in 500 L tanks supplied with natural running seawater at the Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP). The organisms were fed *ad libitum*: *E. brasiliensis* on pieces of dead invertebrates and fish, sea urchins on macroalgae, mainly *Ulva* sp. Crinoids fed on suspension particles in the tank, ophiuroids consumed the organic debris on the sediment, and holothurians fed on aquarium sediment, which consisted of a mixture of fine sand and gravel. The animals were maintained for at least 24h, until the time of the preliminary tests and this period did not exceed 36 hours, in an attempt to ensure that laboratory conditions did not alter the biology of the individuals. For the additional experiments with the

holothurians, 45 new individuals of *H. grisea*, 15 of *I. badionotus*, and 15 of *C. rotifera*, were collected in the same area. After analyses, the animals were returned to the tanks for 24-36h for recovery and then released in the same place where they were collected.

Preliminary tests and model choice

Preliminary tests were performed with five individuals of each species, aiming to find the best model for the additional experiments. In the trials, each animal was placed in a glass vat (25 cm diameter, 5 L), or Petri dishes (7.5 cm diameter, 450 mL) in the case of *C. rotifera*, containing sediment and aeration to simulate their natural environment. For crinoids, small rocks were provided to the animal, serving as a fixation point to the *cirrus*. The animals were maintained by 5-20 minutes into the recipients, and after observing the signs of relaxation, which varied in each group (Table 1), the experimental procedures began.

The preliminary tests consisted of mechanical stimulation using a glass rod of different diameters (0.5 or 0.7 cm), depending on the animal size. Stimulation was always applied to the region where the animal displayed more sensitivity. Crinoids were stimulated on cirri, arms, and on the oral region, while sea stars were touched on the disc, arm tip, and on the ambulacral groove and oral region. Ophiuroids were stimulated on the aboral part of the disc and arms and oral region. Echinoids were stimulated on the aboral spines, on the periproct, and on the oral region. Lastly, the holothurians were touched on the anal and oral region, and sometimes specifically on the tentacles. Except for the crinoids and holothurians, stimulation on the oral region was initially performed in free individuals and after in immobilized ones, with the mouth facing upward. Even so, no clear habituation was observed. Between each test, all glassware was washed with tap water and Extran (Merck), and rinsed with running seawater, to remove chemical cues from previous individuals.

Table 1 – Behavioral characteristics of relaxed and disturbed animals

Class	Species	Relaxed individual	Disturbed individual
Crinoidea	<i>Tropiometra carinata</i>	Arms and pinnules extended and moving around.	Motionless. Arms and pinnules contracted.
Asteroidea	<i>Echinaster brasiliensis</i>	Mobile, showing an open ambulacral groove. Feet and papula were clearly visible.	Motionless, with closed ambulacral groove and retracted papula.
Ophiuroidea	<i>Ophioneis reticulata</i>	Motionless or moving slowly, exploring the environment.	Moving and fleeing the stimulus.
Echinoidea	<i>Echinometra lucunter</i>	Mobile. Oral podia more or less fixed; spines, lateral and aboral podia relaxed and mobile. Tooth visible and moving.	Motionless. Oral podia fixed on the substratum; lateral and aboral podia retracted; spines erected and motionless. Mouth closed.
	<i>Lytechinus variegatus</i>		
Holothuroidea	<i>Holothuria grisea</i>	Mobile. Elongated and relaxed body, with the papillae and ambulacral podia extended; oral tentacles partially or completely exposed and downward, in a continuous alimentary activity.	Motionless, with a contracted and rigid body wall. Tentacles, papillae, and tube feet also contracted.
	<i>Isostichopus badionotus</i>		
	<i>Chiridota</i>		
	<i>rotifera</i>		

Based on the results of the preliminary assays, six parameters were chosen to be measured in the definitive tests: *Habituation Frequency* (HF), which is the number of touches given in the individuals until it habituates; *Habituation Time* (HT), the time until the animal habituates to the mechanical stimulation; *Spontaneous Recovery Time* (SRT), which is the time that the animal took for responding again after it achieves the habituated state; *Time to Respond Again* (TRA), which is the time spent in the habituation process as a whole (HT + SRT); *Mean Time of Tentacle Response* (MTTR), which is the mean time that all individuals in a specific treatment spent between the mechanical stimulation and it is relaxed again; and *Specific Time of Tentacle Response* (STTR), which is the mean time of tentacle recovery to each specific mechanical stimulation, until the animal habituated. The dishabituation process was observed in five new individuals, aiming not to impair the analyses of *STR* and *TRA*.

Habituation process in *Holothuria grisea*

After the positive response of all holothurian's species in the preliminary tests, the habituation process in *H. grisea* was systematically investigated. This species was chosen as the main model because we knew *a priori* that, among the holothurians studied in the preliminary tests, it is the most

abundant, as well as and the easiest to collect, handle and maintain in captivity. Thus, fifteen large individuals, ranging from 18 to 28 cm in length, were placed individually in a glass vat as described previously. After the specimens reached the relaxed state (Table 1), they were touched with a 0.5 mm diameter glass rod in the oral region, or directly on the tentacles. The mechanical stimulation was repeated until the individual stopped reacting and remained relaxed when touched, meaning that it was habituated. After, a new stimulus (chemical) was offered, consisting of blowing MilliQ water directly on the oral region of the habituated individuals. After recovering from this new stimulus, another mechanical stimulation was performed to observe if the animal was able to respond again (Supplementary material). This allowed us to confirm if the animals were in fact habituated or if the lack of response was due to other processes, such as fatigue or sensory adaptation (Rankin *et al.*, 2009). All the six parameters established in the preliminary tests were measured during this step.

Species and age effect on the habituation process in Holothuroidea

After the establishment of *H. grisea* as a model, and successful measurements of the parameters chosen in the preliminary analyses, we decided to investigate if different species respond differently to habituation and if age may affect habituation in *H. grisea*. In the first case, the responses of *H. grisea*, *I. badionotus*, and *C. rotifera* were compared. To do this, thirty new adult individuals of the last two species, 15 for each one, were used. Similarly, to verify the effect of age on *H. grisea* habituation, 30 additional specimens were collected, and the 45 individuals were classified into *young*, *intermediate*, and *adults*, according to their length (Table 2). Measurements of body parts, or the entire body, have been commonly used to estimate age in Echinodermata (Dahm and Brey, 1998; McCaughey and Bodnar, 2012; Bodnar and Coffman, 2016). The size-classes used to classify the age of the individuals were based on observations made during the collection to preliminary tests. Two well-marked groups were found, consisting of small and large individuals. Between these extremes, careful analyses revealed the existence of a third group (intermediate) in which the sizes did not overlap with the previous categories.

Statistical analyses

Values of all measures were expressed as Mean \pm Standard Deviation (M \pm SD), and all **statistical analyses were done with GraphPad Prism 7 Statistical Software (San Diego, USA, v 7.00)**. The differences in the parameters of habituation among species were analyzed using a two-tailed one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$), followed by a Tukey multiple comparison test. A Pearson correlation was performed to check for a possible relationship among age and HF, HT, SRT, or TRA.

Since HF varied among the individuals in the same category (Species and Ages), which influences directly the STTR analysis, the data of the eight specimens that achieved the mean HF was used in STTR analyses. STTR was analyzed through a two-way repeated measure ANOVA (Stimulation [1°, 2°, 3°, 4°, 5°, and last] x Species [*H. grisea*, *I. badionotus*, and *C. rotifera*] or Age [Young, Intermediate, and Adult]). These interactions were examined with Tukey's post hoc multiple comparisons. The most visible changes were detected in the first five stimulations and the last one. Therefore, only these stimulations were statistically analyzed. Differences in all tests were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

The crinoid, asteroid, ophiuroid, and echinoids analyzed did not show any clear sign of habituation in the preliminary tests. Contrarily, the process was easily observed in the holothurians *H. grisea*, *I. badionotus*, and *C. rotifera*, which contracted the tentacles and the anterior portion after mechanical stimulation on the oral region. All holothurians' species reacted similarly to the touches, and after a specific amount of stimuli, they stopped reacting, showing a habituated state.

The habituation process in *Holothuria grisea*.

Typical undisturbed animals in the field, aquarium, and in the glass, vat show an elongated body, with the papillae and ambulacral podia extended, and the oral tentacles completely exposed and downward, in a continuous alimentary activity (Figure 1A). This position was interpreted as the maximum sign of relaxed animals. However, relaxed individuals may also lean on the

glass wall, exposing their tentacles (Figure 1B). Animals in a process of relaxation, *i.e.*, starting to explore the arena, show a partially opened mouth (Figure 1C). After the mechanical stimulation with the glass rod, the animal retracts the oral tentacles and contracts the oral region at different levels, hiding the structure and showing tapered or a rounded anterior region (Figure 1D). Usually, the response to the first mechanical stimulation is the most intense, decreasing along the habituation process, until there is no response in the habituated animal (Supplementary Material 1).

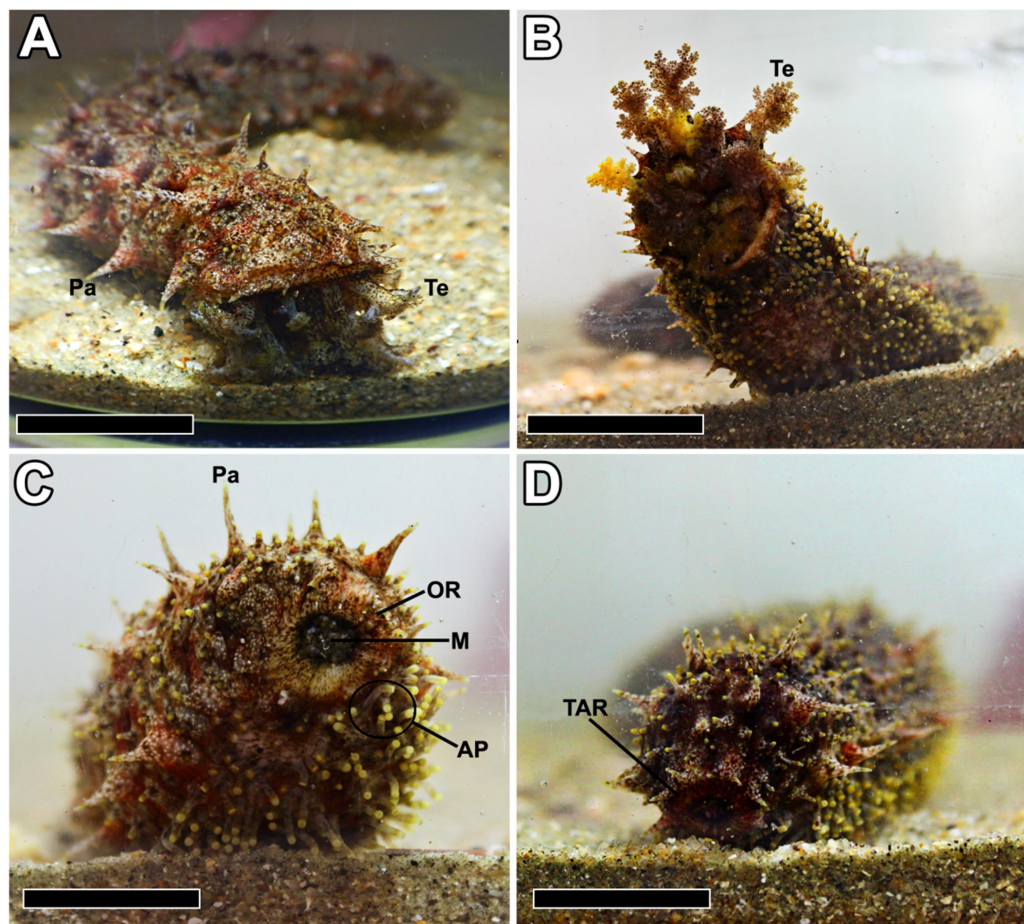


Figure 1 – *Holothuria grisea* during the habituation process. **A** – Animal completely relaxed in the arena, before trial; **B** – Relaxed animal leaning the tentacles on the glass wall; **C** – Semi-relaxed animal, with a partially opened mouth leaning on the glass wall; **D** – Animal after the first mechanical stimulation, showing the tapered oral region. **Legend:** AP = Ambulacral podia; M = mouth; OR = Oral region, Pa = Papillae; TAR = Tapered anterior region; Te = Tentacle. **Scale:** A = 3 cm B and D = 2 cm; C = 1,5 cm.

It was necessary 8.67 ± 2.02 touches (HF) and 300.80 ± 99.74 s (HT) to habituate adult specimens of *H. grisea*, and only after 177.20 ± 91.45 s (SRT) the individuals able to respond again to mechanical stimulation. The entire

process, between the beginning of the habituation and when the animal is ready to respond again (TRA), took 478 ± 173.57 s (Table 2). Lastly, we observed that the MTTR does not reflect exactly what happens on each individual stimulation, as the specific response time of the tentacle to each touch is different. For example, although MTTR is 35.17 ± 16.17 s, the STTR on the first touch is 53.50 ± 21.87 s and on the last touch is 22.75 ± 3.81 s (Table 3), showing that the order of stimulation (STTR) must be considered, not just the overall average of all stimulations (MTTR). The habituation process was confirmed by observing the dishabituation, as stated by Thompson and Spencer (1966). After no longer responding to mechanical stimuli, a squirt of MilliQ water launched using a plastic Pasteur pipette was able to make the habituated animal contract the tentacle again. After some seconds, the animal was ready to respond to mechanical stimulation (Supplementary Material).

Table 2 – Main parameters analyzed during the habituation process. Values are expressed as Mean \pm Standard Deviation followed by Minimum and Maximum. Legend: HF = Habituation Frequency; HT = Habituation Time; SRT = Spontaneous Recovery Time; TRA = Time to Respond Again; MTTR = Mean Time of Tentacle Response

Parameter	<i>Holothuria grisea</i>			<i>Isostichopus badionotus</i>	<i>Chiridota rotifera</i>
	Young	Intermediate	Adults		
Length (cm)	7.13 ± 0.89 (5.24 – 8.57)	12.84 ± 1.68 (10.28 – 16.72)	22.18 ± 3.47 (18 – 27.9)	20.95 ± 5.96 (12.41 – 31.43)	14.72 ± 3.69 (9.36 – 22.89)
HF (N° Sti)	9.60 ± 3.38 (5 – 15)	10.20 ± 2.76 (7 – 16)	8.67 ± 2.02 (6 – 13)	17.73 ± 5.18 (10 – 29)	15.73 ± 7.06 (7 – 26)
HT (s)	284.07 ± 123.39 (111 – 557)	332.80 ± 106.34 (214 – 565)	300.80 ± 99.74 (163 – 507)	257.54 ± 122.71 (89.88 – 501)	155.56 ± 71.50 (69.01 – 267)
SRT (s)	168.67 ± 75.86 (90 – 370)	188.67 ± 90.15 (90 – 370)	177.20 ± 91.45 (80 – 420)	168 ± 128.69 (60 – 600)	200 ± 70.51 (120 – 300)
TRA (s)	452.73 ± 147.16 (288 – 797)	521.47 ± 174.14 (304 – 805)	478 ± 173.57 (301 – 927)	425.54 ± 200.29 (209.88 – 851)	355.56 ± 85.14 (191.73 – 464.69)
MTTR (s)	29.50 ± 11.17 (14 – 62)	32.63 ± 16.01 (11 – 106)	35.17 ± 16.17 (11 – 91)	17.46 ± 7.42 (5 – 38)	10.62 ± 4.68 (5 – 45)

Species and Age-effect on the habituation process

The habituation process showed to be species-specific (Figure 2 and Table 2). The HF was significantly lower in *H. grisea* ($F = 12.66$; $p < 0.0001$) than in *C. rotifera* and *I. badionotus*, which needed respectively 1.95 and 2.2-

fold more stimulations to habituate (Figure 2A). By contrast, HT was 1.81 and 1.71-fold slower in *H. grisea* and *I. badionotus* than in *C. rotifera* ($F = 8.309$; $p = 0.0009$ – Figure 3B). Although SRT was higher in *C. rotifera* compared to *H. grisea* and *I. badionotus* (Table 2; Figure 2C), the values were statistically similar ($F = 0.408$; $p = 0.667$). The TRA followed the pattern observed in SRT, but in an opposite trend: *C. rotifera* showed lower values, compared to *H. grisea* and *I. badionotus* (Figure 2D), but these differences were not significantly different ($F = 2.191$; $p = 0.124$). Regarding MTTR, *H. grisea* showed the highest values, followed by *I. Badionotus*, and *C. rotifera* ($F = 295.6$; $p < 0.0001$ – Figure 2E). The STTR followed the same general pattern: in general, *H. grisea* showed the highest values, followed by *I. badionotus* and *C. rotifera*. (Table 3; Figure 2F). Two-way ANOVA for repeated measures indicates that STTR is affected by the stimulation order ($F = 17.8$; $p < 0.0001$) and the species considered ($F = 22.23$; $p < 0.0001$), and that the interaction between these factors was significant ($F = 4.006$; $p = 0.0001$).

Table 3 – Specific Time of Tentacle Response (STTR) to each mechanical stimulation (MS) during the habituation process. Values are expressed as Mean \pm Standard Deviation followed by Minimum and Maximum.

STTR	<i>Holothuria grisea</i>			<i>Isostichopus badionotus</i>	<i>Chiridota rotifera</i>
	Young	Intermediate	Adults		
1° MS	36 \pm 15.51 (15 – 61)	36.25 \pm 11.17 (20 – 52)	53.50 \pm 21.87 (30 – 86)	24.88 \pm 9.22 (9 – 38)	20.88 \pm 11.19 (11 – 45)
2° MS	36.63 \pm 15.98 (18 – 62)	30.63 \pm 4.90 (21 – 35)	45.88 \pm 21.87 (24 – 91)	20.50 \pm 7.33 (8 – 30)	14.13 \pm 5.08 (7 – 23)
3° MS	34.50 \pm 8.33 (22 – 46)	33.88 \pm 8.11 (26 – 49)	36 \pm 7.76 (27 – 53)	20.38 \pm 6.14 (11 – 29)	12.50 \pm 3.38 (7 – 18)
4° MS	35.75 \pm 10.74 (26 – 60)	36.38 \pm 28.56 (20 – 106)	28.13 \pm 8.04 (18 – 42)	20.13 \pm 6.92 (10 – 30)	11.25 \pm 3.81 (6 – 18)
5° MS	31.88 \pm 9.40 (19 – 16)	32.25 \pm 18.06 (18 – 73)	29.13 \pm 4.58 (21 – 36)	20.75 \pm 7.03 (10 – 28)	11.25 \pm 4.13 (7 – 20)
6° MS	27.13 \pm 9.45 (14 – 38)	28.75 \pm 18.84 (16 – 73)	29.25 \pm 7.52 (21 – 42)	19.38 \pm 7.25 (8 – 30)	10.25 \pm 3.01 (7 – 16)
7° MS	25.13 \pm 8.11 (14 – 41)	29.38 \pm 14.33 (14 – 61)	28.75 \pm 8.10 (18 – 40)	18.13 \pm 6.53 (9 – 25)	11.25 \pm 4.37 (6 – 20)
8° MS	27.50 \pm 7.09 (19 – 35)	23.88 \pm 7.61 (18 – 41)	22.75 \pm 3.81 (18 – 27)	21.25 \pm 8.24 (7 – 35)	9.63 \pm 2.33 (6 – 13)
9° MS	25.63 \pm 7.05 (17 – 35)	-	-	20.75 \pm 9.39 (9 – 34)	9 \pm 2.39 (6 – 12)
10° MS	-	-	-	18.75 \pm 6.71 (68 – 27)	9.88 \pm 3.76 (6 – 18)
11° MS	-	-	-	19.88 \pm 8.51 (6 – 28)	7.75 \pm 2.05 (12 – 6)
12° MS	-	-	-	17.63 \pm 8.58 (5 – 32)	8.88 \pm 1.96 (6 – 12)
13° MS	-	-	-	16.75 \pm 6.65 (5 – 26)	7.88 \pm 2.23 (5 – 12)
14° MS	-	-	-	14.63 \pm 5.10 (6 – 20)	7.63 \pm 2.50 (5 – 13)
15° MS	-	-	-	15.63 \pm 5.34 (6 – 22)	8.88 \pm 4.29 (6 – 19)
16° MS	-	-	-	16.25 \pm 5.47 (6 – 23)	-
17° MS	-	-	-	14.75 \pm 6.61 (8 – 28)	-

On the other hand, the habituation parameters were not influenced by the age of the individuals, as observed in Pearson correlation analyses (Figure 3A-D). Although the raw data on MTTR seems to indicate that young and adults' individuals are different between themselves (Table 2, Figure 3E), they are statistically similar ($F = 2.847$; $p = 0.0591$). Differences in STTR were found depending on stimulation order (two-way ANOVA for repeated measures; $F = 6.795$, $p < 0.0001$), but not on age ($F = 0.364$; $p < 0.698$), although Tukey multiple comparisons indicates that adults are different from

intermediate and young individuals in the first touch (Figure 3F). Lastly, the interaction between stimulation order x age was significant ($F = 2.039$; $p = 0.036$; Figure 2F).

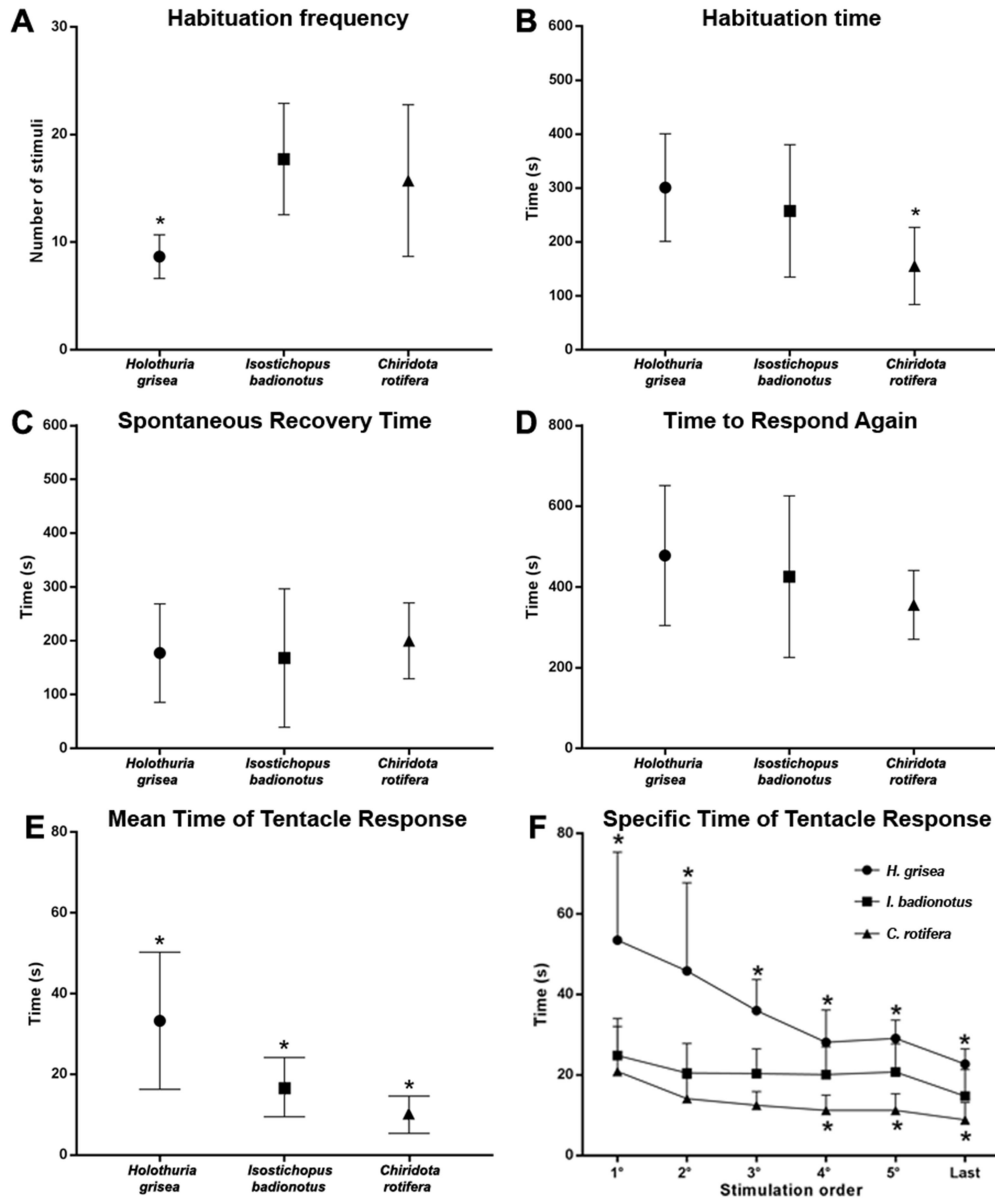


Figure 2 – Main parameters analyzed during the habituation process in different species of Holothuroidea. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) among species.

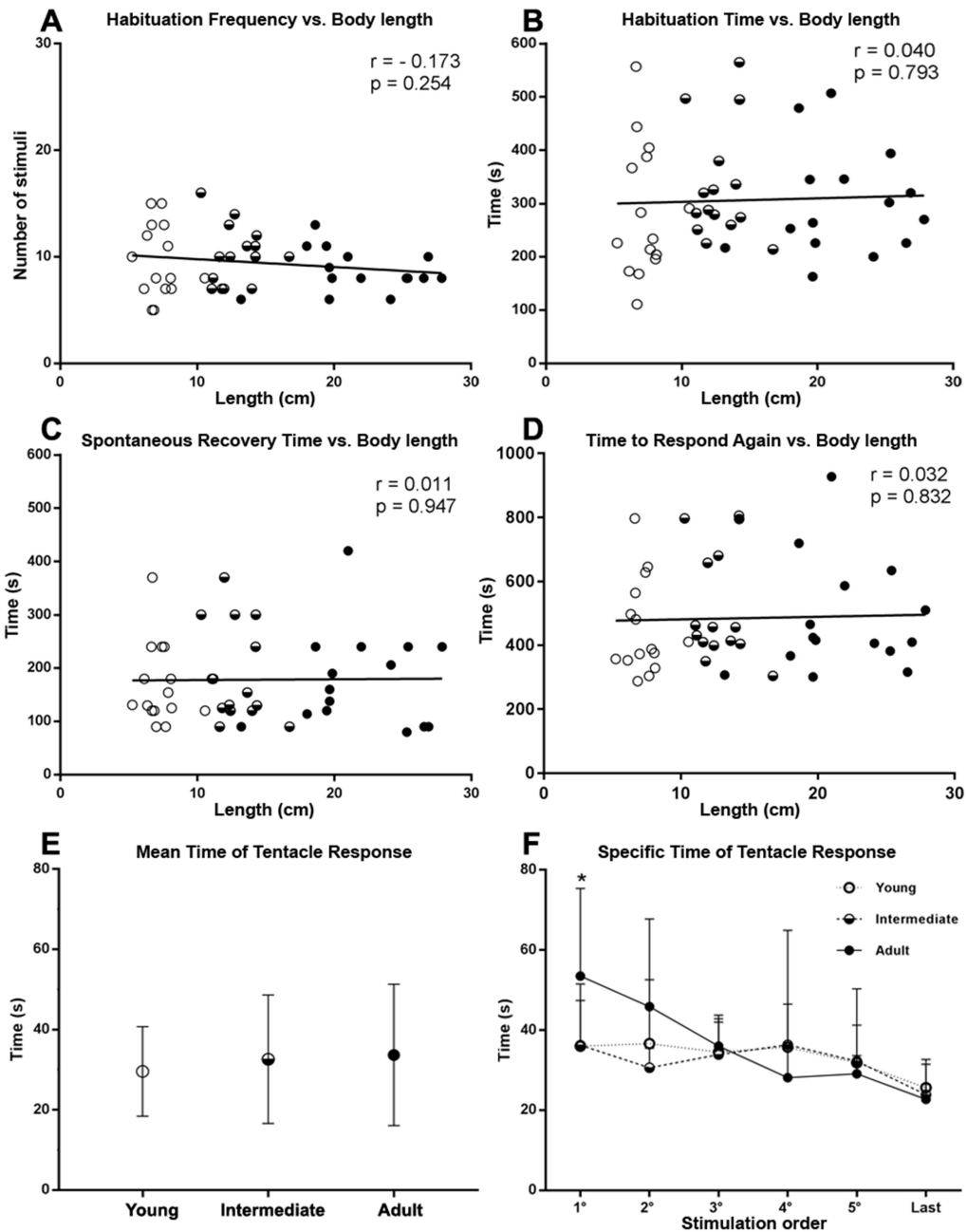


Figure 3 – Habituation parameters in individuals of *Holothuria grisea* of different ages. A-D – Correlation between habituation parameters and body length. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) among species.

DISCUSSION

Here, we performed a systematic investigation on the habituation process in different species of Echinodermata. We observed that: (1) holothurians were the only responsive organisms among the studied echinoderms and that among the holothurians, the responses were species-dependent; (2) due to the ease of collection, maintenance, and handling, as

well as the remarkable short-term habituation, *H. grisea* proved to be a good model to non-associative studies; (3) HF, HT, MTTR, and STTR were good parameters to understand the habituation process in Holothuroidea; and (4) the habituation process in *H. grisea* is not affected by the age of the individuals.

To the best of our knowledge, this is the first study to formally establish an echinoderm model for non-associative learning. Considering the several invertebrates used in the area of non-associative learning, *A. californica*, *D. melanogaster*, and *C. elegans* are among the best-studied (Fioravante *et al.*, 2008). However, they are all protostomes, and therefore relatively distant evolutionarily from Chordata. By contrast, the number of studies addressing invertebrate deuterostomes is remarkably limited and only four species were already studied: one Holothuroidea, two Echinoidea, and one Urochordata (Perry *et al.*, 2013). Except for the work of Tsuda *et al.* (2003), which shows an accurate experimental approach with the larva of the ascidian *Ciona intestinalis*, all other works are based only on laboratory observations.

We observed that the habituation process differed according to the holothurian species studied. In general, *H. grisea* and *C. rotifera* showed an opposed trend, while *I. badionotus* showed intermediate responses. Learning, from the most complex types to the most basic ones, must be considered from an ecological and evolutionary perspective (Eisenstein *et al.*, 2001; Raderschall *et al.*, 2011). In nature, learning the significance of a stimulus is crucial: while the response to real threats is critical, constant reaction to harmless stimuli will waste time and energy, which may affect their fitness (Eisenstein *et al.*, 2001).

Some hypotheses, from different perspectives, were already stated aiming to explain the learning capabilities of different species. Kandori *et al.* (2009) claim for a more physiological explanation, in which they hypothesize that body or brain sizes would drive learning abilities in butterflies. On the other hand, other authors have stated that ecological differences, more specifically the activity period (diurnal vs. nocturnal – Scudder e Burghardt, 1983) or prey preferences (Herzog and Burghardt, 1986) may be the reasons for differences in snake's behavior. Lastly, Scudder and Burghardt (1983) raise the possibility that the similarities and differences observed in three

snakes from the genus *Nerodia* may rely on their phylogenetic proximity. The scarcity of knowledge on the species studied here makes it difficult to draw some explanation, mainly because all these three possibilities are viable. From a physiological perspective, adults individuals of *H. grisea* and *I. badionotus* showed similar dimensions, which certainly should be reflected on larger nerve ring sizes compared to *C. rotifera*. Ecologically, *H. grisea* and *I. badionotus* have similar habits/preferences: both are epifaunal species that usually live hidden among rocks, sometimes exposed on the substratum. This is very different from *C. rotifera*, which have an infaunal habit, living buried in the sand. Lastly, from a phylogenetic point of view, *H. grisea* and *I. Badionotus* are closely related when compared to *C. rotifera* (Miller *et al.*, 2017). Thus, it is difficult for us hypothesizing about the differences observed in these three species because the similarities/differences could very well come from physiological, ecological, or evolutionary aspects.

Differently from the initially hypothesized by us, age did not affect the habituation process in *H. grisea*, even considering the extreme groups (*i.e.*, young and adults individuals). Age has long been known to influence learning, as already observed in other invertebrates (Rattan e Peretz, 1981; Beck e Rankin, 1993; Kempzell e Fieber, 2016) and mammals (Brennan *et al.*, 1984; Castillo *et al.*, 2014). Good examples of age-effect were already seen in invertebrates. The gill-withdraw reflex threshold increased in aged individuals of the sea slug *A. californica* (Kempzell e Fieber, 2016), while recovery from habituation was slower in older specimens of the nematode *C. elegans* (Beck e Rankin, 1993).

There are three possible explanations for the similar results of young and adult's individuals. First, that length was not an adequate parameter to estimate age. Invertebrates in general, have very few trustworthy characteristics to accurate age estimation, and body dimensions have commonly been used for this purpose in echinoderms (Herrero-Pérezru *et al.*, 1999; Bos *et al.*, 2008; Bodnar and Coffman, 2016). For holothurians, field, and laboratory studies (Herrero-Pérezru *et al.*, 1999; Hamel *et al.*, 2003; Asha e Muthiah, 2007) confirmed that body length is a useful parameter to estimate age. Second, the effect of this parameter is not as pronounced, and a large number of specimens would be necessary to detect any alteration. However,

there are several studies using invertebrates (Rattan e Peretz, 1981; Samson *et al.*, 2014; Kempzell e Fieber, 2016) and vertebrates (Shukitt-Hale *et al.*, 2001; Place and Abramson, 2008) that showed consistent results using a similar number of replicas.

Lastly, the most plausible explanation in our opinion is that age is not a factor that markedly affects the performance of echinoderms during habituation. Many studies analyzing age-effect on habituation and/or non-associative learning showed that age is an important factor affecting cognitive capabilities, regardless of the model (Rattan e Peretz, 1981; Beck e Rankin, 1993). Still, it is known that aged specimens of *A. californica* show cytological and physiological differences in neurons related to the gill withdraw reflex (Rattan e Peretz, 1981), suggesting that such differences may be due to changes in the neural circuitry. By contrast, echinoderms are well known for their regenerative potential (Rideout, 1978), and recent studies showed that at least in Echinoidea, physiological capacities (*e.g.*, immune responses and regeneration) are not affected by aging (McCaughey and Bodnar, 2012; Bodnar, 2015; Bodnar and Coffman, 2016). Considering that holothurians also have the same potential (García-Arrarás and Greenberg, 2001; Vazzana *et al.*, 2015) and that the differences between aged and young individuals are due to physiological impairments in the neural and/or sensorial circuitry (as already observed in *A. californica* – Rattan e Peretz, 1981), possibly the high regenerative capability of echinoderms may at least reduce aging effects on learning capabilities.

Habituation, although is considered one of the simplest learning mechanisms, may have complex physiological, ecological, and evolutionary implications. Its study has mostly been done in invertebrates, in which the simplified body organization – mainly the neural circuitry – provided knowledge on behavioral and cellular/molecular mechanisms. However, all the best-studied models are protostome, and the lack of a simplified deuterostome model is evident. Even though the most basic cellular/molecular mechanisms are shared between protostome and deuterostomes, they also show consistent differences such as the nerve cord position (Holland, 2015). We show that *H. grisea* is a viable deuterostome model for non-associative studies. Concomitantly, we provide useful parameters to study habituation in

Echinodermata. Our results showed that the habituation process was different in the species considered, however, it was not affected by the age of the individuals. These results show that both aspects deserve further studies, in special the fact that echinoderms does not seem to be affected by aging. The understanding of the processes and mechanisms responsible for maintaining stable levels of response during aging certainly will bring insights into the area of human biology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the CEBIMar Staff for technical supporting during collections and experimental procedures. PAD thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance code 001), and VQ thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Proc. 2015/21460-5 and 2018/14497-8). This is a contribution of NP-BioMar (Research Center for Marine Biodiversity - USP).

Funding: This study was supported by fellowships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance code 001) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (grant numbers: 2015/21460-5; 2018/14497-8).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Ethical approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for animal testing, animal care, and use of animals were followed by the authors.

Sampling and field studies: All necessary permits for sampling and observational field studies have been obtained by the authors from the competent authorities (ICMbio). and are mentioned in the text.

Data availability: All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

REFERENCES

- Abramson, C. I., and Chicas-Mosier, A. M. (2016). Learning in Plants: Lessons from *Mimosa pudica*. *Front. psychol*,7, 417.
- Ardiel, E. L., Alex, J. Y., Giles, A. C., and Rankin, C. H. (2017). Habituation as an adaptive shift in response strategy mediated by neuropeptides. *NPJ Sci. Learn*, 2(1), 1-10.
- Asha, P. S., and Muthiah, P. (2007). Growth of the hatchery-produced juveniles of commercial sea cucumber *Holothuria (Theelothuria) spinifera* Theel. *Aqua. Res*, 38(10), 1082-1087.
- Beck, C. D. O., and Rankin, C. H. (1993). Effects of aging on habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav. proces*, 28(3), 145-163.
- Bodnar A. G. (2015). Cellular and molecular mechanisms of negligible senescence: insight from the sea urchin. *Invertebrate reproduction & development*, 59(sup1), 23–27.
- Bodnar, A. G., and Coffman, J. A. (2016). Maintenance of somatic tissue regeneration with age in shor- and long-lived species of sea urchins. *Aging cell*, 15(4), 778-787.
- Boisseau RP, Vogel D, and Dussutour A. 2016 Habituation in non-neural organisms: evidence from slime moulds. *Proc. R. Soc. B* 283, 20160446. (doi:10.1098/rspb.2016.0446)
- Bonaventura, R., Costa, C., Pinsino, A., Russo, R., Zito, F., and Matranga, V. (2011). Echinoderms: Model Organisms for Marine Environmental Monitoring and Development of New Emerging Technologies. In *Marine Research at CNR Volume DTA/06-(2011)* (pp. 1967-1978). Department of Earth and Environment. National Research Council of Italy.
- Booolotian, R. A. (1966). *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, N.Y. 822p.
- Bos, A. R., Gumanao, G. S., Alipoyo, J. C., and Cardona, L. T. (2008). Population dynamics, reproduction, and growth of the Indo-Pacific horned sea star, *Protoreaster nodosus* (Echinodermata; Asteroidea). *Mar. Bio*, 156(1), 55-63.

Brennan, M. J., Allen, D., Aleman, D., Azmitia, E. C., and Quartermain, D. (1984). Age differences in within-session habituation of exploratory behavior: effects of stimulus complexity. *Behav Neural Biol*, 42(1), 61-72.

Brown, G. D. (1998). Nonassociative learning processes affecting swimming probability in the seaslug *Tritonia diomedea*: habituation, sensitization and inhibition. *Behav. Brain Res*, 95(2), 151-165.

Brown, F. D., Prendergast, A., and Swalla, B. J. (2008). Man is but a worm: chordate origins. *Gen*, 46, 605–613.

Buckley, K. M., and Rast, J. P. (2017). An organismal model for gene regulatory networks in the gut-associated immune response. *Front. immunol*, 8, 1297.

Bullock, A. L., McKeown, C. L., and Robertson, M. W. (2009). Habituation and dishabituation to a vibrational stimulus by a millipede, *Orthoporus texicolens*. *Trans. Ill. State Acad. Sci.*, 102(3-4), 199-204.

Carew, T. J., and Kandel, E. R. (1973). Acquisition and retention of long-term habituation in *Aplysia*: correlation of behavioral and cellular processes. *Science* 182, 1158–1160. [10.1126/science.182.4117.1158](https://doi.org/10.1126/science.182.4117.1158)

Carew, T. J., Castellucci, V. F., and Kandel, E. R. (1972). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Sci*, 202(4374): 1306-1308.

Castellucci, V. F., Carew, T. J., and Kandel, E. R. (1978). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Sci*, 202, 1306–1308. [10.1126/science.214854](https://doi.org/10.1126/science.214854)

Castillo, M. U., de Moraes Barros, M. C., and Guinsburg, R. (2014). Habituation responses to external stimuli: is the habituation of preterm infants at a postconceptual age of 40 weeks equal to that of term infants? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 99(5), F402-F407.

Clayton, F. L., and Hinde, R. A. (1967). The habituation and recovery of aggressive display in *Betta splendens*. *Behav*, 30(1): 96-105.

Commins, S. (2018). Habituation and Sensitisation in the *Aplysia*. In *Behavioural Neuroscience* (pp. 48-61). Cambridge: Cambridge University Press. [doi:10.1017/9781316221655.006](https://doi.org/10.1017/9781316221655.006)

Corning, W. C., Dyal, J. A., and Willows, A. O. D. (Eds). (1975). *Invertebrate learning*. Plenum Press.

Dahm, C., and Brey, T. (1998). Determination of growth and age of slow growing brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea) from natural growth bands. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 78(3), 941-951.

Domjan, M. (2010). *The principles of learning and behavior*. 7Th Ed. Belmont, CA. Thomson Wardsworth.

Edgecombe, G.D., Giribet, G., Dunn, C. W., Hejnol, A., Kristensen, R. M., Neves, R. C., Rouse, G. W., Worsaae, K., and Sørensen, M. V. (2011). Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Org. Diver. Evol.* 11(2), 151-172.

Eisenstein, E. M., Eisenstein, D., and Smith, J. C. (2001). The evolutionary significance of habituation and sensitization across phylogeny: A behavioral homeostasis model. *Integr Psychol Behav Sci*, 36(4), 251-265.

Eisenstein, E. M., Eisenstein, D., and Smith, J. C. (2001). The evolutionary significance of habituation and sensitization across phylogeny: A behavioral homeostasis model. *Integr Psychol Behav Sci*, 36(4), 251-265.

Fenckova, M., Blok, L. E., Asztalos, L., Goodman, D. P., Cizek, P., Singgih, E. L., and Schenck, A. (2019). Habituation learning is a widely affected mechanism in *Drosophila* models of intellectual disability and autism spectrum disorders. *Bio. Psychiatry*, 86(4), 294-305.

Fioravante, D., Antzoulatos, E. G., and Byrne, J. H. (2009). *Sensitization and Habituation: Invertebrate. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection*, 373.

García-Arrarás, J. E., and Dolmatov, I. Y. (2010). Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration. *Current pharmaceutical design*, 16(8), 942–955.

Garcí-Arrarás, J. E., and Greenberg, M. J. (2001). Visceral regeneration in holothurians. *Microsc. Res. Tech*, 55(6), 438-451.

Glanzman, D. L. (2009). Habituation in *Aplysia*: the Cheshire cat of neurobiology. *Neurobiol. Learn. Mem*, 92(2), 147-154.

Gover, T. D., and Abrams, T. W. (2009). Insights into a molecular switch that gates sensory neuron synapses during habituation in *Aplysia*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 155–165. [10.1016/j.nlm.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.03.006)

Grave, C. (1905). The tentacle reflex in a holothurian, *Cucumaria pulcherrima*. *Johns Hopkins Univ Circ.* 178: 24–27.

Gray, J. R. (2005). Habituated visual neurons in locusts remain sensitive to novel looming objects. *J. Exp. Biol*, 208: 2515-2532.

Gubernick, D. J., and Wright, J. W. (1979). Habituation of two response systems in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Anim. Learn. Behav*, 7(1), 125-132.

Hämäläinen, L., Mappes, J., Rowland, H. M., Teichmann, M., and Thorogood, R. (2020). Social learning within and across predator species reduces attacks on novel aposematic prey. *J Anim Ecol*, 89(5), 1153-1164.

Hamel, J. F., Hidalgo R. Y. and Mercier, A. (2003). Larval development and juvenile growth of the Galapagos Sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *Beche-de-Mer*, 18, 3-8.

Hawkins, R. D., and Byrne, J. H. (2015). Associative learning in invertebrates. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*, 7(5): a021709.

Herrero-Pérezrul, M. D., Bonilla, H. R., García-Domínguez, F., and Cintra-Buenrostro, C. E. (1999). Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Mar. Biol.*, 135(3), 521-532.

Herzog, H. A., and Burghardt, G. M. (1986). Development of antipredator responses in snakes: I. Defensive and open-field behaviors in newborns and adults of three species of garter snakes (*Thamnophis melanogaster*, *T. sirtalis*, *T. butleri*). *J. Comp. Psychol*, 100(4), 372.

Herzog, H. A., Bowers, B. B., and Burghardt, G. M. (1989). Development of antipredator responses in snakes: IV. Interspecific and intraspecific differences in habituation of defensive behavior. *Dev. Psychobiol*, 22(5), 489–508.

Holland, L. Z. (2015). Evolution of basal deuterostome nervous systems. *J. Exp. Biol*, 218(4), 637-645.

Kandori, I., Yamaki, T., Okuyama, S. I., Sakamoto, N., and Yokoi, T. (2009). Interspecific and intersexual learning rate differences in four butterfly species. *J. Exp. Biol*, 212(23), 3810-3816.

Kempell, A. T., and Fieber, L. A. (2016). Habituation in the Tail Withdrawal Reflex Circuit is Impaired During Aging in *Aplysia californica*. *Front Aging Neurosci*. 8:24.

Kriegstein, A. R. (1977). Stages in the post-hatching development of *Aplysia californica*. *J. Exp. Zool*. 199: 275-288.

Laming, P. R., and McKinney, S. J. (1990). Habituation in goldfish (*Carassius auratus*) is impaired by increased interstimulus interval, interval variability, and telencephalic ablation. *Behav. neurosci*, 104(6), 869.

McCaughey, C., and Bodnar, A. (2012). Investigating the sea urchin immune system: Implications for disease resistance and aging. *J. Young Investig*, 23, 25-33.

McGuire, T. R. (1984) Learning in three species of Diptera: The blow fly *Phormia regina*, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and the house fly *Musca domestica*. *Behav. Genet*, 14(5): 479-526.

Miller, A. K., Kerr, A. M., Paulay, G., Reich, M., Wilson, N. G., Carvajal, J. I., and Rouse, G. W. (2017). Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *M. Phylogenetics Evol.*, 111, 110-131.

Moyer, K.E. (1963) Startle response: Habituation over trials and days, and sex and strain differences. *J. Comp. Physiol. Psychol*, 56(5): 863.

Pawson, D.L. (2007) Phylum Echinodermata. *Zootaxa* p. 749-764.

Perry, C. J., Barron, A.B., and Cheng, K. (2013) Invertebrate learning and cognition: relating phenomena to neural substrate. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci*, 4(5), 561-582.

Philippe, H., Brinkmann, H., Copley, R. R., Moroz, L. L., Nakano, H., Poustka, A. J., and Telford, M. J. (2011). Acoelomorph flatworms are deuterostomes related to *Xenoturbella*. *Nature*, 470(7333), 255-258.

Place, A. J., and Abramson, C. I. (2008). Habituation of the rattle response in Western Diamondback rattlesnakes, *Crotalus atrox*. *Copeia*, 2008(4), 835-843.

Raderschall, C. A., Magrath, R. D., and Hemmi, J. M. (2011). Habituation under natural conditions: model predators are distinguished by approach direction. *J. Exp. Biol*, 214(24), 4209-4216.

Ram, J. L., and Costa II, A. J. (2018). Invertebrates as model organisms for research on aging biology. In *Conn's Handbook of Models for Human Aging* (pp. 445-452). Academic Press.

Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M. A., Glanzman, D. L., Marsland, S., *et al.* (2009). Habituation revisited: an updated and revised description of the

behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol. Learn. Mem*, 92(2), 135–138.

Rattan, K. S., and Peretz, B. (1981). Age-dependent behavioral changes and physiological changes in identified neurons in *Aplysia californica*. *J. Neurobiol*, 12(5), 469–478.

Rideout, R. S. (1978). Asexual reproduction as a means of population maintenance in the coral reef asteroid *Linckia multifora* on Guam. *Mar. Biol*, 47(3), 287-295.

Rosas, J. M. (2017) Dishabituation. In: Vonk J., Shackelford T. (eds) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham

Samson, J. E., Mooney, T. A., Gussekloo, S. W., and Hanlon, R. T. (2014). Graded behavioral responses and habituation to sound in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol*, 217(24), 4347-4355.

Schlegel, M., Weidhase, M., and Stadler, P. F. (2014). "17 Deuterostome phylogeny – a molecular perspective". In *Deep Metazoan Phylogeny: The Backbone of the Tree of Life*. Berlin, Boston: De Gruyter.

Schmid, S., Wilson, D. A., and Rankin, C. H. (2015). Habituation mechanisms and their importance for cognitive function. *Front.integr. neurosci*, 8, 97.

Scudder, R. M., and Burghardt, G. M. (1983). A Comparative Study of Defensive Behavior in Three Sympatric Species of Water Snakes (Nerodia). *Z. Tierpsychol.*, 63(1), 17–26.

Shukitt-Hale, B., Casadesus, G., Cantuti-Castelvetri, I., and Joseph, J. A. (2001). Effect of age on object exploration, habituation, and response to spatial and nonspatial change. *Behav. Neurosci*, 115(5), 1059.

Thompson, R. F., and Spencer, W. A. (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73(1): 16.

Thorpe, W. H. (1963) *Learning and instinct in animals*. London: Methuen. Totowa, New Jersey.

Capítulo 2 - Como diferentes parâmetros afetam o comportamento defensivo de equinodermos? Insights em relação à aprendizagem não associativa em *Holothuria grisea*.

Capítulo 2

Como diferentes parâmetros afetam o comportamento defensivo em equinodermos? Insights em relação à aprendizagem não associativa em *Holothuria grisea*.

Será submetido na Animal Behaviour

Priscilla, A. Dantas¹, Vinicius Queiroz^{1*} e Marcio R. Custódio¹

1 - Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Resumo: Comportamento e aprendizado são processos intimamente relacionados, o que pode ser percebido ao se analisar suas definições. O comportamento é caracterizado como uma modificação na atividade de um indivíduo em resposta a um sinal externo ou interno, ou ainda a uma associação de sinais. Já a aprendizagem, pode ser vista como uma mudança duradoura do comportamento envolvendo estímulos e respostas específicas que resultam de experiências anteriores. Assim, o comportamento é passível de ser modulado (aprendido), e esta modulação depende da experiência prévia do indivíduo. Dentre os diferentes tipos de aprendizagem pode-se citar a habituação. Embora menos complexo, é um processo importante para a sobrevivência do indivíduo, já que pode ser responsável pelo aprendizado básico na diferenciação de estímulos ambientais nocivos e não nocivos. O presente estudo se concentra em três pontos principais; avaliar se a resposta comportamental defensiva será diferenciada a depender do local onde o estímulo é aplicado; se a experiência prévia é capaz de afetar a intensidade da resposta defensiva e se parâmetros ambientais podem modular esta resposta. Para isso, 100 holotúrias foram usadas, sendo divididas em grupos diferentes a depender do experimento. Nestes, um indivíduo foi considerado habituado quando o animal não contraía mais sob estimulação adicional. Inicialmente, foi investigada a habituação das regiões oral ou anal por meio de estimulação mecânica. Em seguida, novos estímulos foram habituados na mesma região, mas o processo foi repetido a cada hora por seis vezes. A habituação ocorreu independentemente da região, mas as respostas orais e anais foram consistentemente diferentes. A experiência anterior também afetou a capacidade do aprendizado. A habituação oral ocorreu em todos os testes sucessivos, enquanto a habituação anal parou na terceira tentativa. Respostas orais diminuídas durante o processo enquanto os anais foram afetados. Por último, a habituação parece ser influenciada pelo fotoperíodo visto que houve diferenças na resposta quando comparada com a habituação diurna e noturna. Em holothuroidea, os tentáculos orais estão associados à captura de alimentos e percepções ambientais. Neste contexto, acreditamos

que a importância fisiológica dessas estruturas pode ajudar a explicar o porquê às respostas orais eram mais complexas que os anais.

Palavras-chave: habituação, comportamento defensivo, invertebrados.

1. Introdução

Comportamento e aprendizado são processos intimamente relacionados, e este fato pode ser percebido ao se analisar as suas definições. O comportamento pode ser caracterizado como uma modificação na atividade de um indivíduo em resposta a um estímulo, um sinal externo ou interno, ou ainda a uma associação de sinais (Ostermann e Cavalcanti, 2011). Já a aprendizagem, pode ser vista como uma mudança duradoura nos mecanismos de comportamento, envolvendo estímulos e/ou respostas específicas que resultam de experiências anteriores (Domjan, 2010). Desta forma, fica claro que o comportamento é passível de ser modulado (aprendido), e que esta modulação depende da experiência prévia do indivíduo. De fato, os textos sobre o comportamento animal têm dividido este processo em inato – que é intrínseco ao indivíduo e não depende de experiência prévia para ser executado - e aprendido (Scott, 2009).

Dentre os diferentes tipos de aprendizagem – (i.e. aprendizagem não associativa e associativa – Sato, 1995; Präss, 2013) – pode-se citar a habituação. Embora seja um dos modos menos complexos (Eisenstein *et al.*, 2001), é um processo importante para a sobrevivência do indivíduo. Em uma perspectiva multissensorial, o processo de habituação pode ser responsável pelo aprendizado básico na diferenciação de estímulos ambientais nocivos e não nocivos (Gray, 2005; Bullock *et al.*, 2009). Esta percepção sobre a natureza dos diferentes tipos de estímulos (nociva ou inofensiva) pode ser vista no clássico estudo de Eric Kandel (Kandel *et al.*, 1976), que mostrou que o comportamento de retração das brânquias do molusco *Aplysia*, pode ser modulado a depender da experiência prévia do animal. Ou seja, o indivíduo é capaz de aprender sobre a natureza do estímulo, adequando assim a sua resposta. Ainda, Bullock e colaboradores (Bullock *et al.*, 2009), afirmam que “evitar a predação torna-se mais provável ao focar em estímulos produzidos por predadores, pois estímulos menos ameaçadores não desencadeariam

uma resposta, reduzindo assim a quantidade de tempo gasto em estímulos irrelevantes”. Assim, a habituação pode ser vista como um processo fisiologicamente relevante, capaz de evitar um estado de alarme constante, bem como o desperdício de energia em reações comportamentais dispendiosas e desnecessárias (Ardi *et al.*, 2017).

Além de ser dividido em inato e aprendido, o comportamento também pode ser agrupado de acordo com a sua finalidade biológica, como por exemplo, comportamentos migratórios (Able e Bigman 1987), territoriais (Bates, 1970), sexuais (Hellier *et al.*, 2018) e defensivos (Dielenberg e McGregor, 2001). Este último agrupa atividades que ocorrem em resposta a uma série de perigos que ameaçam a vida do organismo, tais como a ameaça advinda de predadores, competidores, indivíduos coespecíficos, ou até mesmo de características ameaçadoras do ambiente (Blanchard *et al.*, 2007). Estes comportamentos defensivos apresentam variados graus de complexidade, onde a fuga (Fiuza, 2011), imobilidade (*freezing*) ataques e ameaças defensivas (*Defensive attack* e *Defensive threat*), dentre outros (Blanchard *et al.*, 2007), estão entre os mais conhecidos. Tais comportamentos têm sido bastante estudados em vertebrados (Reiche e Rocha-Barbosa, 2021), onde o conhecimento é bastante elevado, tanto em nível sistêmico (Hertz *et al.*, 1982), como em nível celular e molecular (Cordeiro, 2010). Já para os invertebrados marinhos, o nível de conhecimento é consideravelmente inferior.

O termo “invertebrado”, embora muito conhecido, é utilizado para agrupar organismos geralmente pouco relacionados evolutivamente, mas que perfazem mais de 95% da biodiversidade animal já descrito (Alves e Santos, 2018). Nestes animais, as repostas defensivas são classificadas em três categorias principais, sendo elas morfológicas, químicas e comportamentais (Harvell, 1992; Pawlik, 1993; Relyea, 2001; Carli, 2022). A primeira considera o desenvolvimento e a utilização de elementos estruturais do animal, tais como espinhos e conchas (Carli e Farabollini, 2022). A segunda envolve a produção ou incorporação de compostos químicos de diversas classes (e.g. ácidos, moléculas orgânicas, proteínas), que podem estar dispersos pelos tecidos ou confinados a uma estrutura específica. Já as defesas comportamentais são desencadeadas quando há um encontro direto ou

indireto (e.g. percepção química) com a ameaça. Nos invertebrados mais basais, embora os estudos sejam escassos, a retração e a imobilidade estão entre os principais tipos de comportamento defensivo. Por outro lado, naqueles mais derivados, tais como insetos e crustáceos (Arthropoda), o conhecimento é relativamente maior e sabe-se de mecanismos mais complexos (Almeida, 2010). Para os equinodermos, que embora não sejam vistos como invertebrados basais tal como entendido para esponjas e cnidários, o conhecimento acerca do comportamento defensivo ainda é incipiente.

Echinodermata é um filo de invertebrados marinhos, comumente conhecidos pela sua simetria pentaradial e pela sua proximidade evolutiva com os vertebrados, uma vez que são deuterostômios (Pawson, 2007). Equinodermos possuem um sistema nervoso bastante simplificado, composto por um anel nervoso circum-oral a partir do qual se estendem nervos radiais para cada um dos braços ou regiões correspondentes a depender do grupo (e.g. ambúlacro nos Holothuroidea) (Boooltian, 1966). Neste sentido, devido a sua simplicidade anatômica e do sistema nervoso, os Echinodermata se mostram como um grupo interessante para estudos de aprendizagem e comportamento. Em relação ao comportamento, embora estudos com tal foco não sejam muito comuns sabe-se que pelo menos Asteroidea (Deaker *et al.*, 2021), Ophiuroidea (Pomory, 2001) e Echinoidea (Ghyoot e Jangoux, 1991) apresentam algum tipo de comportamento defensivo.

No caso dos Holothuroidea (pepinos do mar), as estratégias de defesa parecem ser predominantemente baseadas em mecanismos morfológicos e químicos (Hamel e Mercier, 2000; Thimmappa *et al.*, 2022), com poucas evidências de comportamentos defensivos. Nestes organismos, a contração do corpo inteiro ou de partes específicas pode ser visto como um comportamento defensivo importante. Por exemplo, a retração dos tentáculos orais, responsáveis pela alimentação e percepção ambiental, protegeria uma parte funcionalmente muito relevante ao animal. Recentemente, observou-se que este comportamento de retração da região oral pode ser habituado nas espécies *Holothuria grisea*, *Isostichopus badionotus* e *Chiridota rotifera* (ver Capítulo I). Ou seja, estes animais são capazes de aprender sobre estímulos na região oral e responder de acordo com este aprendizado. Além disso, a

habituação apresentou diferentes padrões espécie-específicos, e aparentemente não é alterada pela idade dos indivíduos. Neste sentido, o presente estudo visa aprofundar mais o entendimento acerca deste comportamento defensivo, na tentativa de entender como ele pode ser modulado (aprendido) e o que o afeta. Usando a espécie *Holothuria grisea* como modelo, a abordagem será focada em três pontos principais: (1) avaliar se a resposta comportamental defensiva será diferenciada a depender do local onde o estímulo for aplicado; (2) se a experiência prévia é capaz de afetar a intensidade da resposta defensiva; e (3) se parâmetros ambientais podem modular esta resposta. Será analisado se estímulos na região oral e caudal afetam diferentemente o comportamento defensivo de retração, bem como se experiências de curto e longo prazo (1h e 24h) e o fotoperíodo alteram tal comportamento.

2. Materiais e métodos

2.1 Coleta e manutenção dos animais

Todos os animais foram coletados sob licença (SISBIO Nº 28917-1) na Praia Grande, Canal de São Sebastião, São Paulo, Brasil (23°49'24" S, 45°25'01" O). Foram coletados um total de 100 indivíduos da espécie *Holothuria grisea*, que foram mantidos em temperatura ambiente em dois tanques de 500 L, abastecidos com água do mar natural corrente, no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP). Os organismos foram alimentados com sedimento, que consistiam em uma mistura de areia fina e cascalho, coletados no mesmo local dos organismos. Os animais foram mantidos por um período de 24-36h até o momento dos experimentos, na tentativa de garantir que as condições laboratoriais não alterassem a biologia dos indivíduos. Após as análises, os animais foram devolvidos aos tanques por 24-36h para recuperação e liberados no mesmo local onde foram coletados.

2.2 Efeito do local de estimulação sobre a habituação do comportamento defensivo

Para estes experimentos, 20 animais foram divididos em dois grupos (n=10 para cada grupo), sendo um com estimulação somente na região oral (peribucal) e o outro somente na região caudal (perianal). Os animais foram retirados dos tanques, colocados individualmente em uma cuba de vidro conforme descrito anteriormente (Dantas et al. *in prep.* ver Capítulo I). Após os espécimes atingirem o estado relaxado, eles foram tocados com um bastão de vidro de 0,5 mm de diâmetro na região oral ou caudal. A estimulação mecânica foi repetida até que o indivíduo parasse de reagir aos estímulos e permanecesse relaxado ao ser tocado, significando que o comportamento defensivo tinha sido habituado. Após a habituação, um novo estímulo (químico) foi oferecido, consistindo em borrifar água MilliQ, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, diretamente na região oral ou caudal dos indivíduos habituados. Após a recuperação desse novo estímulo, foi realizada outra estimulação mecânica para observar se o animal era capaz de responder novamente. Isso permitiu confirmar se os animais estavam de fato habituados ou se a falta de resposta se devia a outros processos, como fadiga ou adaptação sensorial (Rankin et al., 2009).

2.3 Efeito da experiência prévia sobre a habituação do comportamento defensivo

Para a avaliação do efeito da experiência sobre o processo de habituação do comportamento defensivo, analisou-se como a experiência de curto (1h) e longo (24h) prazo poderiam afetar as respostas da região oral e caudal. Para estes experimentos, 60 animais foram divididos em quatro grupos de 15 indivíduos: curto prazo oral e caudal e longo prazo oral e caudal. Eles foram colocados em aquários individuais, e o processo de habituação foi realizado. Para os experimentos de curto prazo, que tiveram a duração de um dia, os indivíduos foram habituados por seis vezes, em intervalos de 1h; enquanto nos experimentos de longo prazo, que tiveram a duração de sete dias, os indivíduos foram habituados uma vez por dia, sempre no mesmo

horário para evitar interferência do fotoperíodo. Para os experimentos de curto prazo, um estudo piloto foi realizado a fim de estipular o número de habituações máximas, enquanto nos de longo prazo, o número de dias foi obtido da literatura com invertebrados (Maldonado *et al.*, 1997; Stopfer *et al.*, 1996). Em todos os experimentos os indivíduos não foram removidos dos aquários para a habituação, para evitar alguma correlação entre os estímulos de remoção do aquário e a estimulação mecânica. Assim, os indivíduos dos experimentos de curto e longo prazo foram habituados na região oral e caudal, na posição em que se encontravam nos aquários.

2.4 *Efeito do fotoperíodo sobre a habituação do comportamento defensivo*

A fim de investigar se o fotoperíodo afeta o processo de habituação, foram realizados dois experimentos, um durante o dia e um durante a noite. Os animais (n=20) foram divididos em dois grupos e colocados individualmente em aquários. Os experimentos do período diurno, foram realizados por volta das 9h da manhã, sob luz natural, 3h após o nascer do sol. Os experimentos do período noturno, foram realizados por volta das 23h, sob luz vermelha, 5h após o pôr do sol. A iluminação com luz vermelha foi utilizada, primeiramente para propiciar a realização do experimento, identificação de cada indivíduo, assim como a sua resposta, e devido ao seu efeito reduzido sobre o ciclo circadiano (Jud *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2020). Para o fotoperíodo, somente a habituação oral foi avaliada.

2.5 *Parâmetros avaliados e análises estatísticas*

Em todos os experimentos, quatro parâmetros foram mensurados: frequência de habituação (FA); tempo de habituação (TH); tempo de deshabituação (TD); tempo médio de resposta (MTR), este último sendo relativo à região oral ou caudal, a depender do experimento. Os valores de todas as medidas foram expressos como média \pm desvio padrão (M \pm DP). No caso da habituação de curto prazo, como as diferentes regiões não responderam de forma semelhante (i.e. a região caudal parou de responder a partir da quarta tentativa), somente estimulações biologicamente similares foram consideradas.

As diferenças nos parâmetros de habituação em relação às diferentes regiões corporais (oral x caudal) e ao fotoperíodo (dia x noite) foram analisadas por meio de Test T de Student não pareado. As diferenças na habituação de curto e longo prazo, foram analisadas por meio de uma Anova de duas vias (two-way ANOVA). Para a habituação de curto prazo, região corporal (oral e caudal) e ordem de estimulação (primeira, segunda e última) foram consideradas como fatores. Para a habituação de longo prazo, região corporal (oral e caudal) e dia de estimulação (1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6° e 7°) foram os fatores considerados. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ e todas as análises estatísticas foram feitas com o GraphPad Prism 7 Statistical Software (EUA, v7.00).

3 Resultados

A espécie *Holothuria grisea* respondeu de forma consistente às estimulações mecânicas, uma vez que todos os espécimes analisados foram habituados, independentemente do local estimulado (região oral ou caudal), da experiência prévia (curto ou longo prazo) ou do fotoperíodo (dia ou noite). No entanto, apesar da similaridade das reações exibidas por todos os exemplares analisados, foi possível detectar padrões diferenciados. Estes foram diretamente dependentes do local de estimulação, do tempo entre habituações e do fotoperíodo, bem como a região oral, no geral, mostrou valores maiores que a região caudal. Os detalhes de cada experimento são mostrados a seguir.

3.1 Efeito do local de estimulação sobre a habituação do comportamento defensivo

Os experimentos analisando o efeito do local de estimulação sobre o processo de habituação do comportamento defensivo mostraram claramente a existência de padrões específicos para as regiões oral e caudal (Figura 1). Com relação à frequência de habituação, tempo de habituação e tempo médio de resposta (Figura 1 e Tabela 1), os valores da região oral foram significativamente maiores que o da região caudal. No entanto, o tempo de desabituação foi similar entre as regiões (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1: Principais parâmetros analisados durante o processo de habituação caudal e oral da *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

Região	Frequência de habituação (n° toques)	Tempo de habituação (s)	Tempo de desabituação (s)	Tempo médio de resposta (s)
Oral	8,0 \pm 2,8	222,2 \pm 85,6	96 \pm 30,9	27,3 \pm 3,4
Caudal	5,5 \pm 1,4 *	106 \pm 34,7 *	96 \pm 30,6	19,2 \pm 2,9 *

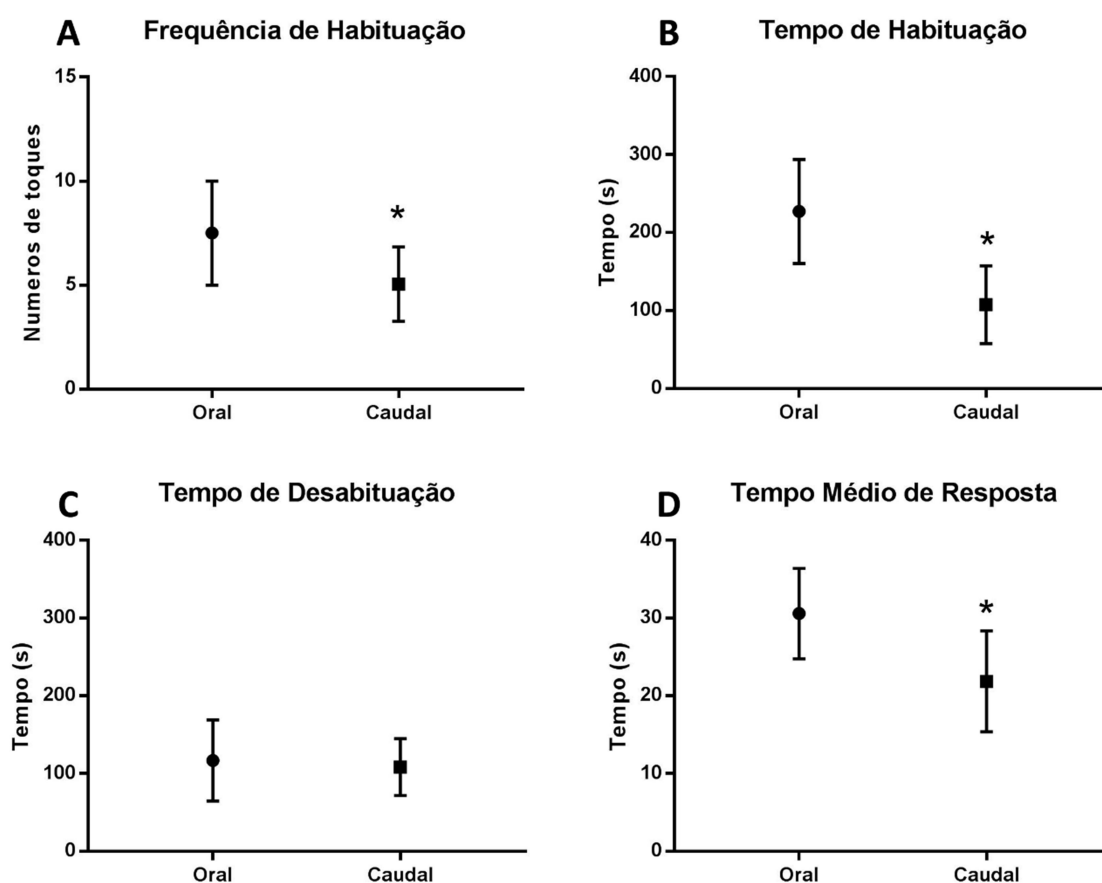


Figura 1: Efeito da estimulação de diferentes regiões sobre o processo de habituação caudal e oral da *Holothuria grisea*. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

3.2 Efeito da experiência prévia sobre o processo de habituação do comportamento defensivo

O processo de habituação foi influenciado pela experiência prévia dos indivíduos, tanto em curto como em longo prazo. A tendência geral para os experimentos de experiência prévia foi de maiores valores para a região oral

no início do processo (Tabela 2 e 3), quando comparados com a caudal, seguido por uma diminuição dos valores da região oral, chegando a valores bem próximos aos da caudal (Figura 2 e 3). Também é importante destacar que houve pouca variação nos valores da região caudal, mantendo-se em um patamar relativamente estável.

Com relação à experiência de curto prazo, notou-se que a região oral respondeu a todas as vezes na qual o processo de habituação foi realizado, enquanto a caudal só pôde ser habituada por três vezes, havendo muito pouca resposta a partir da quarta tentativa (Tabela 2). Considerando-se a frequência de habituação da região oral, foi visível a diminuição do número de toques necessários para habituar os indivíduos à medida que o processo vai sendo repetido (Figura 2A e Tabela 2). Esta diminuição da primeira até a última habituação é significativa, mesmo visualmente, e difere da região caudal, quando se considera a primeira habituação (Figura 2A). Já para a região caudal, os valores entre a primeira, segunda e última habituação são bastante similares (Figura 2A e Tabela 2). Situação similar também ocorreu com o tempo de habituação, reduzido em quase 50% se compararmos a primeira e a última habituação, e que também diferiu da região caudal na primeira e na segunda habituação (Figura 2B e Tabela 2). Em relação ao tempo de desabituação e ao tempo médio de resposta, de forma geral, os valores da região oral e caudal foram bem similares ao longo das habituações sucessivas (Tabela 2 e Figura 2 C e D). Para o tempo de desabituação, os valores da região oral começaram levemente maiores que o da região caudal, mas logo na segunda estimulação tornaram-se menores (Figura 2C). Já para o tempo médio de resposta, os valores da região oral foram um pouco maiores que o da região caudal na primeira e segunda tentativas, mas tornaram-se bastante similares na última (Figura 2D).

Tabela 2: Parâmetros analisados durante as sessões de habituação oral e caudal na espécie *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

Ordem de Habituação ^o	Frequência de habituação (n° toques)		Tempo de habituação (s)		Tempo de desabituação (s)		Tempo médio de resposta (s)	
	Caudal	Oral	Caudal	Oral	Caudal	Oral	Caudal	Oral
1°	4,0 \pm 2,0	4,6 \pm 2,0	104 \pm 51	117 \pm 51	133 \pm 43	124 \pm 35	27,1 \pm 7,2	26,7 \pm 8,0
2°	3,4 \pm 1,1	3,4 \pm 1,1	96 \pm 30	96 \pm 32	142 \pm 65	145 \pm 69	27,8 \pm 11,9	29,4 \pm 10,3
3°	3,0 \pm 1,1	3,0 \pm 1,0	84 \pm 32	81 \pm 32	147 \pm 73	143 \pm 74	27,70 \pm 7,9	27,3 \pm 7,8
4°	5,0 \pm 2,6	4,2 \pm 1,4	125 \pm 71	109 \pm 39	133 \pm 52	111 \pm 87	24,9 \pm 5,4	26,2 \pm 7,6
Última	3,8 \pm 1,4	3,2 \pm 1,2	100 \pm 43	54 \pm 28	126 \pm 44	105 \pm 29	26,2 \pm 8,0	20,5 \pm 17,9

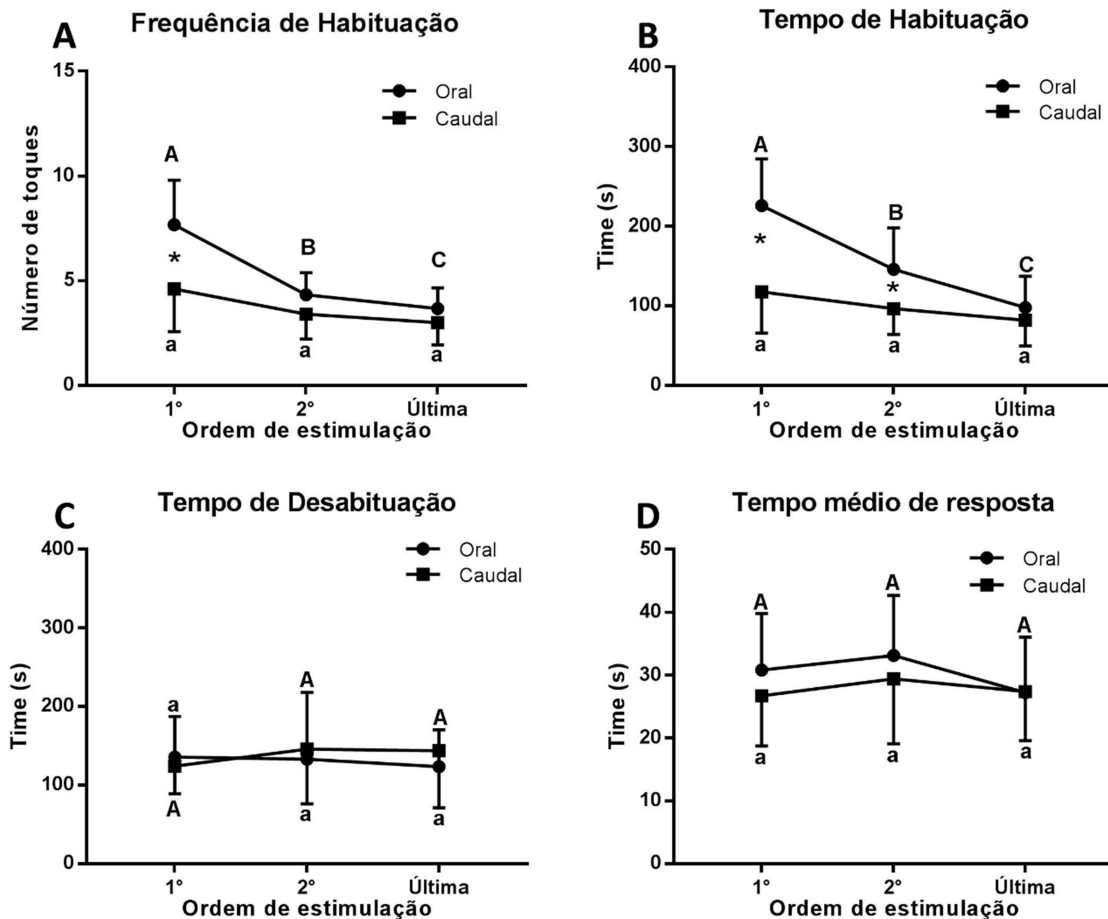


Figura 2: Efeito da experiência prévia de curto prazo sobre o processo de habituação oral e caudal em *Holothuria grisea*. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre diferentes habituações orais, enquanto letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) na região caudal. Asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre regiões oral e caudal. No gráfico, somente os resultados mais expressivos são mostrados (1°, 2° e última habituação), mas os resultados completos podem ser vistos na Tabela 2.

Com relação ao efeito da experiência prévia de longo prazo sobre o processo de habituação, novamente, dois grandes padrões puderam ser observados: a diminuição na maioria dos parâmetros analisados no terceiro dia; bem como uma diferença marcante entre o primeiro e último dia nos resultados de frequência e tempo de habituação (Figura 4). Para a região oral, os valores da frequência de habituação foram mais altos no primeiro dia, diminuindo consecutivamente até o terceiro dia (Figura 3A e Tabela 3). No quarto dia, os valores aumentaram novamente a valores similares aos do segundo dia, mantendo-se neste padrão até o sexto dia e voltando a diminuir no sétimo (Figura 3A e Tabela 3). O tempo de habituação seguiu um padrão bastante similar ao parâmetro anterior, com os maiores valores no primeiro dia seguido pela sua diminuição marcante em direção ao terceiro dia (Figura 3B e Tabela 3). O tempo de habituação aumentou novamente, atingindo no quinto dia valores próximos aos do primeiro (Figura 3B e Tabela 3), mas voltando a cair novamente e atingindo os valores mais baixos no sétimo dia (Figura 3B e Tabela 3). Com relação ao tempo de desabituação, os indivíduos desabituarão mais rápido no terceiro e quinto dia, apresentando valores mais altos e muito similares entre si no 1°, 2°, 4° 6° e 7° dias (Figura 3C e Tabela 3). Foi possível observar uma diferença nos tempos de desabituação entre as regiões oral e caudal no 1°, 3° e 5° dias (Figura 3C e Tabela 3). Por fim, a análise do tempo médio de resposta mostrou que, embora os valores do 1°, 6° e 7° dia sejam os menores, em geral foram similares, e houve diferenças entre a região oral e caudal nos 4° e 5° dias (Figura 3D e Tabela 3). Em relação à região caudal, para todos os parâmetros os valores foram muito similares entre os diferentes dias, sem diferenças marcantes (Figura 3A-D e Tabela 3).

Tabela 3: Principais parâmetros analisados durante o processo de habituação de longo prazo na região oral e caudal da *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

Dias	Frequência de habituação (n° toques)		Tempo de habituação (s)		Tempo de desabituação (s)		Tempo médio de resposta (s)	
	Oral	Caudal	Oral	Caudal	Oral	Caudal	Oral	Caudal
1°	5,9 \pm 2,8	5,5 \pm 2,8	194 \pm 79	180 \pm 81	120 \pm 28	115 \pm 22	34 \pm 7,5	33 \pm 6,0
2°	4,5 \pm 2,0	4,2 \pm 1,4	186 \pm 79	175 \pm 79	144 \pm 30	146 \pm 25	43 \pm 10,8	42 \pm 10,7
3°	3,5 \pm 1,4	3,2 \pm 1,2	136 \pm 78	120 \pm 55	72 \pm 25	73 \pm 32	37 \pm 6,9	37 \pm 7,7
4°	5,1 \pm 3,3	5,0 \pm 4,0	178 \pm 58	173 \pm 62	144 \pm 41	141 \pm 53	40 \pm 11,9	39 \pm 7,3
5°	4,7 \pm 1,6	4,4 \pm 1,6	189 \pm 81	176 \pm 80	78 \pm 40	75 \pm 37	41 \pm 15,0	41 \pm 14,9
6°	4,9 \pm 2,5	4,7 \pm 3,0	156 \pm 64	150 \pm 82	198 \pm 141	196 \pm 30	33 \pm 9,7	34 \pm 6,5
7°	3,3 \pm 0,8	3,3 \pm 0,5	110 \pm 28	110 \pm 39	126 \pm 18	126 \pm 20	31 \pm 9,7	3 \pm 7,1

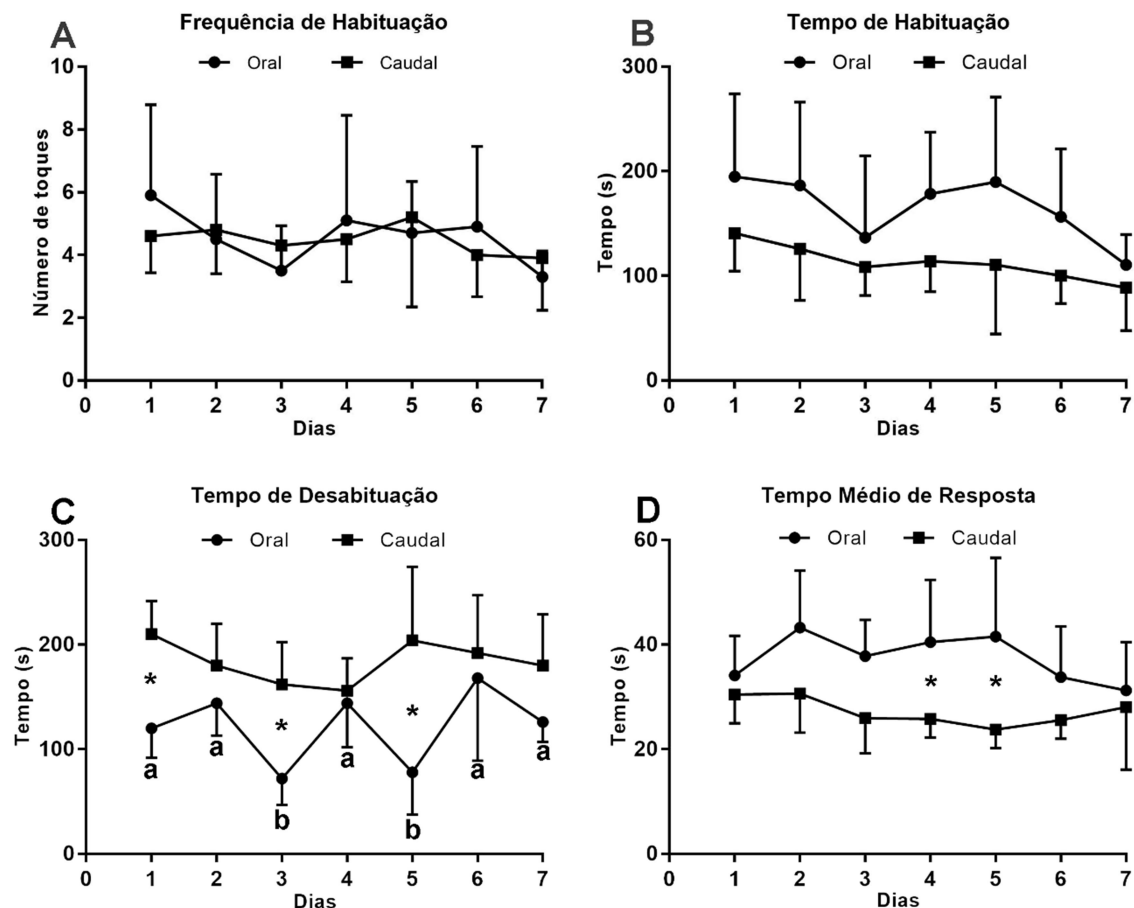


Figura 3: Efeito da experiência prévia de longo prazo sobre o processo de habituação oral e caudal em *Holothuria grisea*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) na mesma região corporal. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre regiões corporais.

3.4 Efeito do fotoperíodo sobre o processo de habituação oral e caudal

Os valores de frequência de habituação, tempo de habituação e tempo de desabituação foram bastante similares, indicando que o fotoperíodo não teve influência nestes parâmetros (Tabela 4 e Figura 4A-C). A única exceção foi observada com o tempo médio de resposta, onde os valores do período diurno foram significativamente maiores que o do noturno (Tabela 4 e Figura 4A-C). Apesar dos valores não serem estatisticamente diferentes, podemos notar que todos os parâmetros do período noturno tiveram um valor menor quando comparados com o período diurno.

Tabela 4: Principais parâmetros analisados durante as sessões de habituação em relação ao claro e escuro da *Holothuria grisea*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

Fotoperíodo	Frequência de habituação (n° toques)	Tempo de habituação (s)	Tempo de desabituação (s)	Tempo médio de resposta (s)
Dia	7,2 \pm 3,0	180 \pm 78	123 \pm 13	24,7 \pm 8,6
Noite	6,1 \pm 1,9	117 \pm 39	99 \pm 59	19,3 \pm 3,4*

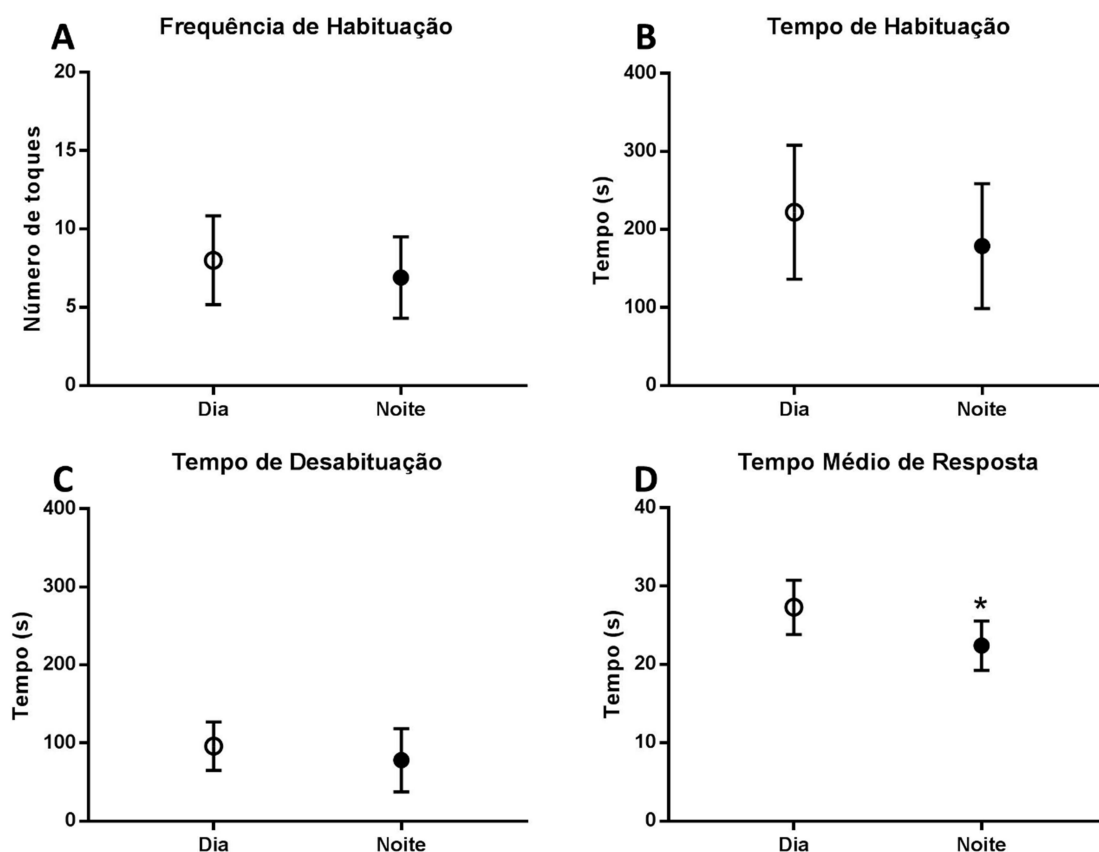


Figura 4: Efeito do fotoperíodo sobre o processo de habituação oral em *Holothuria grisea*. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4 Discussão

O comportamento defensivo tem sido bem estudado em todos os principais grupos de vertebrados, o que inclui peixes (Breder, 1963), anfíbios (Moroti et al., 2018), répteis (Martins et al., 2018), aves (Darbro e Harrington, 2007) e mamíferos (Crawford et al., 1981). A situação é bastante diferente com os invertebrados, com um visível desbalanço no nível de conhecimento entre os diferentes grupos. Em táxons como Insecta, Aracnida e Crustacea, o conhecimento é muito mais elevado e refinado (Cook et al., 2013; Kannan et al., 2022; Wicksten, 2011; Mateus, 2019), quando comparado, por exemplo, com os Echinodermata. Para estes últimos, apenas algumas das classes já foram estudadas (Ghyoot e Jangoux, 1991; Pomory, 2001; Deaker et al., 2021), e o conhecimento acerca do comportamento defensivo em Holothuroidea ainda é bastante escasso. Até onde sabemos somente um estudo já abordou o tema (Bingham e Braithwaite, 1986). Aqui, nós aprofundamos o entendimento acerca do comportamento defensivo em *Holothuria grisea*, principalmente em relação ao efeito do local de estimulação e sua modulação pelo aprendizado (habituação). Assim, pudemos observar que o comportamento defensivo desta espécie: (1) é dependente da região estimulada, sendo no geral, mais complexo na região oral; (2) é modificado pela experiência prévia dos indivíduos, tanto em termos de curto como de longo prazo, e essa modulação parece ocorrer somente na região oral; (3) parece ser influenciada pelo fotoperíodo.

Os resultados mostram que, embora as duas regiões avaliadas possam ser habituadas, o processo apresenta particularidades que dependem da região estimulada. Um estudo anterior com *Aplysia* mostrou que a habituação produzida pela estimulação de um lado da cauda não se generaliza para o outro lado do corpo (Stopfer et al., 1996). Isto indica que a alteração na resposta de um dos lados do animal parece permanecer confinada a um circuito neural específico. No caso, a distribuição sensorial/neural na cauda da *Aplysia* tem a característica ter simetria bilateral, com os mesmos componentes em ambos os lados na linha média do animal (Walters et al.,

1983), permitindo um melhor desenho experimental. No caso dos equinodermos, mesmo sendo tendo simetria pentaradial e capazes de perceber o ambiente em todas as direções (Fernández, 2013), a habituação de uma região (e.g. oral ou caudal) não pareceu afetar outra. O delineamento amostral aplicado no presente estudo não possibilita fazer afirmações mais detalhadas sobre o processo, já que não se tentou avaliar a resposta de uma região após a outra ter sido habituada. No entanto, foi claro que as respostas da região oral foram consistentemente diferentes da resposta da região caudal, o sugere que o processamento neural durante o processo de habituação possa ser no local da organização estrutural. Isto poderia aproximar o padrão de resposta com o observado para *Aplysia* (Stopfer *et al.*, 1996).

As holotúrias tiveram uma resposta diferenciada quando o estímulo foi aplicado na região caudal, sendo menos complexa que na região oral. No geral, as respostas da região oral tiveram valores maiores e muitas vezes estatisticamente diferentes dos valores obtidos para a região caudal. Os Holothuroidea são animais que apresentam uma grande diversidade de hábitos de vida, e são encontrados em praticamente todos os ambientes marinhos, variando desde áreas rasas até profundidades abissais (Stuckless, 207), e de regiões tropicais até polares (Toral-Grande *et al.*, 2008). Nestes animais, os tentáculos orais – estruturas presentes em todas as espécies do grupo – são anteriores. Estão associados a atividades exploratórias, à percepção ambiental e à captura de alimentos, sendo assim uma região bem sensível (Purcell *et al.*, 2012). Anatomicamente, a maior parte do tecido nervoso das holotúrias fica na região oral, representada pelo anel nervoso que circunda a boca. Já na região caudal, as estruturas nervosas são consideravelmente menos representativas. Neste contexto é bem provável que a importância fisiológica das estruturas na região oral possa explicar por que as respostas aos estímulos nesta área foram muito mais complexas que as caudais.

O comportamento defensivo da espécie *H. grisea* foi modulado pela experiência prévia dos indivíduos, tanto em termos de curto quanto longo prazo. Segundo Ajzen (2002) a frequência em que o comportamento foi realizado no passado determina a variação no comportamento posterior.

Sendo assim, os explicaria o porquê das holotúrias terem um padrão geral de resposta semelhante quando se compara habituações de curto e longo prazo. No presente trabalho, durante a habituação de curto prazo, os organismos estimulados na região oral responderam todas às vezes. Por outro lado, os que foram estimulados na região caudal pararam de responder depois da quarta tentativa. Novamente, o aspecto que poderia ajudar a entender as diferenças entre as respostas orais e caudais pode ser a concentração de tecido/órgãos nervosos nestas duas regiões. Em moluscos sabe-se que o neurotransmissor serotonina (5-HT), é liberado por células no anel nervoso durante a habituação de curto prazo. Este neurotransmissor age através da produção de cAMP e a ativação da proteína quinase A (PKA) (Angers *et al.*, 2002; Byrne *et al.*, 1991; Glanzman, 1989; Klein, 1993), facilitando a ação no terminal pré-sináptico dos neurônios. Considerando que este é um mecanismo evolutivamente conservado, é bastante provável que também esteja presente nos equinodermos. Contudo, não existem estudos que mostram esses mecanismos com equinodermos ou mesmo se há a retenção de habituação de curto e longo prazo.

Trabalhos com outros organismos sugerem que a habituação de longo e curto prazo na memória tem dois diferentes processos e mecanismos neurais. No caso do longo prazo, depende de neurotransmissores e receptores específicos que irão dar início a uma cascata de reações bioquímicas. O glutamato, quando ligados a receptores do tipo metabotrópicos, AMPA e NMDA ativaram a guanilil-ciclase (uma enzima celular). Essa enzima induz o aumento do mensageiro secundário guanidina-monofosfato-ciclíco (GMPc), ativando assim a proteína quinase G, promotora da formação de óxido nítrico e monóxido de carbono. Estes irão amplificar a resposta potencializando a ação do glutamato tanto pré- quanto pós-sináptica (Kemenes *et al.*, 2002; Silvério e Rosat, 2006). O treinamento de habituação de longo prazo no molusco *Aplysia* gera uma intensa depressão sináptica entre os neurônios mecanorreceptores e neurônios branquiais, essa depressão permite por mais de cinco semanas (Kandel, 1991; 2012).

Este é um fenômeno frequentemente observado em estudos de habituação (Groves e Thompson, 1970; Stopfer *et al.*, 1996; Ezzeddine e Glanzman, 2003). Um decréscimo semelhante também foi detectado em

experimentos realizados com anêmonas do mar (Logan e Beck, 1978), onde os animais retêm a habituação de longo prazo por quatro dias, havendo uma diminuição da resposta a partir do segundo dia. As holotúrias mostraram também um padrão de respostas semelhantes na habituação de longo prazo, com um decréscimo das respostas a partir do terceiro dia em ambas as regiões estimuladas. A exceção foi apenas o tempo de resposta da primeira estimulação, que inicialmente ficou alto antes de diminuir nas seguintes.

Por último, vimos que a habituação parece ser influenciada pelo fotoperíodo, visto que houve uma diferença na resposta ao compararmos a habituação diurna e noturna. As holotúrias são animais bentônicos, que se alimentam da matéria orgânica no sedimento e vivem sob ou embaixo de substratos ou em rochas (Purcell *et al.*, 2012). Ocupam uma diversidade de habitats marinhos em todo mundo, em áreas tropicais ou polares; zona entre marés e até em grandes profundidades (Toral-Granda *et al.*, 2008). O fotoperíodo frequentemente auxilia na sugestão para a sincronização de diversas adaptações fisiológicas e comportamentais (Hazlerigg e Loudon, 2008; Wood e Loudon, 2014), podendo ser por esse motivo que os animais tiveram uma resposta mais demorada no período diurno, sendo mais rápida no noturno, onde pode ter ataques de possíveis predadores.

5 Conclusões

Embora a habituação possa ser considerada uma forma relativamente simples de aprendizagem, pode ter implicações fisiológicas, ecológicas e evolutivas complexas. Seu estudo tem sido realizado principalmente em invertebrados, nos quais a organização simplificada do corpo, sobretudo os circuitos neurais, proporcionou conhecimentos sobre os mecanismos comportamentais, celulares e moleculares da memória. Apesar de haver grandes avanços nestes estudos com invertebrados, não há trabalhos comparáveis explorando até quanto a aprendizagem dos invertebrados pode ser afetada pelo comportamento pré-organizado de forma semelhante a vertebrados (Kawai *et al.*, 2004). No entanto, todos os modelos mais bem estudados são protostômios e a falta de um modelo simplificado de deuterostômios é evidente. Embora os mecanismos celulares e moleculares

mais básicos sejam compartilhados entre protostômios e deuterostômios, também apresentam diferenças consistentes, como a posição do cordão nervoso (Holland, 2015). Nossos resultados mostram que *H. grisea* pode ser habituada por estimulação mecânica as regiões oral e caudal, sendo que a frequência e o tempo de habituação foram aparentemente os melhores parâmetros para a análise das diferentes regiões.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do CEBIMar pelo suporte técnico durante as coletas e procedimentos experimentais. A PAD agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código de finanças 001), e o VQ agradece à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 2015/21460-5 e 2018/14497-8). Esta é uma contribuição do NP-BioMar (Centro de Pesquisa em Biodiversidade Marinha – USP).

Financiamento: Este estudo foi financiado por bolsas de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código de finanças 001) e de Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. 2015/21460-5 e 2018/14497-8).

Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesse: Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

Aprovação ética: Todas as diretrizes internacionais, nacionais e/ou institucionais aplicáveis para testes em animais, cuidados com animais e uso de animais foram seguidas pelos autores.

Amostragem e estudos de campo: Todas as licenças necessárias para amostragem e estudos de campo observacionais foram obtidas pelos autores junto às autoridades competentes (ICMbio) e são mencionadas no texto.

6 Referências

- Able, K. P., & Bingman, V. P. (1987). O desenvolvimento da orientação e comportamento de navegação em aves. *The Quarterly Review of Biology*, 62 (1), 1-29.
- Abramson, C. I.; Feinman, R. D. (1988) Classical conditioning of the eye withdrawal reflex in the green crab. *Journal of Neuroscience*, v. 8, n. 8, p. 2907-2912, 1988.
- Abramson, C. I., and Chicas-Mosier, A. M. (2016). Learning in Plants: Lessons from *Mimosa pudica*. *Frontiers in Psychology*, 7, 417.
- Almeida, F. S., Martins, L., & Farji-Brener, A. G. (2010). Estratégias de Artrópodes Contra Predação por Formigas em Floresta Secundária no Rio de Janeiro. *Entomo Brasilis*, 3(3), 69-72.
- Alves, S.A.M. & Santos, R.S.S. (2018). Método para monitoramento da atividade de insetos por meio de fotos: 1 - 8.
- Ardiel, E. L., Alex, J. Y., Giles, A. C., and Rankin, C. H. (2017). Habituation as an adaptive shift in response strategy mediated by neuropeptides. *NPJ Journal Science Learning*, 2(1), 1-10.
- Bates, B. C. (1970). Territorial behavior in primates: A review of recent field studies. *Primates*, 11(3), 271-284.
- Bingham, B. L., & Braithwaite, L. F. (1986). Defense adaptations of the dendrochirote holothurian *Psolus chitonoides* Clark. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 98(3), 311-322.
- Blanchard, D. C., Yang, M., Hebert, M., & Blanchard, R. J. (2007). Defensive Behaviors. p. 722-726. In: Fink, G. (Ed.). *Encyclopedia of Stress*, 2° Ed. Academic Press.
- Booolotian, R. A. (1966). *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, N.Y. 822p.
- Breder, C. M. (1963). Defensive behavior and venom in *Scorpaena* and *Dactylopterus*. *Copeia*, 1963(4), 698-700.
- Brown, G. D. (1998). Nonassociative learning processes affecting swimming probability in the seaslug *Tritonia diomedea*: habituation, sensitization, and inhibition. *Behavioural Brain Research*, 95(2), 151-165.

- Bullock, A. L., McKeown, C. L., and Robertson, M. W. (2009). Habituation and dishabituation to a vibrational stimulus by a millipede, *Orthoporus texicolens*. *Transaction of the Illinois State Academy of Science.*, 102(3-4), 199-204.
- Burrell, B. D., & Sahley, C. L. (2001). Learning in simple systems. *Current opinion in neurobiology*, 11(6), 757-764.]
- Carew, T. J., Castellucci, V. F., and Kandel, E. R. (1972). Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science*, 202(4374): 1306-1308.
- Carew, T. J.; Kandel, E. R. (1973). Acquisition and retention of long-term habituation in *Aplysia*: correlation of behavioral and cellular processes. *Science*, 182(4117), 1158-1160.
- Carli, G., & Farabollini, F. (2022). Defensive responses in invertebrates: Evolutionary and neural aspects. *Progress in Brain Research*, 271(1), 1-35.
- Crawford, M., Masterson, F. A., Thomas, L. A., & Ellerbrock, G. (1981). Defensive behavior and passive avoidance learning in rats and gerbils. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 18(3), 121-124.
- Commins, S. (2018). Habituation and Sensitisation in the *Aplysia*. In *Behavioural Neuroscience* (pp. 48-61). Cambridge: Cambridge University Press.
- Cook, D. R., Smith, A. T., Proud, D. N., Víquez, C., & Townsend Jr, V. R. (2013). Defensive responses of Neotropical harvestmen (Arachnida, Opiliones) to generalist invertebrate predators. *Caribbean Journal of Science*, 47(2-3), 325-334.
- Cordeiro Pessôa, P. (2010). *Avaliação dos efeitos fisiológicos e comportamentais causados por carbofuran em tilápia Oreochromis niloticus* (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).
- Darbro, J. M., & Harrington, L. C. (2007). Avian defensive behavior and blood-feeding success of the West Nile vector mosquito, *Culex pipiens*. *Behavioral Ecology*, 18(4), 750-757.
- Deaker, D. J., Balogh, R., Dworjany, S. A., Mos, B., & Byrne, M. (2021). Echidnas of the sea: the defensive behavior of juvenile and adult crown-of-thorns sea stars. *The Biological Bulletin*, 241(3), 259-270.

- Dielenberg, R. A., & McGregor, I. S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(7-8), 597-609.
- Edgecombe, G.D., Giribet, G., Dunn, C. W., Hejnol, A., Kristensen, R. M., Neves, R. C., Rouse, G. W., Worsaae, K., and Sørensen, M. V. (2011). Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution*. 11(2), 151-172.
- Eisenstein, E. M., Eisenstein, D., and Smith, J. C. (2001). The evolutionary significance of habituation and sensitization across phylogeny: A behavioral homeostasis model. *Integrative Psychological and Behavioral Science*, 36(4), 251-265.
- Ezzeddine, Y., Glanzman D. L. (2003). Prolonged habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia* depends on protein synthesis, protein phosphatase activity, and postsynaptic glutamate receptors. *Journal of Neuroscience*. 23: 9585–9594.
- Faber, T., Joerger, j., & Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural presentations of odors in the insect brain. *Natural neuroscience*. 2(1), 74-78.
- Farley, J.; Alkon, D. L. (1985) Cellular mechanisms of learning, memory, and information storage. *Annual review of psychology*.
- Fernández, R. D. (2013). Caracterização do habitat preferencial do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) nas poças do intertidal rochoso da costa norte portuguesa com técnicas de análise multivariada.
- Figueiredo, Luís C. O estudo do condicionamento clássico: Notas históricas e sistemáticas. *Psicologia*, 1980.
- Fiuza, L. M. D. S. C. (2011). Uso do espaço e comportamento de fuga dos lagartos da restinga de Praia das Neves, Espírito Santo.
- Frost W. N, Brandon C. L, Mongeluzi D. L. (1998) Sensitization of the *Tritonia* escape swim. *Neurobiology of Learning and Memory*. 69:126–35.
- Francour, P. (1997). Fish assemblages of *Posidonia oceanica* beds at Port-Cros (France, NW Mediterranean): assessment of composition and long-term fluctuations by visual census. *Marine Ecology*, 18(2), 157-173.

- Ghyoot, M., & Jangoux, M. (1991). Defensive behaviour of the echinoid *Sphaerechinus granulans* to external stimulus. In: *Echinoderm Research* (pp. 201-201). CRC Press.
- Gray, J. R. (2005). Habituated visual neurons in locusts remain sensitive to novel looming objects. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 2515-2532.
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: a dual-process theory. *Psychological review*, 77(5), 419.
- Hamel, J. F., & Mercier, A. (2000). Cuvierian tubules in tropical holothurians: usefulness and efficiency as a defence mechanism. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 33(2), 115-139.
- Harvey, C.D. (1992). Defesas induzíveis e mudanças de alocação em um briozoário marinho. *Ecology*, 73 (5), 1567-1576.
- Hawkins, Robert D.; Greene, Winifred; Kandel, Eric R. (1998). Classical conditioning, differential conditioning, and second-order conditioning of the *Aplysia* gill-withdrawal reflex in a simplified mantle organ preparation. *Behavioral neuroscience*, v. 112, n. 3, p. 636.
- Hazlerigg, D., and Loudon, A. (2008). New insights into ancient seasonal life timers. *Current Biology*. 18, 795–804
- Hellier, V., Brock, O., Candlish, M., Desroziers, E., Aoki, M., Mayer, C., ... & Bakker, J. (2018). Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Hellman, H. (1969) *Defense Mechanisms: from Virus to Man*. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Hertz, P. E., Huey, R. B., & Nevo, E. (1982). Fight versus flight: body temperature influences defensive responses of lizards. *Animal Behaviour*, 30(3), 676-679.
- Holland, L. Z. (2015). Evolution of basal deuterostome nervous systems. *The Journal of Experimental Biology*, 218(4), 637-645.
- Jaramillo, E., & McLachlan, A. (1993). Community and population responses of the macroinfauna to physical factors over a range of exposed sandy beaches in south-central Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 37(6), 615-624.

- Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H., & Albrecht, U. (2005). A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online*, 7(1), 101-116.
- Kandel, E. R. (1991) Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality *Principles of neural science*, 3, 1009-1031.
- Kandel E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CRE-1, CRE-2, and CRE-3. *Molecular brain*, 5(1), 14.
- Kandel, E. R., Brunelli, M., Byrne, I. & Castellucci, V. (1976). A common presynaptic locus for the synaptic changes underlying short-term habituation and sensitization of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. 40, 456-482.
- Kannan, K., Galizia, C. G., & Nouvian, M. (2022). Olfactory strategies in the defensive behaviour of insects. *Insects*, 13(5), 470.
- 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.
- Kemenes, I., Kemenes, G., Andrew, R. J., Benjamin, P. R., & O'Shea, M. (2002). Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Journal of Neuroscience*, 22(4), 1414-1425.
- Laurent, G. (1999). Dendritic processing in invertebrates: a link to function. In *Dendrites* (pp. 290-309). Oxford University Press.
- Leaton, R. N., & Supple Jr, W. F. (1986). Cerebellar vermis: essential for long-term habituation of the acoustic startle response. *Science*, 232(4749), 513-515.
- Li, D., Hao, J., Yao, X., Liu, Y., Peng, T., Jin, Z., & Meng, F. (2020). Observations of the foraging behavior and activity patterns of the Korean wood mouse, *Apodemus peninsulae*, in China, using infra-red cameras. *ZooKeys*, 992, 139.
- Lima, S. L.; Dill, L.M (1990). Decisões comportamentais tomadas sob risco de predação: uma revisão e um prospecto. *Jornal canadense de zoologia*, 68 (4), 619-640.

- Logan, C. A., & Beck, H. P. (1978). Long-term retention of habituation in the sea anemone (*Anthopleura elegantissima*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(5), 928.
- Maldonado, H., Romano, A., & Tomsic, D. (1997). Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 813-826.
- Martins, A., Baptista, G. M., Maciel, D. B., & Gonzalez, R. C. (2018). A new defensive behaviour for threadsnakes and the defensive repertoire of *Trilepida jani* (Pinto & Fernandes, 2012) (Epictinae: Leptotyphlopidae). *Herpetology Notes*, 11, 839-841.
- Mateus, JR (2019). 20. Comportamento Defensivo em Besouros. *Comportamento de insetos: um livro de referência de exercícios de laboratório e de campo*, 11.
- Maschke, M., Drepper, J., Kindsvater, K., Kolb, F. P., Diener, H. C., & Timmann, D. (2000). Involvement of the human medial cerebellum in long-term habituation of the acoustic startle response. *Experimental brain research*, 133(3), 359-367.
- Magnhagen, C. (1991). Predation risk as a cost of reproduction. *Trends in Ecology & Evolution*, 6(6), 183-186.
- McClintock, J. B., & Lawrence, J. M. (1982). Photoresponse and associative learning in *Luidia clathrata* Say (Echinodermata: Asteroidea). *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 9(1), 13-21.
- Moroti, M. T., Sestito, G., Pedrozo, M., Machado, I., & Santana, D. J. (2018). Defensive behaviors in *Bokermannohyla luctuosa* (Pombal and Haddad, 1993) (Anura, Hylidae). *Herpetology Notes*, 11, 233-237.
- Ornitz, E. M., & Guthrie, D. (1989). Long-term habituation and sensitization of the acoustic startle response in the normal adult human. *Psychophysiology*, 26(2), 166-173.
- Ostermann, F., & Cavalcanti, C. D. H. (2011). Teorias de aprendizagem. *Porto Alegre: Evangraf*, 32.
- Pawlik, J. R. (1993). Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*, 93(5), 1911-1922.

- Plappert, C.F.; Pilz, P.K. (2005). Habituação a longo prazo da resposta de sobressalto em camundongos evocados por estímulos acústicos e táteis. *Pesquisa do cérebro comportamental*, 162 (2), 307-310.
- Präss, A. R. (2012). Teorias de aprendizagem. *ScriniaLibris. com*, 23
- Pomory, C. M. (2001). An escape response behaviour in the brittle star *Ophiopteris papillosa* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, 34(3), 171-180.
- Purcell, S.W., Samyn, Y.; Conand, C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the world. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No. 6. Rome, FAO
- Rankin, C. H., Abrams, T., Barry, R. J., Bhatnagar, S., Clayton, D. F., Colombo, J., Thompson, R. F. (2009). Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of learning and memory*, 92(2), 135-138.
- Reiche, H., Hohl, L. S. L., & Rocha-Barbosa, O. (2021). Captura de alimentos e comportamento de fuga de *Leposternon microcephalum* Wagler, 1824 (Squamata: Amphisbaenia). *Brazilian Journal of Biology*, 84.
- Rocha, D. C. C. (2008). Características comportamentais de emas em cativeiro submetidas a diferentes fotoperíodos e relações macho: fêmea.
- Rose, J. K., & Rankin, C. H. (2001). Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory*, 8(2), 63-69.
- Relyea, R. A. (2001). Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators. *Ecology*, 82(2), 523-540.
- Rodriguez, S. R. and Ojeda, F. P. (1998) Behavioral responses of the sea urchin *Tetrapygus niger* to predators and food. *Marine and freshwater behaviour and physiology.*, 31, 21-37.
- Sato, T. (1995). Habituação e sensibilização comportamental. *Psicologia USP*, 6(1), 231-276.
- Schatz, B., Beugnam, G., & Lachaud, J. P. (1994) Time-place learning by an invertebrate, the ant *ectatomma reidum*. *Roger Animal Behavior*. 48(1), 236-238.
- Scott, G. (2009). Essential animal behavior. John Wiley & Sons.

- Silvério, G. C., & Rosat, R. M. (2006). Memória de longo-prazo: mecanismos neurofisiológicos de formação.
- Sih, A. (1985) Evolution, predator avoidance, and unsuccessful predation. *The American Naturalist.*, 125, 153-157.
- Stopfer, M., Chen, X., Tai, Y. T., Huang, G. S., & Carew, T. J. (1996). Site specificity of short-term and long-term habituation in the tail-elicited siphon withdrawal reflex of *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 16(16), 4923-4932.
- Stuckless, B. (2017). Locomotor Patterns of the Sea Cucumber *Cucumaria frondosa* in Response to Food, Predator Presence, and Photoperiod.
- Thimmappa, R., Wang, S., Zheng, M., Misra, R. C., Huang, A. C., Saalbach, G., & Osbourn, A. (2022). Biosynthesis of saponin defensive compounds in sea cucumbers. *Nature Chemical Biology*, 1-8.
- Tollrian, R. and Harvell, C. D. (Eds.) (1999) *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses*. Princeton University Press, Princeton.
- Tomsic, D., Pedreira, M. E., Romano, A., Hermitte, G., & Maldonado, H. (1998). Context-us association as a determinant of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal Learning & Behavior*, 26(2), 196-209.
- Thompson, R. F., and Spencer, W. A. (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73(1): 16.
- Thorpe, W. H. (1963) *Learning and instinct in animals*. London: Methuen. Totowa, New Jersey.
- Toral-Granda, V., Lovatelli, A., Vasconcellos, M., (2008) *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Sea cucumbers: a global review of fisheries and trade. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.*
- Tuf, I. H., Drábková, L., & Šipoš, J. (2015). Personality affects defensive behaviour of *Porcellio scaber* (Isopoda, Oniscidea). *ZooKeys*, (515), 159.
- Van Veldhuizen, H. D., & Oakes, V. J. (1981). Behavioral responses of seven species of asteroids to the asteroid predator, *Solaster dawsoni*

- (responses of asteroids to the predator *Solaster dawsoni*). *Oecologia*, 48(2), 214-220.
- Wicksten, M. K. (2011). Swimming and the stockade: defensive behaviors in the false arrow crab, *Metoporphaphis calcarata* (Brachyura: Inachidae). *Journal of Crustacean Biology*, 31(2), 249-253.
- Wood, S., and Loudon, A. (2014). Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology journal*. 222, R39–R59.
- Yang, M., Chen, Z., Hu, F., Sun, J., Ding, J., Chang, Y., & Zhao, C. (2020). Light spectra regulated foraging and feeding behaviors shed light on stock enhancement of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Aquaculture Reports*, 18, 100480.

Discussão geral e perspectivas

Segundo Skinner (1972) o aprendizado ocorre em função de mudanças no comportamento manifesto, sendo resultado de respostas individuais a eventos (estímulos) que ocorrem no meio. Assim, uma resposta produz uma consequência. A aprendizagem é dividida em dois tópicos, a não associativa (i.e. habituação e sensibilização) e a associativa (i.e. condicionamento clássico e operante) (Faria e Junior, 2017). Alguns invertebrados têm sido muito estudados ao longo dos anos, por conta do seu sistema nervoso estruturalmente simples (Satelle e Buckingham, 2006), principalmente artrópodes e moluscos (Langen *et al.*, 2000; Raderschall *et al.*, 2011; Lukowiak, 2013; Katz e Quinlan, 2019). Isto permitiu diversos avanços em diversos processos, como a habituação (Mather e Anderson, 1999) e o aprendizado associativo (Lukowiak *et al.*, 2003). No entanto, estes são animais protostômios, evolutivamente mais distantes de grupos mais derivados, deuterostômios como os vertebrados.

Há poucos trabalhos que utilizam deuterostômios para experimentos de aprendizagem. Os equinodermos são animais estritamente marinhos de linhagem deuterostômica e, como tal, mais relacionados aos vertebrados. De forma similar a artrópodes e moluscos, também possuem um sistema nervoso estruturalmente simples, radial e sem um cérebro central (Perry *et al.*, 2013). Assim poderiam ser bons modelos de estudo, por permitir isolar e identificar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao comportamento mais facilmente. Em vista disso, tem havido um aumento de estudos utilizando equinodermos em experimentos sobre aprendizagem associativa principalmente utilizando estrelas-do-mar (Valentincic, 2020; Freas e Cheng, 2022). No entanto, ainda se sabe muito pouco sobre este grupo de animais bastante diverso.

Como apresentado nos capítulos anteriores, as holotúrias mostraram ser um bom modelo de estudo para os processos de habituação (Capítulo 1 – cf. Figura 2). Oito espécies diferentes de equinodermos foram investigadas e *Holothuria grisea* se mostrou bem responsiva nos ensaios, além de ser uma espécie de fácil coleta e manutenção em laboratório. Essa espécie foi então a

que nos permitiu melhor sucesso em experimentos seguintes (Capítulo 2), no qual avaliamos a diferenciação da resposta da habituação em diferentes locais do corpo.

O projeto inicial previa ainda analisar se o neurotransmissor serotonina (5-HT) e inibidores seletivos de recaptção de serotonina (fluoxetina e sertralina) modulavam a habituação nas holotúrias. No entanto, estes experimentos não puderam ser finalizados devido à pandemia de SARS-CoV2. Os ensaios necessitavam de parceria com outros laboratórios para uso do equipamento de High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), para quantificar: (1) a 5-HT presente na holotúrias antes dos experimentos; (2) se depois que injetada a 5-HT no animal haveria absorção e aumento da quantidade do neurotransmissor; e (3) a análise total de 5-HT ao final do experimento.

A despeito desses problemas, foram realizados testes preliminares sem a quantificação mais precisa da 5-HT e dos fármacos nos tecidos. Nestes, em cada teste as holotúrias foram separadas por grupos: Controle (n=25); Salina (n=10), Fluoxetina 0,001 (n=10); 0,005 (n=10); 0,009 (n=10); Sertralina 0,001 (n=10); 0,005 (n=10); 0,009 (n=10); 5-HT 0,0001 (n=10); 0,0005 (n=10); 0,0009 (n=10), quantidades diluídas em 1ml com solução salina (com base em quantidades usadas na literatura: Lucki *et al.*, 1988; Aggio *et al.*, 1996; Santos, 2019). Os organismos passaram então pelo mesmo processo de habituação descrito no Capítulo 1. Ao analisar os resultados, pudemos observar que houve diferenças interessantes em todos os grupos. No parâmetro de frequência e tempo de habituação (Figura 1A-B) todos os grupos tratados diferiram estatisticamente dos grupos Controle e Salina. No tempo de habituação (Figura 1C) só houve diferenças estatísticas nas concentrações mais altas de fluoxetina, sertralina e 5-HT, novamente ao comparar com os grupos controle. No tempo médio de resposta, houve diferença estatística nos grupos de serotonina; na fluoxetina na concentração mais baixa (0,001 $\mu\text{g/g}$) e na sertralina na quantidade (0,005 $\mu\text{g/g}$)

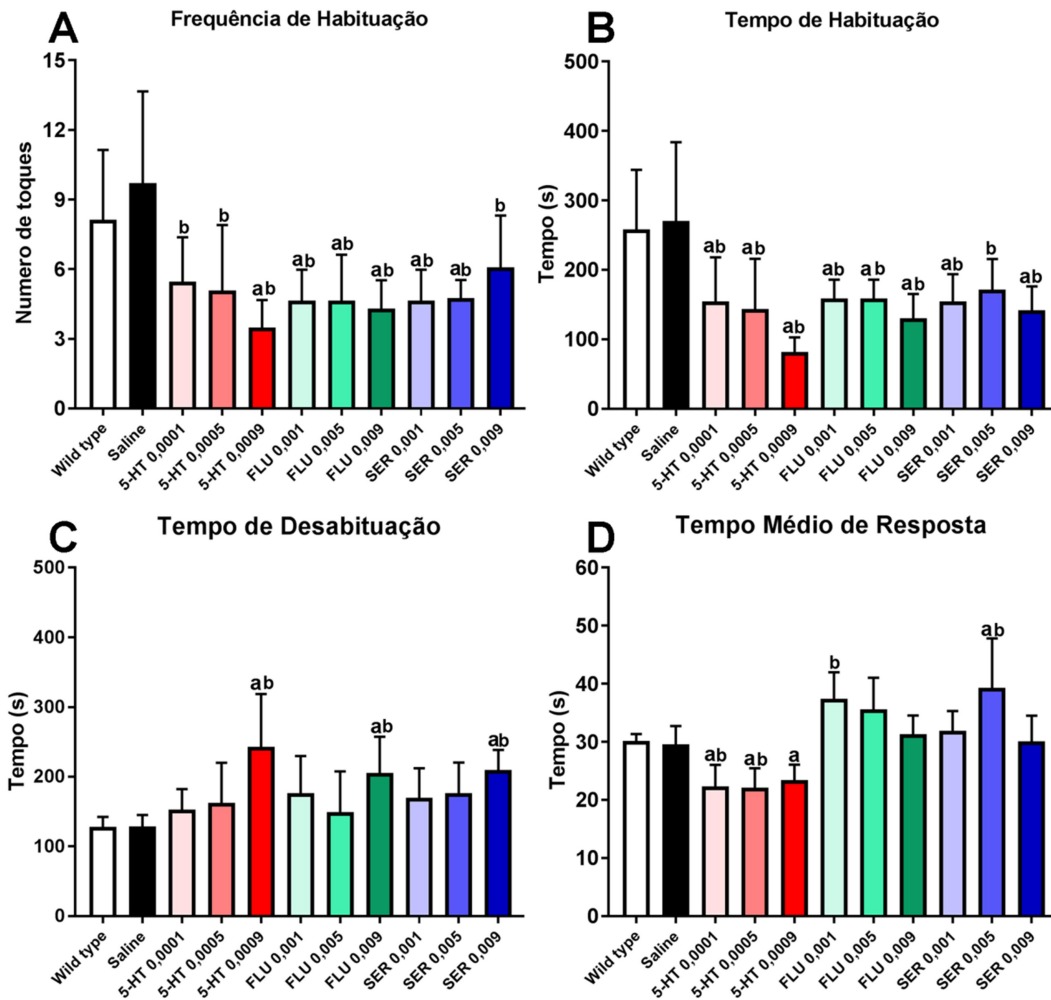


Figura 1: Parâmetros de habituação com diferentes concentrações dos fármacos – fluoxetina e sertralina e o neurotransmissor serotonina (em $\mu\text{g/g}$). As cores indicam as diferentes concentrações. Letras 'a' indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (wild type), enquanto as letras 'b' indicam diferenças estatísticas significativas referentes ao grupo de solução salina ($p < 0,05$).

Com o retorno à normalidade, esperamos que seja possível realizar em breve a quantificação da 5-HT e dos fármacos por HPLC para comparação com os dados preliminares obtidos. Desta forma será possível explorar o envolvimento da 5-HT, desvendando seu papel na habituação e no aprendizado associativo nas holotúrias.

Referências

- Aggio, J., Rakitín, A., & Maldonado, H. (1996). Serotonin-induced short-and long-term sensitization in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *53*(2), 441-448.
- Faria, N. C., & Júnior, C. A. M. (2017). Aprendizagem: Uma Abordagem Psicofisiológica. *Revista Ciências Humanas*, *10*(1), 99-107.
- Freas, C. A., & Cheng, K. (2022). Neuroecology beyond the brain: learning in Echinodermata. *Learning & Behavior*, *50*(1), 20-36.
- Katz, P. S., & Quinlan, P. D. (2019). The importance of identified neurons in gastropod molluscs to neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*, *56*, 1-7.
- Langen, T. A., Tripet, F., & Nonacs, P. (2000). The red and the black: habituation and the dear-enemy phenomenon in two desert Pheidole ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *48*(4), 285-292.
- Lucki, I., Kreider, M. S., & Simansky, K. J. (1988). Reduction of feeding behavior by the serotonin uptake inhibitor sertraline. *Psychopharmacology*, *96*(3), 289-295.
- Lukowiak, K., Sangha, S., McComb, C., Varshney, N., Rosenegger, D., Sadamoto, H., & Scheibenstock, A. (2003). Associative learning and memory in *Lymnaea stagnalis*: how well do they remember? *Journal of Experimental Biology*, *206*(13), 2097-2103.
- Lukowiak, G. I. M. K. (2013). Learning in Gastropod Molluscs. *Neurobiology and Behavior*, 95.
- Mather, J. A., & Anderson, R. C. (1999). Exploration, play and habituation in octopuses (*Octopus dofleini*). *Journal of Comparative Psychology*, *113*(3), 333.
- McClintock, J. B., & Lawrence, J. M. (1982). Photoresponse and associative learning in *Luidia clathrata* Say (Echinodermata: Asteroidea). *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, *9*(1), 13-21.
- Raderschall, C. A., Magrath, R. D., & Hemmi, J. M. (2011). Habituation under natural conditions: model predators are distinguished by approach direction. *Journal of Experimental Biology*, *214*(24), 4209-4216.

- Ruben, P., & Lukowiak, K. (1982). Habituation and dishabituation in isolated gill pinnules in *Aplysia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 71(4), 585-589.
- Santos, D. R. A. D. (2019). *Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos para invertebrados aquáticos* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Sattelle, D. B., & Buckingham, S. D. (2006). Invertebrate studies and their ongoing contributions to neuroscience. *Invertebrate Neuroscience*, 6(1), 1-3.
- SKINNER, Burrhus Frederic. (1972). *Tecnologia do ensino*. (Rodolpho Azzi, Trad.). São Paulo: Herder, Ed. da universidade São Paulo, 1972.
- Valentincic, T. (2020). Associative learning in the starfish *Marthasterias glacialis*, a simple model for the study of learning. In *Echinoderms: present and past* (pp. 337-341). CRC Press.