



Gisele Colognesi

Efeito do estressor moderado sobre o desafio social e o
crescimento na tilápia-do-nilo

São José do Rio Preto
2015

Gisele Colognesi

Efeito do estressor moderado sobre o desafio social e o
crescimento na tilápia-do-nilo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Gonçalves de Freitas

São José do Rio Preto
2015

Colognesi, Gisele.

Efeito do estressor moderado sobre o desafio social e o crescimento na tilápia-do-nylo / Gisele Colognesi. -- São José do Rio Preto, 2015

28 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Eliane Gonçalves de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia aquática. 2. Peixe – Comportamento. 3. Tilápia (Peixe) 4. Confinamento (Animais) 5. Stress (Fisiologia) 6. Isolamento social. I. Freitas, Eliane Gonçalves de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 597

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gisele Colognesi

Efeito do estressor moderado sobre o desafio social e o crescimento na tilápia-do-nilo

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Eliane Gonçalves de Freitas
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Carla Forte Maiolino Molento
Universidade Federal do Paraná

Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Criscuolo Urbinati
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP/Jaboticabal

São José do Rio Preto
27 de fevereiro de 2015

*“No mesmo instante em que recebemos pedras em nosso caminho, flores
estão sendo plantadas mais a frente. Quem desiste não as vê.”
Willian Shakespeare*

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, ao meu marido e a todos aqueles que colaboraram para
que fosse possível realizá-lo.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Eliane Gonçalves de Freitas pelos ensinamentos não só quanto ao estudo do comportamento animal, mas também pelos exemplos profissional e ético a mim ensinados durante estes anos.

Ao Profº Drº Eduardo de Almeida por nos disponibilizar seu laboratório e ao Drº Tiago Scremim pelo auxílio durante as análises hormonais.

À Profª Drª Rejane M. Góes e ao Profº Drº Eduardo de Almeida pela participação e pelas sugestões durante a qualificação.

Às Profªs Drªs Elisabeth Urbinati e Carla Molento por aceitarem o convite de participarem da banca examinadora deste trabalho.

À minha família por sonharem comigo e por terem me dado a base e o apoio sólidos para que esta meta se tornasse realidade.

À Rose que nos dá tanto suporte técnico, como físico, psicológico, emocional. Rosinha, foi uma honra ter sido sua companheira de aventuras durante estes anos! Muito obrigada!

Aos amigos que passaram pela minha vida antes, durante e depois do trabalho realizado!
Às pessoas que conheci no laboratório e por causa do laboratório! Manu, Camila e Ana muito obrigada pela amizade! Com certeza foi tudo mais fácil com a companhia de vocês!

Enfim, a todos aqueles que fizeram e que fazem parte da minha vida profissional e pessoal.

E, como uma folha não cai de uma árvore se não for da vontade de Deus! Agradeço a Ele por ter sempre me guiado nos caminhos do bem e por sempre preparar o que há de melhor em minha vida!

FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES
(Bolsa Mestrado)

Sumário

1.Introdução.....	1
2. Material e Métodos.....	3
2.1 <i>Aclimatação e manutenção</i>	3
2.2 <i>Delineamento</i>	4
2.3 <i>Condições do experimento</i>	6
2.4 <i>Indicadores de estresse</i>	6
2.5 <i>Desafio social</i>	7
2.6 <i>Réplicas</i>	9
3. Análise de dados.....	9
4. Conduta Ética.....	10
5. Resultados.....	10
5.1 <i>Indicadores de estresse</i>	11
5.1.1 <i>Níveis de cortisol plasmático</i>	11
5.1.2 <i>Frequência de batimento opercular</i>	11
5.1.3 <i>Taxa de crescimento específico (T.C.E)</i>	12
5.2 <i>Desafio social</i>	13
5.2.1 <i>Latência para o ataque</i>	13
5.2.2 <i>Frequência e duração de displays e de ataques</i>	13
5.2.3 <i>Testes de Correlação</i>	15
6. Discussão.....	15
Conclusão.....	20
7. Referências.....	21

RESUMO

Em ambientes naturais os animais são confrontados com diferentes estressores. Se o estressor é moderado e de curta duração, a resposta às informações ambientais é uma adaptação que permite que o animal responda imediatamente a uma situação ameaçadora. Além disso, manter os animais em ambientes que lhe ofereçam menores condições de estresse, por demandarem um menor gasto energético, pode melhorar sua taxa de crescimento. No entanto, estressores mais intensos podem desencadear um estado patológico conhecido como distresse que pode ser prejudicial a sua fisiologia e comportamento. O ambiente artificial, por sua vez, pode ser desprovido de novos estímulos, provocando monotonia igualmente considerada prejudicial ao animal. Assim, manter os animais sob condições de estressores moderados, que mantenham as características adaptativas ao animal seria uma condição que aumentaria sua prontidão ao desafio social e o seu crescimento. Dessa forma, nosso objetivo foi testar os efeitos do estressor moderado sobre o desafio social e o crescimento em peixes. Para isso 45 machos adultos de tilápia-do-nylo foram isolados e submetidos a três tratamentos: Situação de ambiente monótono (N = 13): ausência de estímulos novos no ambiente; Situação de estressor intenso (N = 12): confinamento; Situação de estressor moderado (N=9): perturbação no ambiente. Foram realizadas filmagens de 5 minutos duas vezes ao dia (9h e 14h) durante a apresentação aos estressores para quantificarmos a taxa de batimento opercular que foi utilizada como indicador de estresse assim como os níveis de cortisol plasmático e a taxa de crescimento específico. Além disso, foi avaliada a resposta do animal ao desafio social representado pelo teste do espelho durante o qual foram realizadas filmagens de 10 minutos. Em relação a taxa de crescimento observamos que situações de estressores moderados aumentaram o crescimento do animal, enquanto situações de ambiente monótono e estressores intensos a diminuíram. As interações agonísticas aumentaram em situações de estressor moderado, se mantiveram em condições de estressor intenso e diminuíram em situações de monotonia. Os níveis de cortisol não diferiram entre os tratamentos e a taxa de batimento opercular se manteve maior em situação de estressor intenso. Concluímos que o ambiente monótono reduz a motivação à defesa do território e exerce efeitos negativos sobre o crescimento. Estressores intensos mantêm a motivação a defesa do território e também exercem efeitos negativos em relação ao crescimento. E, por fim, estressores moderados aumentam a motivação à defesa territorial e aumenta o crescimento na tilápia-do-nylo.

Palavras-chave: estresse, monotonia, confinamento, isolamento social, agressividade

ABSTRACT

In natural environments, animals have to deal with numerous and constant challenges, being exposed to different stressors. Once the stressor is mild and of short duration, the answer to this environmental information is an adaptation that allows the animal immediately respond to a threatening situation. Also, keep the animals in environments that offer lower stress conditions you can improve your growth rate. However, more intense and long lasting stressors may trigger to a physiological condition known as distress. Artificial environments, in other hand, can provide a lack of stimuli and cause monotone, also considered to be detrimental to the animal. Keep the animals under mild stressors conditions are, therefore, to maintain adaptive features of the animal, which is a condition that increases the readiness to social challenge and improve individual's welfare. Thus, our aim in this study was to test the effects of mild stressors on the social challenge and welfare in fish. For this, 34 male adults of the fish Nile tilapia were isolated and subjected to three treatments: a) a situation of monotone (N = 13): absence of new stimuli in the environment; b) a situation of intense stress (N = 12): provided by individual containment; and c) a situation of mild stress (N = 9): disturbance in the environment. Video records of five minutes each were filmed twice a day, (9h and 14h) during the presentation of the stressors to the fish, to quantify the ventilatory rate, the plasma cortisol levels and the specific growth rate. We also evaluated the animal's response to the social challenge, provided by a mirror test, recorded during 10 minutes. Regarding the growth rate, we observed that situation of mild stress increased fish growth, whereas monotone and intense stress situations had decreased their growth rate. Agonistic interactions increased in situations of mild stress, remained stable in conditions of intense stress and decreased in frequency in monotone situations. Cortisol levels did not differ between treatments, but the opercular beat rate showed an increase in situations of intense stress. We conclude that monotone reduces the motivation to defend the territory and has negative effects on welfare. Intense stressors maintain the motivation to defend the territory and also have negative effects on welfare. Finally, moderate stressors increase motivation to territorial defense and improves the welfare in Nile tilapia.

Keywords: stress, monotone, containment, social isolation, aggressiveness.

1. Introdução

Em ambiente natural os animais são confrontados com inúmeros e constantes desafios a partir de seu ambiente externo e submetidos a diferentes níveis de estresse (Creel *et al.*, 2013). O estresse, nesse contexto, pode ser definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico (homeostase) do organismo está perturbado como resposta a ações de estímulos intrínscio ou extrínscio denominados estressores (Wendelaar Bonga, 1997). Nos vertebrados, as respostas aos estressores são marcadas por uma cascata de alterações fisiológicas internas mediadas, em parte, pelo ramo simpático do sistema neurovegetativo e pelo eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (Creel *et al.*, 2013). Se o estressor é moderado e de curta duração, a ativação do eixo inicia respostas adaptativas para enfrentar desafios no ambiente desencadeando respostas que permitam ao animal fugir da situação ameaçadora ou lutar com o possível oponente (Wingfield, 2003). A resposta ao estressor é, portanto, uma resposta adaptativa que permite que o animal responda imediatamente a uma situação ameaçadora (Hill *et al.*, 2012) como perturbações ambientais, interações sociais agressivas e exposição a patógenos e a predadores (Wingfield, 2003).

Apesar de ser uma resposta a perturbações ambientais, o estresse está envolvido com algumas respostas positivas, principalmente em condições de níveis moderados de estresse (Wendelaar Bonga, 1997), exercendo função importante sobre os desafios, aprendizagem e consolidação da memória (Sapolsky *et al.*, 1986), podendo aumentar a perspectiva de sobrevivência dos animais. No entanto, um indivíduo submetido a situações de estresse crônico pode ter seu comportamento e sua fisiologia afetados negativamente (Wingfield, 2013), pois as respostas a estressores crônicos e que ofereçam risco podem levar os animais a um estado patológico conhecido como distresse (Wendelaar Bonga, 1997).

Estressores estão presentes continuamente em ambiente natural, mas podem ser mais intensos em ambiente artificial, pois, em muitos casos, os animais não conseguem fugir ou se afastar dos estressores. Por isso, manter o bem-estar dos animais em ambientes artificiais para fins de pesquisa e criação tem sido um desafio constante. O bem-estar está relacionado à condição na qual o animal apresenta completa saúde mental e física, harmonia com o ambiente, capacidade de se adaptar sem sofrimento a um ambiente artificial fornecido pelos seres humanos e, além disso, os sentimentos dos animais também devem ser considerados (Duncan, 2005). Sendo assim, os animais

devem ser mantidos em boas condições físicas e psicológicas, na presença de elementos naturais, de forma que permaneçam em elevados níveis de bem-estar (Huntingford *et al.*, 2006). No entanto, o ambiente artificial pode ser desprovido de estímulos, o que pode provocar monotonia, igualmente considerada inadequada aos sistemas de criação e manutenção dos animais, podendo desencadear comportamentos anormais, como já relatado em mamíferos (ex. Hook *et al.*, 2002; Birkett *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013). Os animais que sofrem restrições na expressão de um comportamento natural muitas vezes são levados ao estresse e frustração, que também são prejudiciais ao seu bem-estar (Friend, 1989). Assim, a ideia de que ambientes ricos em estímulos são benéficos aos animais tem sido estudada, particularmente, para animais de zoológico com o intuito de reduzir os efeitos de estressores crônicos e de condições monótonas, evitar o aparecimento de comportamentos anormais e, em consequência, proporcionar maior bem-estar aos animais (ex. Hook *et al.*, 2002; Birkett *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013).

Apesar dos resultados positivos encontrados nos estudos de enriquecimento ambiental, nem sempre essas respostas comportamentais estão associadas à redução dos níveis de cortisol (ex. Sajjad *et al.*, 2011; Zaragoza *et al.*, 2011; Wilks *et al.*, 2012). Isso indica, por um lado, que níveis de cortisol nem sempre são bons indicadores da condição de bem-estar (Ellis *et al.*, 2012). Por outro lado, as respostas positivas podem estar associadas a níveis moderados de estresse (Wendelaar Bonga, 1997) o que pode ser considerado desejável para os animais. Dessa forma, a introdução de estímulos no ambiente pode elevar um pouco os níveis de cortisol em função da novidade no ambiente artificial. Se essa premissa for verdadeira, significa que estresse em níveis moderados não constitui resposta negativa aos animais. Ou seja, estressores que mantenham os níveis de estresse dentro da fase adaptativa trariam efeitos positivos. De fato, von Krog *et al.* (2010) demonstraram que o estresse moderado e baixos níveis de cortisol estimulam a proliferação celular em cérebros de *zebrafish* (*Danio rerio*). Assim, é possível que a manutenção de animais em condições que mais se assemelhem ao ambiente natural, isto é, com a presença de estressores mais leves, seja mais adequada ao bem-estar. Por isso, testamos a hipótese de que estressores moderados (de baixa intensidade) exercem efeitos positivos sobre o bem-estar em peixes.

Estudos recentes utilizam amplamente as respostas comportamentais como indicadores de bem-estar em peixes. Testes de escolha e preferência (Volpato *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2010; Freitas e Volpato, 2013), níveis de agressividade (Kadry e

Barreto, 2010) e capacidade de aprender novas tarefas (Kotrschal e Taborsky, 2010) têm sido utilizados. Neste estudo, iremos utilizar como indicador de bem-estar, a prontidão para enfrentar desafios no ambiente, sendo o desafio social escolhido por ser uma situação que animais sociais enfrentam constantemente (Huntingford *et al.*, 2006). Assim, o objetivo deste estudo foi testar se machos de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem GIFT, submetidos a estressor moderado são mais propensos a enfrentar desafios sociais do que machos submetidos a situações de ambiente monótono ou de estressor intenso. A espécie foi escolhida por ser um ciclídeo e, como todas as espécies dessa família, apresentam organização social por meio de hierarquia de dominância (Baerends e Baerends-Van Roon, 1950). O sistema de acasalamento é poligínico e, portanto, a competição entre os machos é elevada (Lowe-McConnell, 1958). Além dessas características, a tilápia-do-nilo é uma espécie amplamente utilizada como modelo animal e seu comportamento social e respostas a estressores são bem conhecidos (Mendonça *et al.*, 2010; Barreto e Volpato, 2011; Freitas e Volpato, 2013), o que a torna adequada ao estudo aqui proposto. Além disso, a tilápia-do-nilo é uma das mais importantes espécies para a aquicultura mundial, e portanto, informações sobre os mecanismos que afetam o estresse e o bem-estar dessa espécie são fundamentais para o manejo e manutenção.

2. Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Comportamento Animal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto, S.P. Foram utilizados 45 machos adultos de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1759), Teleostei, Cichlidae, variedade GIFT, provenientes do Centro de Aquicultura da UNESP (Jaboticabal, SP) e mantidas na Mini-Estação de Piscicultura do IBILCE/CAUNESP, São José do Rio Preto-SP.

2.1 Aclimação e manutenção

No laboratório, os animais foram mantidos em caixas d'água de polietileno, com capacidade de 500 litros (1 animal / 10L) por no mínimo 15 dias antes do início dos experimentos. A temperatura da água foi mantida em 27°C, o fotoperíodo em 12 horas de luz (07:00h – 19:00h). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração

comercial para peixes tropicais (28% de proteína) até a saciação. A qualidade da água foi mantida por filtros biológicos externos (tipo Canister, fluxo 400 L / h) e aeração constante.

2.2 Delineamento Experimental

Analizamos o efeito de estressor moderado sobre o bem-estar e o desafio social em machos adultos de tilápia-do-nilo. Foram selecionados 24 animais com semelhantes comprimento padrão 14 cm ($\pm 1,5$ cm) (one-way ANOVA, $F_{(2,31)} = 0,32$; $p = 0,72$) e peso médios 92,84 g ($\pm 30,44$ g) (one-way ANOVA, $F_{(2,31)} = 0,71$; $p = 0,49$) previamente isolados e submetidos a três tratamentos (Fig.1)

Tratamento 1 (N = 13) - *Situação de monotonia*; animal isolado em ambiente desprovido de novos estímulos.

Tratamento 2 (N = 12) - *Situação de estressor intenso*; o estressor intenso consistiu na redução de 90% do espaço disponível com o uso de uma placa opaca de cor azul confinando o animal em um dos cantos do aquário, durante 30 minutos como utilizado por Barreto *et al* (2009). Já foi demonstrado que esse tipo de estressor provoca elevação intensa de cortisol indicando altos níveis de estresse na tilápia-do-nilo (Moreira e Volpato, 2004; Barreto *et al*, 2009).

Tratamento 3 (N = 9) - *Situação de estressor moderado*; consistiu na introdução de uma placa no aquário, que foi deslocada por 5 cm provocando uma redução de 10% do espaço, e que representou a introdução de um objeto novo no ambiente. A placa permaneceu por 30 minutos. Nesse caso, a manipulação é semelhante ao tratamento com estressor intenso, porém, a redução do espaço não é significativa e não causou confinamento. Como se trata de manipulação causando uma perturbação leve no ambiente sem grandes consequências, foi considerada uma situação de estressor moderado.

O experimento foi realizado em um período de 10 dias e está resumido na Figura 2. Os animais permaneceram isolados durante os dias 1, 2 e 3 para aclimação às condições experimentais. No dia 4, foi coletado o sangue desses animais por volta das 09:00 h, para medida do cortisol inicial. No período da tarde, entre 14:00 e 15:00 h, um espelho foi introduzido no aquário para simular a presença de um intruso e, dessa forma, acessar a resposta ao desafio social, inferido pela interação agonística com a imagem refletida no espelho. Durante os dias 5, 6, 7, 8 e 9, esses animais foram submetidos aos

diferentes níveis de estressores duas vezes ao dia (09:00h e 14:00h). No último dia, o sangue foi novamente coletado para avaliação do cortisol final e a motivação para enfrentar desafio social foi novamente avaliada (teste do espelho). Além do cortisol, avaliamos a taxa de crescimento específico e de batimento opercular, que são indicadores adicionais dos níveis de estresse dos animais.

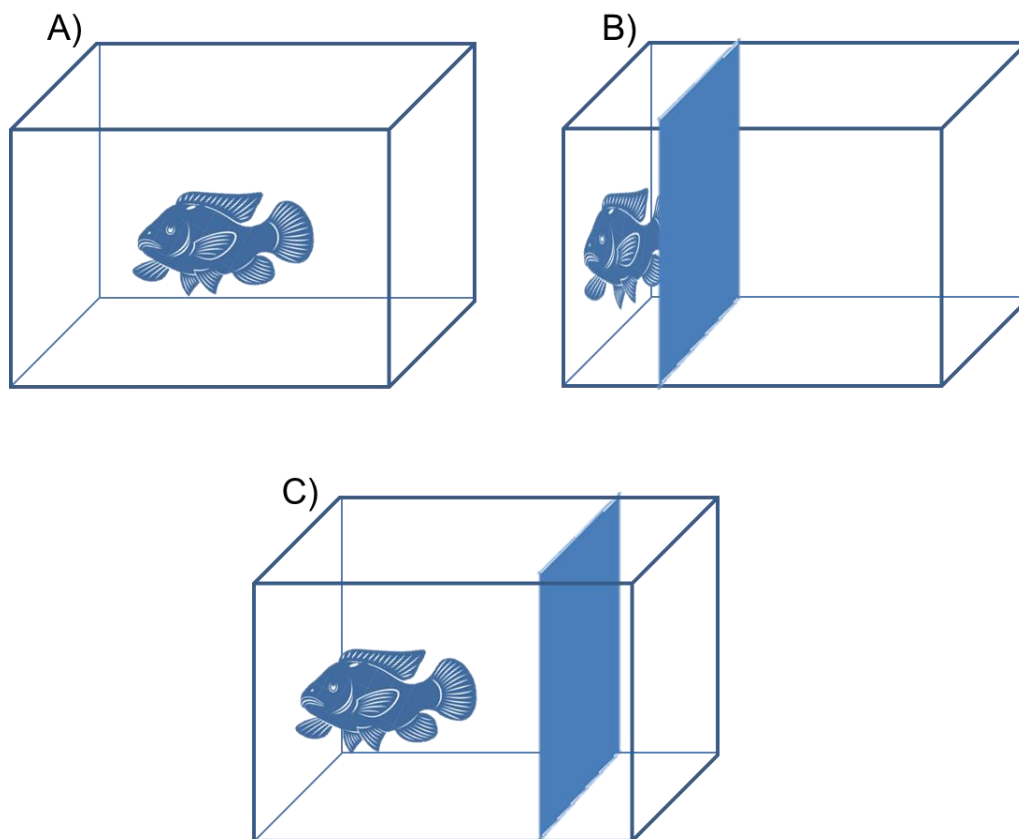


Figura 1. Esquema dos aquários demonstrando os diferentes tratamentos. A) Situação de monotonia. B) Situação de estressor intenso. C) Situação de estressor moderado.

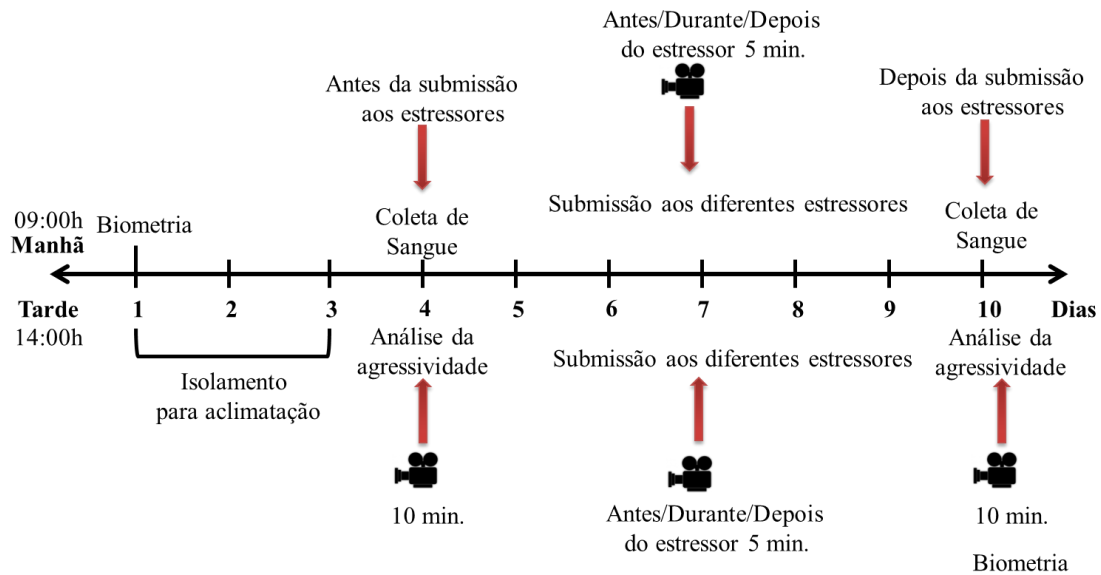


Fig. 2) Esquema demonstrando os procedimentos durante os 10 dias de experimento.

2.3 Condições do experimento

Os animais foram anestesiados com tricaina metanosulfonato (MS222) à concentração de 20 mg.L^{-1} para medida do comprimento padrão e do peso. Em seguida, foram isolados em aquários $40 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$, com temperatura da água mantida em 27°C e com aeração constante por meio de filtros biológicos. Os animais foram alimentados com ração para peixes tropicais correspondente a 3% da biomassa, fornecida duas vezes ao dia (28% PB). As paredes laterais dos aquários permaneceram cobertas por plástico azul para evitar o contato visual entre os animais de aquários vizinhos. A cor azul foi escolhida por reduzir a secreção de cortisol na tilápia-do-nylo (Volpato e Barreto, 2001).

2.4 Indicadores de estresse

O estresse é uma resposta do animal acompanhada por aumento do gasto energético e, portanto, é uma condição na qual a demanda por captação de oxigênio aumenta (Wendallar Bonga, 1997). Assim, por ser sensível ao estresse e por ser uma técnica simples e não invasiva (Barreto e Volpato, 2004) a frequência respiratória foi utilizada para validar a intensidade do estresse nos tratamentos como já usada em estudos anteriores (ex. Barreto e Volpato, 2011; Martins *et al.*, 2012). Os animais

foram filmados por 5 minutos antes, durante e após a submissão ao estressor para registro dos batimentos operculares. A frequência respiratória foi obtida pelo número de batimentos operculares emitidos por cada animal durante 30 segundos (adaptado a partir de Barreto *et al.*, 2009).

Uma vez que o estresse demanda gasto de energia, a longo prazo, o crescimento dos animais pode ser afetado (Ellis *et al.*, 2012). Assim, utilizamos a taxa de crescimento específico (T.C.E.) como um indicador adicional de estresse. $TCE = [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \Delta t] \times 100$, sendo $\Delta t = 10$ dias (Wooton, 1998).

A análise dos níveis de cortisol plasmático também foi empregada para se avaliar o grau de estresse ao qual o animal foi submetido. O cortisol foi avaliado 1 dia antes e 1 dia depois das sessões de submissão aos estressores. O sangue foi coletado 5 horas antes da exposição do animal ao espelho para que o animal já estivesse recuperado da anestesia para o desafio social e 16 horas após a última apresentação aos estressores para evitarmos que a variação dos níveis de cortisol fosse resultado do estresse causado agudamente pelos diferentes estressores, também garantindo um tempo de 5 horas para recuperação da anestesia antes de ser exposto ao desafio social. Os animais foram anestesiados com benzocaína (9 mg.L^{-1}) (Gontijo *et al.*, 2003) e o sangue retirado por punção da veia caudal por meio de seringas heparinizadas. O sangue foi então centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos e o plasma pipetado, separado e congelado (-20°C) para posterior dosagem de cortisol. A dosagem hormonal foi realizada pelo método ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay validado para tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, de acordo com o método descrito por Brown *et al.*, (2004).

2.5 *Desafio social*

Um espelho medindo 30 cm X 30 cm foi introduzido no aquário no dia anterior a submissão aos estressores e no quinto dia após a exposição aos diferentes estressores, a fim de avaliarmos o perfil agonístico dos peixes por meio da interação com a imagem refletida (*mirror test*; Ruzzante, 1992). Os animais foram filmados por 10 minutos para análise das seguintes variáveis: latência para início da interação com o espelho, frequência e duração de ataques e exibições agressivas (*displays*), de acordo com o etograma descrito na tabela 1. Para que todos os animais partissem da mesma distância

do espelho, foi introduzida no aquário uma placa de vidro transparente que permaneceu por 5 minutos mantendo o animal do lado oposto ao do espelho. A placa, utilizada como “start” foi colocada de maneira a restringir o espaço do aquário em 15 cm, contudo não suficiente para confinar o animal.

A comunicação social na tilápia-do-nilo, como em outros animais, depende de estímulos visuais (Castro *et al.*, 2009), químicos (Giaquinto e Volpato, 1997, Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008) e sonoros (Longrie *et al.*, 2013). No entanto, mesmo na ausência de estímulos químicos e sonoros, os peixes não reconhecem sua imagem no espelho e interagem com a imagem como se fosse outro indivíduo (ex. Ruzzante, 1992; Dejardin e Fernald, 2010; Reddon *et al.*, 2012). Por isso, o método do espelho tem sido amplamente utilizado em estudos com interações agressivas em peixes (ex. Oliveira *et al.*, 2005; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2006; Ros *et al.*, 2006; Archard *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011; Reddon *et al.*, 2012) e já foi observado ao menos para uma espécie que não há diferença na motivação agressiva quando um ciclídeo macho encontra um coespecífico ou sua própria imagem no espelho (Reddon *et al.*, 2012), mostrando ser eficiente também para tilápia-do-nilo (Barreto *et al.*, 2009). Quando um peixe luta com outro, o comportamento de um indivíduo depende do que o outro faz (Reddon *et al.*, 2012). Assim, a vantagem do uso do espelho é o controle do “oponente virtual” e, dessa forma, os resultados são atribuídos apenas ao comportamento do indivíduo focal. Fatores que podem intensificar a agressividade dos animais, tais como intensidade luminosa (Carvalho *et al.*, 2013) e temperatura (Pang *et al.*, 2011) foram controladas durante o experimento para que o comportamento do animal não fosse alterado devido a esses elementos.

Tabela 1. Etograma da interação agonística da tilápia-do-nilo no espelho (adaptado a partir de Barreto *et al.*, 2009).

Unidade de Comportamento	Descrição
Exibição frontal	O peixe posiciona-se frontalmente ao espelho com o opérculo aberto e as nadadeiras eriçadas. O animal não encosta no espelho, mas pode ficar a poucos milímetros dele.
Exibição lateral	O peixe apresenta o mesmo padrão de comportamento da exibição frontal,

	contudo, posicionando-se paralelamente ao espelho exibindo toda a lateral de seu corpo.
<i>Butting</i>	O peixe aproxima-se do espelho, toca e/ou o empurra rapidamente com a boca.
<i>Tail beating</i>	O peixe ondula intensamente o corpo, antero-posteriormente, batendo a cauda contra o espelho.

Para quantificação das interações agressivas, agrupamos as exibições frontal e lateral como de baixa intensidade por serem interações sem contato físico e envolver menor gasto energético (Ros *et al.*, 2006) denominadas *displays*. Os comportamentos *butting* e *tail beating*, por demandarem um maior gasto energético podendo ou não envolver contato físico direto (Ros *et al.*, 2006) foram considerados de alta intensidade e, somados, compõem os ataques.

2.6 Réplicas

Embora tenham sido tomados os cuidados necessários para manutenção dos animais durante o experimento, ainda assim, ocorreram alguns imprevistos como morte de 3 animais do tratamento sob estressor moderado. Além disso, réplicas que não exibiram comportamento agonístico perante o espelho (2 do tratamento sob condição de monotonia; 3 do tratamento sob estressor intenso; 3 sob estressor moderado) não foram consideradas. Assim, para a T.C.E. e para o desafio social temos 13, 12 e 9 réplicas para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Enquanto que para os indicadores de estresse (níveis de cortisol) temos 9 réplicas para os tratamentos 1 e 2 e, 6 réplicas para o tratamento 3.

3. Análise de dados

Inicialmente foram identificados os “outliers” (valores fora do intervalo de confiança - média \pm 2 desvio padrão), os quais foram substituídos pela média do grupo, de acordo com as recomendações de Cosineau e Chartier (2010). Os dados foram

analisados quanto à normalidade pelos valores de “Skewness” (assimetria) e “Kurtosis” (curtose) e quanto à homocedasticidade pelo teste F_{max} (Ha e Ha, 2007). Exceto a taxa de crescimento específico, os demais dados apresentaram-se heterocedásticos, assim, foram transformados (raiz quadrada) para ajustar-se às análises paramétricas (Volpato e Barreto, 2011). Para avaliarmos os níveis de cortisol, a frequência de batimento opercular e o comportamento agonístico, entre e dentro de cada tratamento, antes e após serem apresentados aos diferentes estressores, utilizamos ANOVA para medidas repetidas (Volpato e Barreto, 2011). A taxa de crescimento foi avaliada entre os tratamentos por one-way ANOVA (Volpato e Barreto, 2011). Utilizamos o teste de Fisher-LSD para comparações múltiplas. Foram feitas análises de correlação de Spearman entre os níveis de cortisol plasmático e os itens comportamentais analisados durante o desafio social. Para análises dos testes de correlação utilizamos os dados sem transformação. Para diferença estatística consideramos $p \leq 0,05$.

4. Conduta Ética

Esta pesquisa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Brasil (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil (protocolo nº 085/2013).

5. Resultados

O teste one-way ANOVA mostrou que não houve diferença significativa nos níveis de cortisol ($F_{(2,25)} = 0,39$; $p = 0,67$) e nos itens comportamentais perante o desafio social como latência para o ataque ($F_{(2,25)} = 0,25$; $p = 0,77$), frequência dos displays ($F_{(2,25)} = 1$; $p = 0,57$), frequência dos ataques ($F_{(2,25)} = 1,05$; $p = 0,36$), duração dos displays ($F_{(2,25)} = 2,79$; $p = 0,07$) e duração dos ataques ($F_{(2,25)} = 1,56$; $p = 0,22$) avaliados entre os tratamentos antes dos animais serem submetidos aos diferentes estressores.

5.1 Indicadores de estresse

5.1.1 Níveis de cortisol plasmático

Os níveis de cortisol plasmático mantiveram-se constantes e foram semelhantes entre os tratamentos (ANOVA para medidas repetidas $F_{(2,25)} = 0,39$; $p = 0,67$; Fig. 2).

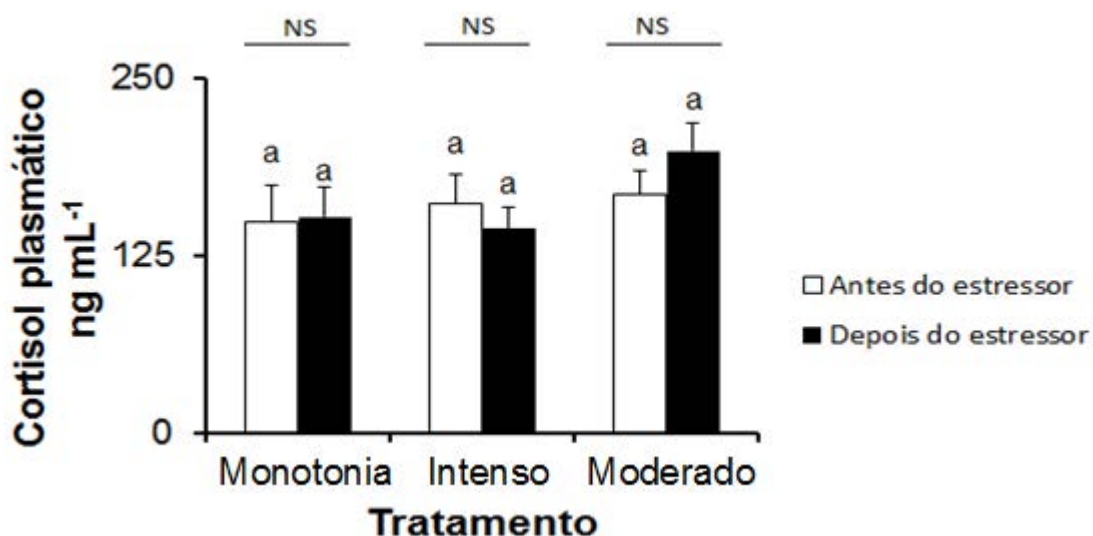


Fig. 2. Média (\pm SE) do nível de cortisol plasmático (ng mL^{-1}) nos diferentes tratamentos antes e depois do estressor. Linhas comparam médias dentro dos tratamentos e letras comparam médias entre os tratamentos.

5.1.2 Frequência de batimento opercular

Foi encontrada diferença significativa na frequência de batimento opercular entre os tratamentos (ANOVA para medidas repetidas $F_{(4,62)} = 20,66$; $p < 0,00001$; Fig. 3). Os animais dos tratamentos sob monotonia e estressor moderado apresentaram frequências iguais de batimento opercular e menores quando comparadas ao estressor intenso ($p < 0,00001$). Além disso, houve um aumento dessa frequência durante o estressor intenso, quando comparada a antes e depois ($p = 0,02$) o que não ocorreu com os demais tratamentos que apresentaram frequência de batimento opercular constantes antes, durante e depois da submissão ao estressor ($p \geq 0,38$).

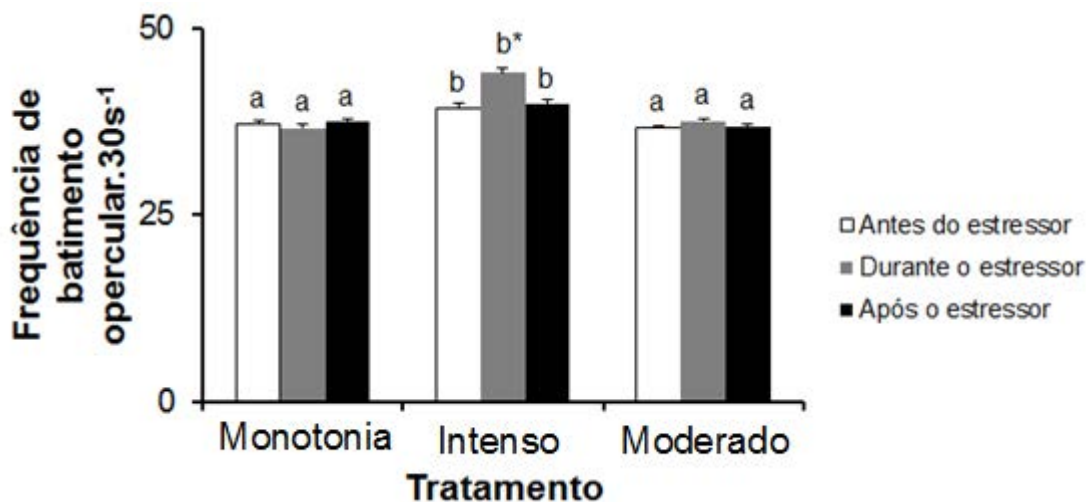


Fig. 3. Média (\pm SE) da frequência de batimento opercular emitida por cada animal durante os cinco dias de tratamento (média dos cinco dias). Letras comparam médias entre os tratamentos antes, durante e após o estressor. Barras seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos. * Indica diferença significativa dentro de cada tratamento.

5.1.3 Taxa de crescimento específico (T.C.E)

Houve efeito dos tratamentos sobre a taxa de crescimento específico do animal ($F_{(2,31)} = 5,08$; $p = 0,01$; Fig.4). Animais mantidos sob monotonia ou estressor intenso, perderam peso enquanto que os animais mantidos sob estressor moderado ganharam peso ($p \leq 0,04$) durante os 10 dias de experimento.

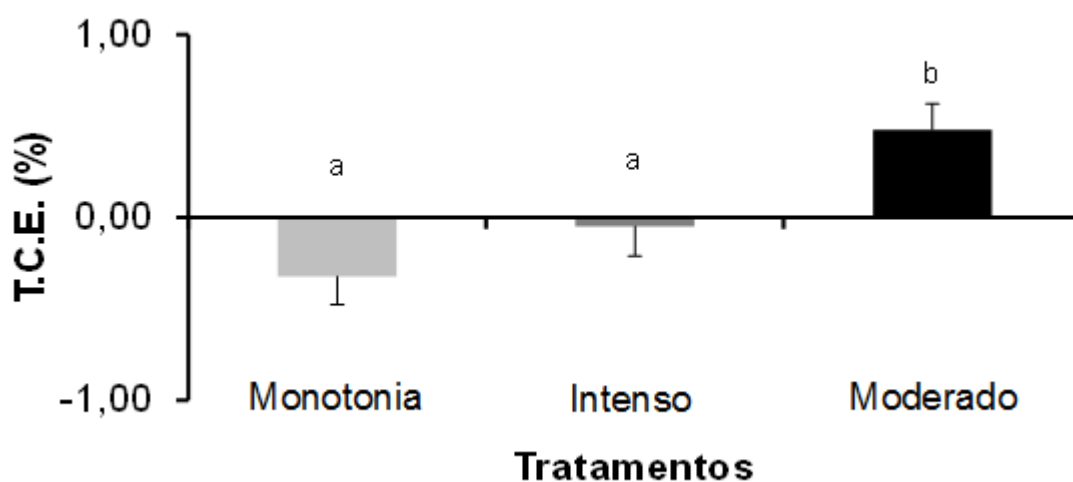


Fig. 4. Média (\pm SE) da taxa de crescimento específica durante os 10 dias experimentais. Barras seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa.

5.2 Desafio social

5.2.1 Latência para o ataque

Houve efeito do tratamento sobre a latência para o primeiro ataque contra a imagem refletida no espelho ($F = 3,31$; $p = 0,04$; Fig. 5). Quando comparadas as médias dentro de cada tratamento, animais submetidos aos estressores intenso e moderado apresentaram uma diminuição da latência para o ataque ($p \leq 0,01$), o que não ocorreu com o animal submetido a monotonia, que a manteve constante ($p = 0,76$). Ainda, ao compararmos as médias entre os tratamentos, animais submetidos aos estressores intenso e moderado apresentaram latência iguais entre si e ($p = 0,73$), menores do que quando comparados aos animais sob monotonia ($p \leq 0,03$).

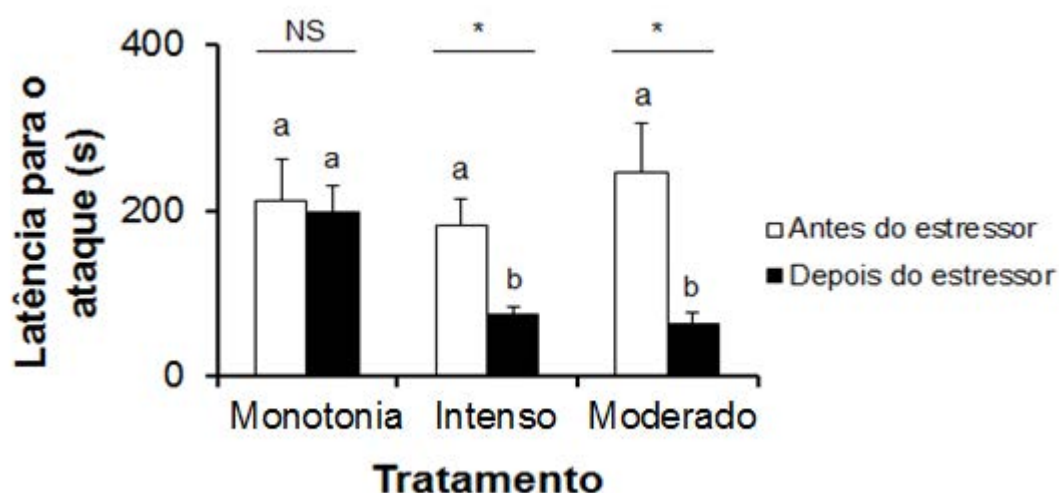


Fig. 5. Média (\pm SE) da latência para o ataque durante 10 minutos. Linhas comparam médias dentro do tratamento e letras comparam médias entre os tratamentos antes e depois do estressor. Barras seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa. NS = não significativo.

5.2.2 Frequência e duração de displays e de ataques

Houve diferença significativa na frequência de *displays*, dentro de cada tratamento ($F_{(2,31)} = 4$; $p = 0,02$; Fig.6A). Animais submetidos a monotonia mantiveram sua frequência ($p = 0,41$) enquanto animais submetidos aos estressores intenso e moderado apresentaram aumento ($p \leq 0,017$). Quando a comparamos entre os tratamentos, animais submetidos aos estressores intenso e moderado apresentaram médias iguais ($p = 0,15$) e maiores do que a dos animais submetidos a monotonia ($p \leq 0,04$). Também houve efeito do tratamento sobre a duração dos *displays* ($F_{(2,31)} = 4,04$; $p = 0,02$; Fig.6B). Quando comparamos a duração dos *displays*, dentro de cada

tratamento, houve um aumento no tempo de exibição por parte do animal submetido ao estressor intenso ($p = 0,0002$), enquanto animais submetidos a monotonia e ao estressor moderado o mantém constante ($p \geq 0,31$). Ainda, se a compararmos, entre os tratamentos, animais mantidos sob situações de monotonia apresentam um tempo de exibição menor do que o animal sob situações de estressor intenso ($p = 0,01$) enquanto o animal sob situação de estressor moderado não difere dos demais tratamentos ($p \geq 0,06$). A frequência de ataques emitida pelo animal também sofreu efeito dos tratamentos ($F_{(2,31)} = 6,51$; $p = 0,004$; Fig.6C). Quando comparamos, dentro de cada tratamento, animais submetidos a monotonia diminui sua frequência de ataques ($p = 0,01$), animais submetidos a estressores moderados a aumenta ($p = 0,01$) enquanto animais submetidos a estressor intenso a mantém constante ($p = 0,38$). Quando comparada, entre os tratamentos, a frequência de ataques do animal em monotonia é menor do que a do animal sob estressor moderado ($p = 0,04$), enquanto que a frequência dos ataques do animal sob estressor intenso não difere das dos demais tratamentos ($p \geq 0,12$). Não houve efeito do tratamento sobre a duração dos ataques quando comparados dentro e entre os tratamentos ($F_{(2,31)} = 4$; $p = 0,06$; Fig.6D).

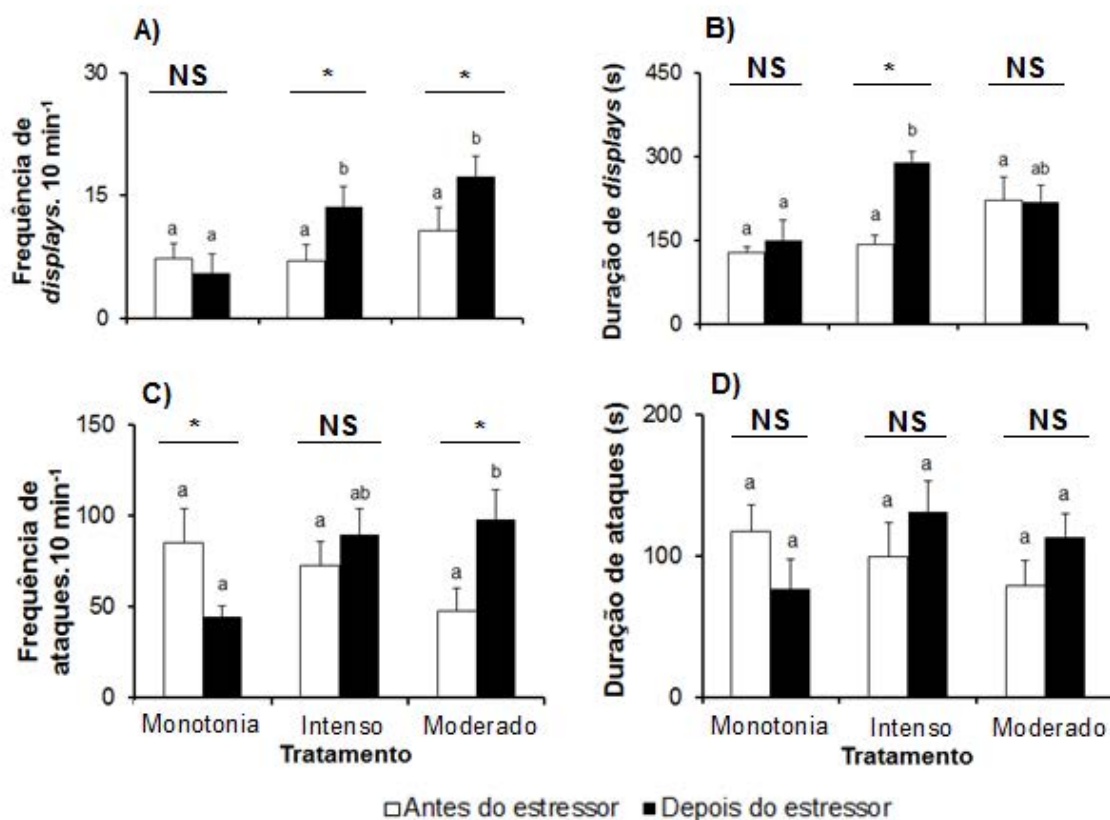


Fig. 6. A) Média (\pm SE) da frequência de *displays*. B) Média (\pm SE) da duração dos *displays* durante 10 minutos. C) Média (\pm SE) da frequência dos ataques. D) Média (\pm SE) da duração dos ataques durante 10 minutos. Linhas comparam médias dentro e letras comparam médias entre os tratamentos antes e depois dos cinco dias de submissão ao estressor. Barras seguidas de letras diferentes e/ou * indicam diferença significativa. NS = não significativa. Atentar para diferença na escala.

5.2.3 Testes de Correlação

Não foi observada correlação entre os níveis de cortisol plasmático e os itens comportamentais analisados durante o desafio social (Tabela 1).

Tabela 1. Teste de Correlação de Spearman entre nível de cortisol plasmático e a frequência dos itens comportamentais analisados durante o desafio social.

		Monotonia	Intenso	Moderado
Cortisol (inicial)	Ataques _(i)	R = -0,009 p = 0,97	R < 0,000005 p = 1	R = 0,65 p = 0,15
	<i>Displays</i> _(i)	R = 0,39 p = 0,22	R = 0,34 p = 0,30	R = 0,61 p = 0,19
Cortisol (final)	Ataques _(f)	R = -0,18 p = 0,59	R = -0,44 p = 0,16	R = -0,20 p = 0,70
	<i>Displays</i> _(f)	R = 0,20 p = 0,55	R = -0,35 p = 0,28	R = -0,05 p = 0,91

6. Discussão

Em nosso estudo observamos que diferentes situações estressantes afetam de maneira distinta as respostas comportamentais dos animais. Ao que tudo indica, ambientes imprevisíveis e que os exponham a algum tipo de perturbação provocam respostas adaptativas melhorando seu bem-estar e os preparando ao desafio social, enquanto situações de ambiente monótono somam efeitos negativos ao bem-estar e ao seu comportamento.

De acordo com nossa hipótese, animais mantidos sob estressor moderado, por ser uma situação que mais se assemelhe ao ambiente natural, apresentariam melhores condições de bem-estar e de prontidão ao desafio social. Em contrapartida, animais mantidos em monotonia ou estressor intenso que, por serem condições não naturais, submeteriam o animal a um maior nível de estresse, o que poderia acarretar danos ao seu bem-estar e ao desafio social.

Primeiramente fez-se necessário demonstrar que todos os animais partiram dos mesmos níveis de estresse e, das mesmas condições de bem-estar e de prontidão para o desafio social. O fato de os animais não apresentarem diferenças fisiológicas ou nos itens comportamentais avaliados entre os tratamentos antes de serem submetidos aos diferentes estressores nos garante que todos os grupos partiram das mesmas condições. Assim, as diferenças apresentadas após serem apresentados aos estressores foram resultantes dos tratamentos aos quais os animais foram submetidos e não de diferenças individuais prévias.

Em nosso estudo, o cortisol plasmático foi utilizado para validar o nível do estressor. Níveis elevados de cortisol plasmático são costumeiramente associados a condições de menor bem-estar para os animais (Merlini, *et al.*, 2014). Assim, esperávamos que animais mantidos sob maiores níveis de estressores apresentassem níveis de cortisol mais elevados quando comparado aos demais tratamentos. No entanto, os resultados do nosso estudo corroboram a ideia emergente de que níveis elevados de cortisol nem sempre estão ligados a diminuição do bem-estar (Ellis *et al.*, 2012), pois não houve diferença entre os tratamentos e os níveis de cortisol apresentaram-se elevados também no tratamento em que supostamente o animal estaria sendo mantido em condições desejáveis. Contudo, é importante salientar que as amostras foram retiradas cerca de 16 horas após o último dia de submissão ao estressor, e se levarmos em consideração que os níveis de cortisol plasmático atingem seu pico em 1 hora e voltam aos níveis normais cerca de 35 minutos após a apresentação do estressor (Barreto e Volpato, 2004), neste caso, o estressor pode ter agido como um estressor agudo apresentando diferença em seus níveis somente no momento da submissão ao estressor, assim, a igualdade entre os tratamentos pode ter ocorrido pelo fato de os níveis já terem retornados a níveis normais no momento da coleta das amostras sanguíneas (Barreto e Volpato, 2004). Como já observado em estudos anteriores do nosso laboratório, animais isolados apresentam níveis de cortisol elevados (Montedor *et al.*, 2014), quando comparados a níveis basais de aproximados 50 ng mL^{-1} encontrados para a espécie (Boscolo *et al.*, 2011). Assim, também é possível que os níveis de cortisol elevados encontrados em nosso estudo de aproximados $198,48 \text{ ng mL}^{-1}$ possa ser devido ao isolamento. Entretanto, todos os animais foram mantidos nas mesmas condições de isolamento, portanto as diferenças comportamentais são devidas aos tratamentos aos quais foram submetidos e não ao fato de terem sido mantidos isolados.

Os níveis de cortisol indicam que os animais estavam sendo submetidos ao mesmo nível de estresse entre os tratamentos. O que acaba sendo uma vantagem, pois, nos garante que não foi o cortisol responsável pela agressividade e sim fatores do ambiente ao qual o animal foi mantido. Ao analisarmos outros indicadores, ficam claras as diferenças fisiológicas e comportamentais que cada ambiente desencadeia nos animais.

Quantificamos também a taxa de batimento opercular dos animais durante os cinco dias de submissão aos estressores. Por ser uma resposta fisiológica a condição de estresse, o aumento do gasto energético resulta em um aumento da taxa de batimento opercular (Barreto e Volpato, 2011). Assim, esperávamos encontrar uma maior frequência ventilatória nos tratamentos nos quais o animal estivesse sendo mantido em um maior nível de estresse e, conseqüentemente, com seu bem-estar comprometido. De fato, pudemos perceber que animais mantidos em condições de estressor intenso aumentam seu gasto energético no momento da submissão ao estressor, como já relatado em outros estudos (Barreto e Volpato, 2011; Maia e Volpato, 2013).

Fatores externos também podem elevar o nível de estresse do animal levando a um aumento do gasto energético ocasionando, por exemplo, perda de peso e diminuição de seu crescimento (Laursen *et al.*, 2013; Villamizar *et al.*, 2014) o que seria prejudicial ao seu bem-estar. Levando em consideração que animais mantidos sob condições de estresse demandam maior gasto de energia, a longo prazo, seu crescimento pode ser afetado (Wooton, 1998). Ainda, o reestabelecimento da homeostase do indivíduo após o estressor também demanda um maior gasto de energia (Wendelaar Bonga, 1997). Uma vez que a taxa de batimento opercular foi igual nos tratamentos sob monotonia e estressor moderado, indicando que os animais estariam sendo mantidos em um mesmo nível de estresse nesses tratamentos, esperávamos que a T.C.E. nesses grupos fosse semelhante e no tratamento sob estressor intenso, no qual houve um aumento da frequência ventilatória, indicando um maior nível de estresse, o animal apresentasse, então, perda de peso. Realmente pudemos perceber que o estresse também é um fator que atinge o crescimento do animal, no entanto, neste caso, nossa predição não foi corroborada, pois, animais mantidos sob monotonia e estressor intenso perderam peso quando comparados aos animais mantidos sob estressor moderado que por sua vez aumentaram seu crescimento. Também é possível que devido ao estresse o animal tenha diminuído sua ingestão alimentar ocasionando a perda de peso (Ellis *et al.*, 2012). No entanto, neste estudo, embora tenha sido controlada a quantidade de alimento oferecida

durante o experimento, não foi quantificada a taxa de ingestão alimentar do animal, de tal modo, a perda de peso pela possível diminuição de ingestão por parte dos animais mantidos sob maiores níveis de estresse seria apenas uma especulação. Os resultados do nosso estudo demonstram que a monotonia e o estressor intenso embora mantenham os animais em diferentes níveis de estresse são igualmente prejudiciais ao crescimento, ao passo que estressor moderado que mantém o animal nas mesmas condições fisiológicas que a monotonia exerce efeito positivo sobre o crescimento do animal.

Não houve uma correlação entre os níveis de cortisol e o comportamento agressivo perante o desafio social, assim, a motivação do animal ao desafio social não se dá pelos níveis elevados de cortisol e sim pelo efeito do tratamento ao qual estão sendo submetidos. Embora animais mantidos sob condições monótonas ou estressores moderados não apresentem diferenças fisiológicas tanto na frequência de batimento opercular quanto nos níveis de cortisol, podemos considerá-los estressores diferentes, uma vez que, as respostas ao estressor são vistas no comportamento frente ao desafio social entre esses dois tratamentos.

A análise dos confrontos agonísticos mostrou que os diferentes estressores influenciam a prontidão ao desafio social por parte do animal. De acordo com nosso estudo, situações de monotonia exercem maiores efeitos negativos ao desafio social do que situações de estressores intenso e moderado, pois, diminuem a motivação ao desafio social e à defesa do território, enquanto que estressores intensos a mantém e, estressores moderados a aumenta.

Condições de monotonia e de estressores intensos (contenção) não são naturais para o animal. Assim, animais que sofrem restrições na expressão de um comportamento natural muitas vezes são levados ao estresse e frustração, que também são prejudiciais ao seu bem-estar (Friend, 1989). Animais cativos são submetidos a monotonia e muitas vezes impedidos de exercer comportamento natural da espécie, e começam a apresentar sinais de estresse. Temos assim, exemplos de fatores que podem acarretar danos ao bem-estar do animal (Lundmark *et al.*, 2014). Além disso, ambientes monótonos podem acarretar danos também nas relações sociais entre os coespecíficos. O estabelecimento da hierarquia de dominância, durante as relações sociais em ciclídeos, faz-se por meio de lutas entre coespecíficos (Baerends e Baerends-Van Roon, 1950; Barlow, 2000) garantindo ao vencedor acesso prioritário a recursos do ambiente como fêmea para reprodução, alimento e abrigo. Desta maneira, para que obtenha

sucesso o animal deve estar preparado e motivado para o desafio social. Em peixes, o animal residente defende seu território com maior motivação (Chellapa *et al.*, 1999). Em nosso estudo demonstramos que ambientes monótonos, além de ser prejudicial ao crescimento do animal, exerce efeito negativo também sobre as interações sociais, mais precisamente, diminuindo a motivação do animal a defender seu território.

Estudos trazem o estresse crônico como o responsável pela diminuição do bem-estar do animal (ex. Gamaro *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014), pois animais submetidos a estressores crônicos exibem alterações neuronais e deficiência em processos cognitivos (Magarinos *et al.*, 1997), atraso na maturação ovariana (Gennotte *et al.*, 2012), redução da ingestão de alimentos e da eficiência de conversão alimentar, além de redução do crescimento (Ellis *et al.*, 2012). Além disso, o estresse crônico pode ter efeitos indiretos na sobrevivência, pois, mães *zebrafish* submetidas ao distresse dão a luz a prole com desempenho cardíaco diminuído, podendo reduzir a sobrevivência dos descendentes (Nesan e Vijayan, 2012) o que comprometeria a manutenção da espécie. Em nosso estudo demonstramos que animais submetidos a condições de estressor intenso, tem sua prontidão ao desafio social comprometida, pois, aumenta suas interações de baixa intensidade quando exposto ao coespecífico. Situação semelhante ocorre com animais em submetidos a monotonia que também diminuem sua disposição ao desafio social. Confrontos de alta intensidade demandam gasto elevado de energia (Ros *et al.*, 2006). Sendo assim, a diminuição da disposição do indivíduo sob ambiente monótono ao desafio social e o aumento dos confrontos considerados de baixa intensidade por parte dos animais submetidos ao estressor intenso, pode ser uma tentativa de se evitar o gasto desnecessário de energia uma vez que estão sendo mantidos em situações estressantes que, por si só, requerem gasto de energia (Johnsson *et al.*, 2006). Em contra partida, animais mantidos sob níveis moderados de estressores, como em condições de ambiente enriquecido, por exemplo, podem ter um significativo aumento de seu bem-estar. Estudos demonstram que o ambiente enriquecido melhora efeitos cognitivos após traumatismo crânio-encefálico (Schreiber *et al.*, 2014) e atua na plasticidade neuronal (Hosseiny *et al.*, 2014) em ratos, melhora o bem-estar em cordeiros quando exposto a um ambiente novo, além de melhorar qualidade da carne aumentando o seu desempenho produtivo (Aguayo-Ulloa *et al.*, 2014). Animais mantidos em condições de perturbações no ambiente podem apresentar uma melhora em seu desempenho, como exemplo, melhora em funções cognitivas como a aprendizagem (Kotrschal e Taborsky, 2010). Por

evocar repetidos estímulos neurais resultando em mais rápida e melhor aprendizagem (Braithwaite e Salvanes, 2005), a exposição a estímulos no ambiente gera peixes com reforçados traços comportamentais que provavelmente estão associados a uma melhor sobrevivência (Braithwaite e Salvanes, 2005). Ao que tudo indica, os peixes precisam experimentar um ambiente variável e mutável para aprender e desenvolver um comportamento flexível (Kotrschal e Taborsky, 2010). Em nosso estudo, animais mantidos sob estressores moderados apresentaram melhora no crescimento, além de aumentar sua disposição ao desafio social diminuindo a latência para o ataque e aumentando suas interações agonísticas em relação a imagem refletida no espelho. De tal modo, é possível que os mecanismos que garantam a capacidade de lidar com as mudanças no ambiente também atuem preparando o animal aos desafios no ambiente social.

O estresse é uma característica adaptativa e o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em vertebrados foi selecionado para situações desafiadoras no ambiente (Schreck, 2010). Assim, se por um lado, ambientes monótonos trazem malefícios ao comportamento natural do animal (ex. Dallaire *et al.*, 2012), assim como ambientes de estresse crônico (ex. Gamaro *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014) por outro lado, situações que submetam os animais a níveis adaptativos de estresse e que atenuem os efeitos da monotonia, como por exemplo, condições de enriquecimento ambiental, diminuem os comportamentos estereotipados (Meagher e Mason, 2012), melhoram a capacidade cognitiva (Salvanes *et al.*, 2013) e de aprendizagem (Strand *et al.*, 2010) e, de acordo com nosso estudo, melhora o bem-estar e prepara o animal para o desafio social.

Conclusão

A monotonia diminui a motivação para a defesa do território e exerce efeitos negativos sobre o bem-estar. Estressores intensos mantêm a motivação ao desafio social e também exercem efeitos negativos em relação ao bem-estar. E, por fim, estressores moderados contribuem para a motivação ao desafio social e para o bem-estar na tilápia-do-nilo. Sendo assim, manter o animal em ambientes o qual submetam o animal a níveis moderados de estressores e em condições que mais se assemelhem a condições naturais, como em ambientes enriquecidos, melhora seu bem-estar e prepara o animal ao desafio social.

7. Referências

AGUAYO-ULLOA, L. A. et al. *Effect of enriched housing on welfare, production performance and meat quality in finishing lambs: The use of feeder ramps*. Elsevier: Meat Science, v. 97, p. 42-48, 2014.

ARCHARD, G. A.; BRAITHWAITE, V. A. *Variation in aggressive behaviour in the poeciliid fish *Brachyrhaphis episcopi*: Population and sex differences*. Behavioural Processes, v.86, p.52-57, 2011.

BAERENDS, G. P.; BAERENDS-VAN RON, J. M. N. *An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes*. E. J. Brill, Leiden, Netherlands, 1950.

BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L. *Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish*. Behavioural Processes. v. 66, p. 43-51, 2004.

BARRETO, R. E. et al. *Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. v. 42, p.109–118, 2009.

BARRETO, R. E.; VOLPATO, Gilson L. *Ventilation rates indicate stress-coping styles in Nile tilapia*. Journal of biosciences. v.36 p.851-855, 2011.

BIRKETT, L.P.; NEWTON-FISHER, N.E. *How Abnormal Is the Behaviour of Captive, Zoo-Living Chimpanzees?* PLoS ONE, v.6, 2011.

BOSCOLO, C.N.P.; MORAIS, R.N.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. *Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain*. ELSEVIER: Applied Animal Behaviour Science. v.135, p.154-159, 2011.

BRAITHWAITE, V. A.; SALVANES, A. G. V. *Aquaculture and restocking: implications for conservation and welfare*. Animal welfare. v. 19, p.139-149, 2010.

BROWN, J., WALKER, S.E., STEINMAIN, K. *Endocrine manual for the reproductive 337 assessment of domestic and non-domestic species*. Virginia: EUA, 2004.

CARVALHO, T. B. et al. *The effect of increased light intensity on the aggressive behavior of the Nile tilapia, Oreochromis niloticus (Teleostei: Cichlidae)*. Curitiba: Zoologia, v. 30, n.2, p. 125-129, 2013.

CASTRO, A. L. S. et al. *Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.)*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v.42, p.368-374, 2009.

CHELLAPA, S. et al. *Prior residence, body size and the dynamics of territorial disputes between male freshwater angelfish*. Journal of Fish Biology, v.55, p.1163–1170, 1999.

CREEL, S. et al. *The ecology of stress: effects of the social environment*. Functional Ecology, v.27, p.66–80, 2013.

COUSINEAU, D.; CHARTIER, S. *Outliers detection and treatment: a review*. International Journal Psychology Research, v.3, p.58–67. 2010.

DALLAIRE, J. A.; MEAGHER, R. K.; MASON, G. J. *Individual differences in stereotypic behaviour predict individual differences in the nature and degree of enrichment use in caged American mink*. Applied Animal Behaviour Science, v.142, p.98–108, 2012.

DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. *What do fish make of mirror images?* Biology Letters, v. 6, p.744-747, 2010.

DUNCAN, I. J. H. *Science-based assessment of animal welfare: farm animals*. Revue scientifique et technique-office international des epizooties, v. 24, p.483-492, 2005.

ELLIS, T. et al. *Cortisol and finfish welfare*. Fish Physiology Biochemistry, v.38, p.163–188, 2012.

FREITAS, R. H. A.; VOLPATO, G.L. *Motivation and time of day affect decision-making for substratum granulometry in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus**. Journal of Applied Ichthyology, v. 29, p.239-241, 2013.

FRIEND, T. H. *Recognizing behavioural needs*. Applied Animal Behaviour Science, v.22 p. 151–158, 1989.

GAMARO, D. G. et al. *Gender-dependent effect on nociceptive response induced by chronic variable stress*. Physiology & Behavior, v. 135, p. 44–48, 2014.

GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; MARIGUELA, T. C. *Social isolation and aggressiveness in the Amazonian juvenile fish *Astronotus ocellatus**. Brazilian Journal of Biology, v.66, p.233-238, 2006.

GONÇALVES-DE-FREITAS, E. et al. *Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia*. Applied Animal Behaviour Science, v.112, p.187–195, 2008.

GONTIJO, A.M. et al. *Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results*. Mutation Research, v.534, p.165-172, 2003.

GENNOTTE, V. et al. *Cortisol is responsible for positive and negative effects in the ovarian maturation induced by the exposure to acute stressors in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus**. Fish Physiology Biochemistry, v.38, p.1619–1626, 2012.

GIAQUINTO, P. C.; VOLPATO, G. L. *Chemical communication, aggression and conspecific recognition in the fish Nile Tilapia*. Physiology and Behavior, v.62: p.1333–1338, 1997.

HA, R. R.; HA, J. C. *Integrative Statistics for Behavioral Science*. Pearson Custom Publishing, p.325, 2007.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. *Fisiologia Animal*. Porto Alegre: Artmed, p. 406, 2012.

HOOK, M.A. et al. *Inter-group variation in abnormal behavior in chimpanzees (Pan troglodytes) and rhesus macaques (Macaca mulatta)*. *Applied Animal Behaviour Science*, v.76, p.165–176, 2002.

HOSSEINY, S. et al. *Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development*. *Brain Structure and Function*. 10.1007/s00429-014-0865-y, 2014.

HUNTINGFORD, F.A. et al. *Current issues in fish welfare*. *Journal of Fish Biology*, v.68, p.332-372, 2006.

JOHANSSON, J.I.; WINBERG, S.; SLOMAN, K.A. Social interactions. in: Sloman, K.A., WILSON, R.W., BALSHINE, S. (Eds.), *Behaviour and Physiology of Fish (Fish Physiology)*, Elsevier, San Diego. p. 151–196, 2006.

KADRY, V. O.; BARRETO, R. E. *Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid, Geophagus brasiliensis, during resident-intruder interactions*. *Neotropical ichthyology*, v.8, p. 329-332, 2010.

KOTRSCHAL, A.; TABORSKY, B. *Environmental Change Enhances Cognitive Abilities in Fish*. *Ploss Biology* 8, 2010.

LAURSEN, D. C. et al. *High oxygen consumption rates and scale loss indicate elevated aggressive behaviour at low rearing density, while elevated brain serotonergic activity suggests chronic stress at high rearing densities in farmed rainbow trout*. *Physiology & Behavior*, v.122, p. 147–154, 2013.

LONGRIE, N. et al. *Behaviours Associated with acoustic communication in Nile Tilapia*. *Plos One* 8; e. 61467, 2013.

LOWE-MCCONNELL, R.H. *Observations on the biology of Tilapia nilotica Linné in East African waters*. Revue de Zoologie et de Botanique Africaine, v.67, p.129–170, 1958.

LUNDMARK, F. et al. *Intentions and Values in Animal Welfare Legislation and Standards*. Journal of Agricultural and Environmental Ethics 10.1007/s10806-014-9512-0

LUO, X. M. et al. *Juvenile stress affects anxiety-like behavior and limbic monoamines in adult rats*. Physiology & Behavior, v.135 p. 7–16, 2014.

MAGARINOS, A.M.; GARCIA, J.M.; MCEWEN, B.S. *Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus*. U.S.A.: Proceedings of the National Academy of Sciences, p.14002–14008, 1997.

MAIA, C. M.; VOLPATO, G. L. *Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia*. Elsevier: Zoology, v.116, p. 64–66, 2013.

MARTINS, C. I. M. et al. *Behavioural indicators of welfare in farmed fish*. Fish Physiology Biochemistry, v.38, p.17-41, 2012.

MENDONCA, F. Z.; VOLPATO, G. L.; COSTA-FERREIRA, R. S. *Substratum choice for nesting in male Nile tilapia Oreochromis niloticus*. Journal of Fish Biolog, v.77, p.1439-1445, 2010.

Merlini, L. S. et al. *Effects of a homeopathic complex on the performance and cortisol levels in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Homeopathy, v.103, p. 139–142, 2014.

MONTEDOR, A. *Escolha entre isolar-se ou interagir socialmente reduz estresse na tilápia-do-nilo*. Jaboicabal - S.P. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), 2014.

MOREIRA, P. S. A.; VOLPATO, G. L. *Conditioning of stress in Nile tilapia*. Journal of fish biology, v.64, p.961-969, 2004.

NESAN, D. e VIJAYAN, M.M. *Embryo exposure to elevated cortisol level leads to cardiac performance dysfunction in zebrafish*. Elsevier Molecular and Cellular Endocrinology, v.363, p.85-91, 2012.

OLIVEIRA, R. F.; CARNEIRO, L. A.; CANARIO, A. V. M. *No hormonal response in tied fights*. Nature, v.437, p.207-208, 2005.

PANG, X.; CAO, Z.; FU, S. *The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (Carassius auratus, Cyprinus carpio and Spinibarbus sinensis)*. Comparative biochemistry and physiology molecular e integrative physiology, v.159, p. 253-260, 2011.

REDDON, A.R.; O'CONNOR, C.M.; MARSH-ROLLO, S.E. *Effects of isotocin on social responses in a cooperatively breeding fish*. Animal Behaviour, v.84, p.753-760, 2012.

ROS, A. F. H.; BECKER, K.; OLIVEIRA, R. F. *Aggressive behaviour and energy metabolism in a cichlid fish, Oreochromis mossambicus*. Physiology & Behavior, v.89, p.164-170, 2006.

RUZZANTE, D. E. *Mirror image stimulation, social hierarchies, and population differences in agonistic behaviour: a reappraisal*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, v.49, p.1966–1968, 1992.

SAJJAD, S. et al. *Effect of Captive Environment on Plasma Cortisol Level and Behavioral Pattern of Bengal Tigers (Panthera tigris tigris)*. Pakistan veterinary jornal, v. 31, p.195-198, 2011.

SALVANES, A. G. V. et al. *Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish*. Proceedings of the Royal Society: Biological sciences, v.280, p.13, 2013.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. *The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis*. *Endocrine Reviews*, v. 7, n.3, p.284-301, 1986.

SCHRECK, C. B. *Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis*. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, p.549-556, 2010.

Schreiber, S. et al. *Enriched environment improves the cognitive effects from traumatic brain injury in mice*. *Behavioural Brain Research*, v. 271, p. 59–64, 2014.

STRAND, D. A. et al. *Enrichment promotes learning in fish*. *Marine ecology progress series*, v.412, p.273-282, 2010.

TAN, H. M. *The influence of enclosure design on diurnal activity and stereotypic behaviour in captive Malayan Sun bears (*Helarctos malayanus*)*. Elsevier: *Research in Veterinary Science*, v.98, p.228-239, 2013.

VILLAMIZAR, N. et al. *Effect of Lighting Conditions on Zebrafish Growth and Development*. *Zebrafish*, v. 11, 2014.

VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E. *Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, p.1041-1045, 2001.

VOLPATO, G.L. *Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes*. *Revista Brasileira de Zootecnia: suplemento especial*. v.36, p.53-61, 2007.

VOLPATO, G. L.; BARRETO R. E. *Estatística sem dor!!!*. Botucatu: Best Writing. 1ed. v1. 64p. 2011.

WENDELAAR BONGA, S. E. *The stress response in fish*. *Physiological Reviews*, v.77, p.591-625, 1997.

Wilkes, L. et al. *Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare?* Applied animal behaviour Science, v.139, p. 143-150, 2012.

WILSON, A. J. et al. *Integrating Personality Research and Animal Contest Theory: Aggressiveness in the Green Swordtail Xiphophorus helleri.* Plos One, v.6, 2011.

WINGFIELD, J. C. *Control of behavioural strategies for capricious environments.* Animal behavior: Anniversary essay, v.66, p. 807-816, 2003.

WINGFIELD, J. C. *The comparative biology of environmental stress: behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments.* ELSEVIER: Special Issue: Animal Behaviour, v.85, p.1127-1133, 2013.

WOOTTON, R.J. *Ecology of Teleost Fishes.* London: Chapman and Hall, p. 386, 1998.

ZARAGOZA, F. et al. *Influence of environmental enrichment in captive chimpanzees (Pan troglodytes spp.) and gorillas (Gorilla gorilla gorilla): behavior and faecal cortisol levels.* Revista científica-facultad de ciencias veterinárias, v.21, p.447-456, 2011.