

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

**AMBIENTE SOCIAL: INFLUÊNCIA DE COESPECÍFICOS NA MODULAÇÃO DO
ESTRESSE E COMPORTAMENTO AGRESSIVO EM PEIXES**

Vanessa Stramantinoli Rossi

Orientadora: Profa. Dra. Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Prof. Dr. Assaf Barki

Botucatu, São Paulo

2019

AMBIENTE SOCIAL: INFLUÊNCIA DE COESPECÍFICOS NA MODULAÇÃO DO
ESTRESSE E COMPORTAMENTO AGRESSIVO EM PEIXES

Vanessa Stramantinoli Rossi

Orientadora: Profa. Dra. Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Prof. Dr. Assaf Barki

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Botucatu SP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de doutora em
Ciências Biológicas – Área de Concentração:
Zoologia.

Botucatu, São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rossi, Vanessa Stramantinoli.

Ambiente social : influência de coespecíficos na
modulação do estresse e comportamento agressivo em peixes
/ Vanessa Stramantinoli Rossi. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Percília Cardoso Giaquinto

Coorientador: Assaf Barki

Capes: 20404000

1. Peixe. 2. Comportamento social. 3. Stress
(Fisiologia). 4. Agressão.

Palavras-chave: Agressividade; Comportamento social;
Estresse; Peixe.

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, que foram as que mais me ajudaram para que eu chegasse até este momento. Nunca deixaram eu pensar desistir dos meus objetivos de vida e me reergueram em momentos difíceis.

Aos meus pais, Antonio e Neusa, que jamais mediram esforços para que eu buscasse a minha felicidade. Sempre foram e sempre serão meu alicerce. Meu suporte. Minha inspiração.

Ao meu amor Rafael, pelo companheirismo, incentivos e carinhos dedicados a mim. Por sempre acreditar em mim, mesmo quando nem eu acreditava.

Agradecimentos

Agradeço à todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram na construção deste trabalho e em minha construção pessoal e profissional. Sempre busquei extrair o melhor de cada situação vivida e todas as experiências foram importantes para meu crescimento.

À minha orientadora Percília, pelos auxílios, ensinamentos e disposição em sempre proporcionar alternativas e resoluções para os problemas que apareceram. Pelos estímulos na busca do meu diferencial. Obrigada pela confiança.

Aos amigos e colegas de laboratório Rafaela, Adriana, Bruno Bastos, Isabela Mello, Juliana, João, Bruno Camargo, Marina, Isabela Guermandi, Stephanie e nossa ilustre Renata. Obrigada pelas discussões, risadas, ajudas e celebrações. Foi muito bom crescer cientificamente com vocês.

Aos professores do departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial, Helton, Rodrigo, Patrícia e Sílvia, que também foram essenciais para meu crescimento profissional em relação à pesquisa e à docência. Sou muito grata e me sinto privilegiada por ter sido instruída por vocês.

À Professora Miriam Tsunemi do departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu, pelo auxílio concedido aos procedimentos estatísticos.

E por fim, ao Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pela infraestrutura oferecida para que a realização do meu trabalho fosse possível.

Apoio financeiro: Capes

Epígrafe

“You cannot get through a single day without having an impact on the world around you. What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference you want to make.”

(Jane Goodall)

SUMÁRIO

Comitê de Ética	8
Tese.....	9
Hipóteses	9
Apresentação	9
1. Introdução.....	12
Estudo 1 – Influências sociais na recuperação do estresse e na agressividade em peixes ...	15
2. Metodologia.....	15
2.1. Animais e Manutenção	15
2.2. Delineamento Geral.....	15
2.3. Procedimentos Específicos.....	16
2.3.1. Formação dos grupos	16
2.3.2. Aplicação do estresse - Inserção em ambiente novo e perseguição com rede	17
2.3.3. Avaliação do estresse.....	18
2.3.4. Análise de confrontos.....	19
2.3.5. Análise de dados	20
3. Resultados.....	21
Estudo 2 – A modulação da agressividade por influências sociais agressivas	29
4. Metodologia.....	29
4.1. Animais e Manutenção	29
4.2. Delineamento Geral.....	29
4.3. Procedimentos específicos	30
4.3.1. Produção dos vídeos-estímulo.....	30
4.3.2. Teste do espelho	31
4.3.3. Exibição dos vídeos modelo.....	31
4.3.4. Análise de dados	31
5. Resultados.....	32
6. Discussão	37

7. Referências	44
Anexo	52

Comitê de Ética

Os procedimentos experimentais desta tese realizados com a espécie de peixe tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) estão de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-SP (protocolos nº 1175 e 1176-CEUA).

9

Tese

10 Ambiente social: influência de coespecíficos na modulação do estresse e comportamento
11 agressivo em peixes.

12

13

Hipóteses

- 14 1. O ambiente social afeta a recuperação do estresse.
15 2. O ambiente social afeta a agressividade.

16

17

Apresentação

18 Esta tese tem como objetivo principal avaliar como o ambiente social afeta a recuperação do
19 estresse e o comportamento agressivo em peixes. Primeiramente nosso foco foi avaliar se havia
20 influências sociais positivas após a aplicação de estresse ao ponto da obtenção/geração de uma
21 recuperação mais rápida, amenizando o estresse em indivíduos espectadores. Este fenômeno é
22 conhecido como apoio social (*social buffering*) e já é descrito em diversos animais sociais, desde
23 mamíferos, peixes e até invertebrados. Em peixes, este foi estudado em Zebrafish, que é uma espécie
24 que possui semelhanças genéticas e neurais com vertebrados superiores e apresenta estrutura social
25 bem definida. Apesar disso, esse fenômeno ainda é pouco estudado em outras espécies com
26 características sociais específicas, como por exemplo, sociedades com presença de altas taxas de
27 agressão e disputa hierárquica entre indivíduos. Dessa forma, avaliamos a ocorrência do apoio social
28 em tilápia-do-Nilo, uma espécie territorialista com agressividade elevada entre os indivíduos para
29 manutenção de hierarquia. Neste estudo, observamos a ocorrência do fenômeno de apoio social
30 apenas no contexto em que o indivíduo era inserido em um ambiente novo e possuía sinais visuais
31 de grupos dos coespecíficos. Entretanto, ao longo da experimentação, após a familiarização com os
32 coespecíficos, notamos o aparecimento de outro fenômeno que influenciou negativamente na
33 recuperação do estresse, o ‘estresse social’. Este é um fenômeno causado por interações agonísticas
34 em um grupo e, neste trabalho, ocorreu mesmo em indivíduos isolados fisicamente, possuindo
35 apenas sinais visuais do grupo social. Assim, decidimos avaliar se haveria influência da observação
36 de interações agressivas de um grupo no comportamento agressivo de indivíduos espectadores.

Obtivemos uma correlação negativa, em que, quanto menor o número de confrontos de um grupo, maior a agressividade deflagrada pelo espectador. Como nesse estudo não foi possível o controle das interações dos grupos sociais, decidimos realizar um novo estudo onde havia este controle. Dessa forma, em nosso segundo estudo, avaliamos se o comportamento agressivo de indivíduos espectadores é modulado a partir do nível de agressão do grupo observado. Com isso, observamos uma resposta similar, na qual, animais que presenciaram coespecíficos sem interações agressivas, aumentaram os níveis de agressividade quando comparado a um controle. Assim, concluímos que mesmo em uma espécie agressiva como a tilápia-do-Nilo, com o predomínio de estresse social, há a ocorrência de apoio social em determinado contexto. Além disso, a tilápia é capaz de avaliar o contexto agressivo social, que por sua vez modula a agressividade individual.

Estudo 1 – O ‘apoio social’ é um fenômeno evolutivamente conservado entre os vertebrados sociais, em que, a presença de coespecíficos reduz respostas comportamentais e fisiológicas a situações aversivas ou estressantes. Em peixes, espécies que formam grupos sociais estruturados, como o Zebrafish, tem uma diminuída resposta de medo quando expostos a situações de perigo quando na presença de coespecíficos em grupo. Entretanto, em peixes como a tilápia-do-Nilo, que também formam grupos sociais estruturados, mas são altamente territorialistas e agressivos quando em grupos, o fenômeno de apoio social ainda não foi estudado. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se haveria o efeito do ambiente social na recuperação de estresse e ainda, qual seria o efeito deste no comportamento agressivo em tilápia-do-Nilo. Peixes espectadores foram individualizados em aquários adjacentes a de grupos de coespecíficos ou vazios, como controle. Dessa forma, avaliamos a recuperação do estresse nesses dois contextos de ambiente social ou isolamento, através da análise da frequência ventilatória antes e após situações estressantes (ambiente novo e perseguição com rede tipo puçá) aplicadas com um intervalo de 7 dias, durante 4 semanas (1 estresse por semana). Ainda, após 24 h do último estresse aplicado, avaliamos a agressividade individual de espectadores e controle, através do teste do espelho. A agressividade dos indivíduos em grupo também foi avaliada ao longo da experimentação. Dessa forma, observamos que animais que possuíam contato visual com um grupo social, se recuperaram mais rápido do estresse causado por um ambiente novo que indivíduos controle. Entretanto, após 3 semanas a resposta se inverteu, da

qual animais isolados se recuperaram mais rápido do estresse de perseguição com rede, do que animais com o contato visual do grupo social. Além disso, obtivemos uma correlação negativa entre o número de confrontos dos animais em grupo com o número de confrontos dos espectadores e também com a frequência ventilatória basal dos mesmos. Concluimos que na tilápia-do-Nilo o ambiente social influencia na recuperação do estresse e no comportamento agressivo de indivíduos espectadores. Diferentes contextos sociais promovem diferentes respostas, que também são moduladas pelas interações sociais experienciadas.

Estudo 2 - As experiências obtidas no meio social podem moldar o comportamento de peixes, podendo também influenciar na tomada de decisão em confrontos agressivos ou padrões de agressividade. Partindo dos resultados obtidos no estudo 1, em que, a agressividade do grupo é inversamente proporcional a agressividade de um indivíduo que presencia e avalia a quantidade de confrontos, decidimos controlar a variável ‘agressividade’ para avaliar se o ambiente social influencia no comportamento agressivo de espectadores. Aqui, indivíduos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) observaram vídeos de coespecíficos exibindo altas taxas de confrontos agressivos ou nenhuma agressão. A agressividade individual foi avaliada através de testes do espelho realizados antes e após o período de exibição dos vídeos com ou sem contexto agressivo. Nossos resultados mostraram que indivíduos que observaram contextos sociais sem agressividade, aumentaram o número de confrontos quando comparados a um controle e vice-versa. Dessa forma, concluimos que a tilápia modula seu comportamento agressivo de acordo com o contexto social agressivo, mesmo com uma demonstração de um grupo social virtual.

1. Introdução

O comportamento social pode ser definido como atividades entre membros de uma mesma espécie, com possíveis consequências positivas ao *fitness* de indivíduos envolvidos (Szekely et al. 2010). Dessa forma, animais individuais se agregam formando grupos, com presença de padrões de interações entre os indivíduos, que variam dependendo de diversos fatores, como a presença de predadores ou competição por alimento (Doran et al. 2019). Com isso, animais podem transitar de grupos por diferentes razões, como pela existência de variedade fenotípica ou conflitos de informações sobre o estado do ambiente entre os indivíduos (Merkle et al. 2015; Killen et al. 2017).

Em espécies sociais, a formação de grupos promove melhor interação e comunicação entre indivíduos, sendo essenciais para a cooperação (Kikusui et al. 2006). Ainda, há a obtenção de benefícios relacionados a sobrevivência ou a reprodução dos membros participantes (Szekely et al. 2010). Geralmente, quando indivíduos obtêm benefícios através do grupo, espera-se que os mesmos realizem atividades que proporcionem a manutenção da formação coletiva, também servindo aos interesses individuais (Alexander, 1974). Além da cooperação, um dos aspectos mais benéficos da formação social é a maior proteção contra prováveis ameaças do ambiente em que vivem, principalmente contra predadores (Alcock, 2011). Um exemplo, são machos da espécie de peixe sargo-de-orelha-azul (*Lepomis macrochirus*), que formam grupos reprodutivos e cooperam para espantar predadores de ovos que se aproximam de seus ninhos (Gross & MacMillan, 1981).

Apesar dos benefícios, os custos de viver em grupos podem ser elevados. Na maioria das espécies sociais, os animais despendem tempo e energia para alcançar *status* social, importante para a aquisição de parceiros reprodutivos e alimento (Alcock, 2011). Geralmente, a aquisição destes e outros recursos importantes ocorre após disputas agressivas, com estabelecimento de hierarquias sociais (Jobling, 1983). O estabelecimento e a manutenção de hierarquia provocam demandas fisiológicas e estresse, tanto nos animais dominantes como nos submissos, porém com maior intensidade nos animais submissos (Fernandes, 1997).

Dessa forma, a presença de um coespecífico pode atuar como um estímulo de melhoria na condição social ou como um estressor (Oliveira & Faustino, 2017), dependendo de fatores como a familiaridade com o coespecífico (Graves & Hennessy, 2000), o contexto social apresentado (Miczek, 1974) e o comportamento exibido pelo coespecífico (Kiyokawa et al. 2014). Em humanos,

119 pessoas que possuem contato com indivíduos que os forneçam bens psicológicos e materiais,
120 possuem melhor saúde quando comparado a indivíduos que possuem poucos contatos sociais que
121 trazem algum tipo de apoio (Cohen & Wills, 1985). Esse fenômeno é chamado de ‘apoio social’ e é
122 considerado um fator importante no enfrentamento do estresse e na resiliência em humanos (Oliveira
123 & Faustino, 2017). Quando o apoio está relacionado à diminuição de respostas ao estresse, é
124 chamado de “*social buffering*”, em que o apoio causa proteção do indivíduo a potenciais influências
125 de eventos estressantes (Cohen & Wills, 1985). Assim, como são fenômenos intimamente
126 relacionados e ainda não surgiram traduções para a expressão em inglês, adotaremos o termo ‘apoio
127 social’ para nos referir sobre a influência positiva na recuperação do estresse em experiências
128 aversivas. Muito estudado em humanos (Heinrichs et al. 2003), o apoio social é uma característica
129 evolutivamente conservada (Kikusui et al. 2006), descrita também em primatas não-humanos (Wittig
130 et al. 2016), roedores (Fuzzo et al. 2015), aves (Edgar et al. 2015), peixes (Faustino et al. 2017) e até
131 em invertebrados (Tian et al. 2017). Embora bastante estudado principalmente em mamíferos, ainda
132 é um fenômeno pouco estudado em outros vertebrados. Com isso, mais estudos comparativos são
133 necessários para entender a evolução do apoio social entre animais sociais.

134 Em peixes, o apoio social foi demonstrado na espécie *Danio rerio*, o zebrafish (Faustino et al.
135 2017), que vive em grupos com estruturas sociais bem definidas (Spence et al. 2007), e forma
136 hierarquias de dominância através de interações agressivas, com diminuição da agressão após
137 estabelecimento hierárquico (Larson et al. 2006). Entretanto, ainda em peixes, há outras espécies
138 sociais que apresentam variações em algumas características comportamentais, como a
139 agressividade. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie territorialista que também
140 apresenta hierarquia social estabelecida por interações agonísticas (Gonçalves-de-Freitas et al.
141 2008), com diminuição de confrontos após o estabelecimento hierárquico (Johnsson et al. 2006).
142 Contudo, alguns fatores como tamanho homogêneo de indivíduos podem acarretar em intensificação
143 de interações agressivas, aumentando a instabilidade social (Boscolo et al. 2011). Ainda, pode haver
144 aumento de mortalidade por excesso de gasto energético e excesso de lesões físicas (Johnsson et al.
145 2006). Este cenário com intensos confrontos agressivos pode gerar uma situação oposta ao ‘apoio
146 social’, o ‘estresse social’. Este, ao invés de alívio, traz aumento do estresse, causado pelos
147 confrontos agressivos em um grupo (Alvarenga & Volpato, 1991). Geralmente a agressão é
148 provocada por estímulos de coespecíficos em um contexto social de competição. Portanto, o

ambiente social em que um indivíduo se desenvolve pode ser importante para a expressão do seu comportamento agressivo (Barki & Volpato, 1998), já que interações sociais podem influenciar na aquisição de novas informações, como na performance de um novo padrão de comportamento (Nicol, 1995).

A informação do grupo pode ser adquirida diretamente (quando um sinalizador e um receptor estão envolvidos) ou indiretamente, através da observação de comportamentos por um espectador (McGregor & Peake, 2000). Em um ambiente social, animais respondem a presença de coespecíficos (“efeito de público”) alterando seu comportamento de acordo com o tipo de público e contexto social (Doutrelant et al., 2001; Pinto et al., 2011). Desta interação, os espectadores extraem informações, utilizando-as em subsequentes interações (Oliveira et al, 1998; Earley, 2010). Assim, o ambiente social pode moldar a expressão de respostas fisiológicas relacionadas ao estresse (Kikusui et al. 2006), além de habilidades comportamentais (Stamps & Groothuis, 2010; Brockmark et al., 2010), como no comportamento agressivo de peixes (Barki & Volpato, 1998). Como em peixes, os estudos sobre o papel do grupo social como atenuador de situações estressoras ou até o chamado apoio social, ainda são recentes e escassas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se o ambiente social influencia na recuperação do estresse e no comportamento agressivo de espectadores em tilápia-do-Nilo. Esta é uma espécie agressiva, com presença de embates constantes para ascensão ou manutenção do status hierárquico.

As ferramentas para transmitir os efeitos do apoio social variam amplamente, o que significa que são vários sistemas sensoriais que recebem a informação e estão envolvidos no processamento deste fenômeno, e que o processamento sensorial difere entre as espécies e os contextos experimentais (Kikusui et al. 2006). Em peixes, a ocorrência do apoio social foi demonstrada na espécie *Danio rerio*, o zebrafish, através de sinais visuais e químicos, sendo a visão a modalidade sensorial mais efetiva no processo de atenuação do medo (Faustino et al. 2017). Ainda, as interações entre os indivíduos do grupo transmitem informações de um provável contexto ‘seguro’ a um indivíduo observador. Dessa forma, os padrões de interações entre indivíduos transmitem informações sobre o estado de emoção e alerta do grupo (Kikusui et al. 2006). Assim, neste estudo, utilizamos os sinais visuais como meio de transmissão e comunicação entre coespecíficos e indivíduos espectadores.

Estudo 1 – Influências sociais na recuperação do estresse e na agressividade em peixes

2. Metodologia

2.1. Animais e Manutenção

Utilizamos adultos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. Os peixes foram aclimatados por 30 dias em tanques de 500 L em biotério (1 peixe/6L; T°C: 24°±1°C; pH: ~ 6,5; fotoperíodo: 12L:12D) antes do início do experimento. Nessa condição, os tanques receberam aeração contínua e filtros que incluíam filtração mecânica e biológica, sendo sifonados diariamente para remoção de restos de alimento e fezes. Assim, os tanques foram mantidos com boa qualidade da água, com níveis de nitrito e amônia abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente. Além disso, havia tubos de PVC no fundo dos tanques que foram utilizados como tocas pelos animais. Os peixes no biotério foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial para peixes tropicais (38% de proteína bruta) até a saciedade.

Os animais utilizados como espectadores e controle não diferiram quanto ao peso (teste t, independente: df = 18; t = 0,92; p = 0,3654) e ao comprimento (teste t, independente: df = 18; t = 1,08; p = 0,2926).

2.2. Delineamento Geral

Para avaliar a influência social na recuperação do estresse, analisamos a frequência ventilatória de indivíduos espectadores que possuíam ou não contato visual com um grupo de coespecíficos, antes e após situações de estresse agudo. Primeiramente aclimatamos por 7 dias, grupos de tilápia-do-Nilo compostos por 3 indivíduos (n=10), em aquários ‘demonstração’, adjacentes a aquários em que seriam introduzidos os indivíduos espectadores. Após esse período, peixes espectadores foram individualizados nestes aquários (Dia 1 – início da experimentação), dos quais, possuíam apenas contato visual com os grupos de coespecíficos. Ao mesmo tempo, havia um grupo controle em que, 10 peixes foram individualizados em aquários adjacentes a aquários ‘vazios’, ou seja, sem nenhum coespecífico. Após 60 min da inserção dos peixes espectadores e controle nestes ambientes novos, com ou sem contato visual de coespecíficos, avaliamos a frequência ventilatória dos mesmos. Decorridos 7 dias (Dia 7), avaliamos a frequência ventilatória antes (basal)

e após (pós estresse) a aplicação do estresse de manuseio (perseguição com rede do tipo puçá) em cada indivíduo espectador e controle. Repetimos esse procedimento após mais 7 e 14 dias (Dia 14 e 21, respectivamente). Além disso, também avaliamos o número de confrontos deflagrados nos animais em grupo, nos dias 13 e 20 de experimentação e o número de confrontos deflagrados pelos peixes espectadores e controle, no 22º (último) dia de experimento, após 24 h do último estresse aplicado. Ainda, a cada 48 h, restos de alimento e fezes eram sifonados, com 30% de troca parcial da água de todos os aquários, sempre utilizando sifões individuais para evitar transmissão de odor entre aquários. Para melhor visualização, o esquema do delineamento se encontra na Figura 1.

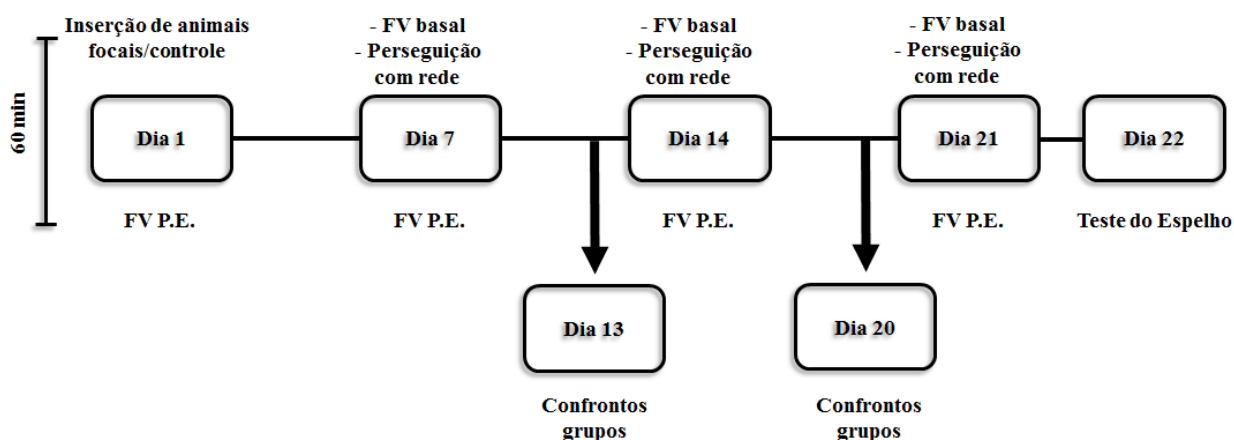


Figura 1. Esquema do delineamento experimental. A avaliação da frequência ventilatória pós estresse (FV P.E.) era realizada após 60 min do término do processo de perseguição com rede. A frequência ventilatória basal (FV basal) era mensurada antes de todos os procedimentos de aplicação do estresse.

2.3. Procedimentos Específicos

2.3.1. Formação dos grupos

Para formação de cada grupo, selecionamos 3 indivíduos de tamanhos semelhantes ($14,7 \pm 3,5$ g; e $7,66 \pm 0,59$ cm), em uma tentativa de padronizar a determinação hierárquica entre os grupos, já que o tamanho corporal pode afetar interações agressivas (Beeching, 1992), além de estar associado à dominância em peixes (Turner & Huntingford, 1986; Volpato & Fernandes,

1994).

Os animais em grupo foram aclimatados em aquários de vidro (40 cm X 20 cm X 25 cm) por 7 dias, para estabelecimento da hierarquia e aclimatização com a presença do experimentador.

2.3.2. *Aplicação do estresse - Inserção em ambiente novo e perseguição com rede*

A mudança abrupta a um novo ambiente e a manipulação de indivíduos são considerados causas comuns de respostas agudas ao estresse em peixes (Barcellos et al. 2001). Assim, consideramos que a introdução de indivíduos espectadores e controle nos aquários experimentais (40 cm X 20 cm X 25 cm) experimentais, foi a primeira situação de estresse agudo, indicada como o primeiro dia de experimentação (Dia 1). Assim, os peixes foram introduzidos em aquários individuais, adjacentes a uma distância de aproximadamente 3 mm dos aquários ‘demonstração’, que continham ou não grupos de coespecíficos (Figura 2). Dessa forma, os peixes espectadores ou controle possuíam apenas pistas visuais dos aquários adjacentes, a partir do momento em que eram introduzidos nos aquários individuais.

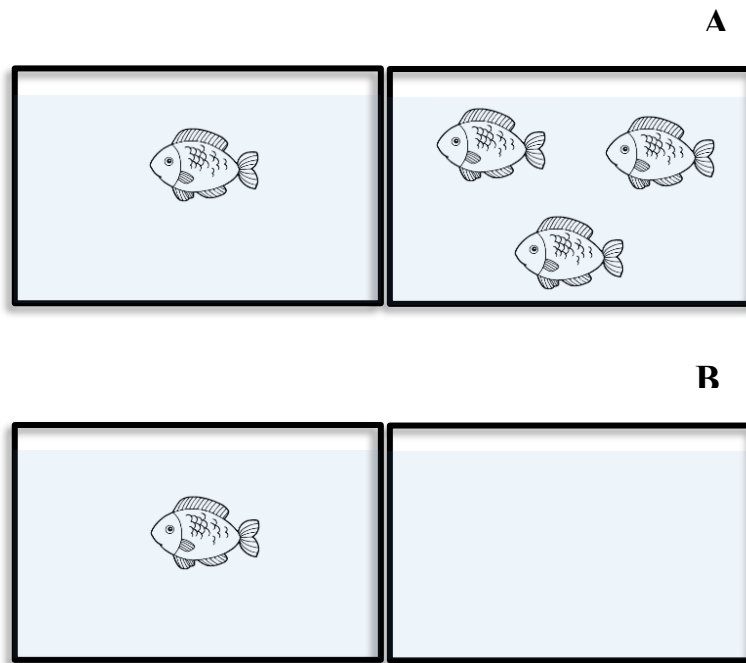


Figura 2 – Esquema dos tratamentos experimentais. Em **A** temos peixes espectadores em contato visual com um grupo de coespecíficos; e em **B**, peixes controle com aquário adjacente sem a presença de coespecíficos.

Após o estresse de inserção em ambiente novo, foi aplicado o estresse de perseguição com rede nos peixes espectadores e controle, nos próximos dias 7, 14 e 21 da experimentação, em que os peixes foram individualmente perseguidos com uma rede (8 cm x 8 cm) dentro de seus próprios aquários por 5 min. No momento de aplicação do estresse por perseguição com rede, o contato visual do peixe espectador com o grupo era bloqueado por um papel branco, a fim de evitar estresse ao grupo. Para fins de padronização, o mesmo foi feito com os peixes do controle, bloqueando a visão ao aquário adjacente.

2.3.3. Avaliação do estresse

Para avaliar a recuperação do estresse, mensuramos a frequência ventilatória, em que sob condições padronizadas, é considerada um indicador de resposta comportamental a situações aversivas (Lucas et al. 1993; Barreto & Volpato 2004). Além disso, como é considerada uma técnica

não invasiva, minimiza chances de estresse experimental, contribuindo com o bem-estar animal, além de simplificar o desenho experimental e a interpretação dos dados (Ellis et al. 2004).

Dessa forma, após 60 min da inserção em ambiente novo e antes e após 60 min decorridos do processo de perseguição com rede, contabilizamos o tempo para que o peixe realizasse 20 batimentos bucais ou operculares (Barreto et al. 2003). Com isso, calculamos a frequência dos movimentos por minuto (baseado em Alvarenga & Volpato, 1995).

A resposta fisiológica inicial ao estresse ocorre através de resposta neuroendócrina/endócrina, em que há uma rápida liberação de hormônios como cortisol e catecolaminas. Embora as catecolaminas sejam rapidamente degradadas na circulação sanguínea após um evento estressor (< 30 min), outros parâmetros fisiológicos que também servem para avaliação do estresse, como a glicose plasmática, ainda se mantém altos mesmo após 120 min do estresse aplicado (Vijayan et al, 1997), mostrando que o cortisol possui um importante papel na manutenção da glicose pós estresse a longo prazo (Iwama, 1998). Na tilápia, o pico de elevação do cortisol ocorre após 60 min da ocorrência de um estressor (Barcellos et al 1999a, 1999b). Dessa forma, escolhemos mensurar a frequência ventilatória após 60 min do estresse aplicado, para avaliar os indivíduos focais em um provável período de recuperação do estresse.

2.3.4. Análise de confrontos

Para a análise de confrontos dos grupos, contabilizamos o número total de interações agonísticas deflagradas por todos os membros do grupo em qualquer um dos coespecíficos presentes, durante 5 min, nos dias 13 e 20 da experimentação (24 h antes do segundo e terceiro estresse de perseguição por rede). Avaliamos essa variável em dois dias ao longo da experimentação para avaliar os padrões de confrontos que os indivíduos espectadores experienciavam. Dessa forma, analisamos o número de mordidas despendidas em qualquer área do corpo do coespecífico, confrontos laterais (em que o peixe se dispõe lateralmente ao coespecífico e emite ondulações corporais) e perseguição (o agressor nada em direção ao oponente, enquanto este último nada longe do agressor, sem nenhum contato físico).

Para avaliar a agressividade dos peixes espectadores e controle, utilizamos o teste do espelho, após 24 h da última aplicação de estresse (22º dia). O teste do espelho consiste em mensurar a

agressividade de peixes frente a um espelho, uma vez que estes animais não reconhecem seu próprio reflexo e emitem comportamentos agressivos contra o mesmo (Balzarini et al., 2014). Ainda, a imagem refletida no espelho pode representar tanto um oponente como um espectador (Falsarella et al. 2017). Para esse teste, colocamos um espelho justaposto ao aquário, sendo escondido por uma folha branca de papel. Além disso, bloqueamos a visão dos peixes espectadores e controle aos respectivos aquários adjacentes. No momento em que a folha que bloqueava o espelho foi retirada, registramos durante 5 min os comportamentos agressivos emitidos por cada indivíduo. Analisamos a latência para início de comportamentos agressivos (intervalo de tempo entre a exposição do espelho ao peixe e o início de interações agonísticas), o número de mordidas (interação frontal, com aberturas da boca), o número de investidas (interação frontal, sem aberturas da boca) e o número de confrontos laterais (o peixe se dispõe lateralmente ao coespecífico, representado pelo seu próprio reflexo ao espelho e emite ondulações corporais) emitidos contra o espelho. Os etogramas para avaliação de confrontos do grupo e dos peixes espectadores foram adaptados de Alvarenga & Volpato (1995).

2.3.5. *Análise de dados*

Previamente, avaliamos a normalidade (teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homocedasticidade (teste de Levene, $p > 0,05$) dos dados. Dessa forma, quando os dados apresentavam distribuição não normal ou não homocedástica, utilizamos a função Log para normalizar. Além disso, dois indivíduos espectadores, por diferentes motivos, não puderam ter a frequência ventilatória contabilizada nos dias 21 pós estresse e outro no dia 21 basal e pós estresse. Portanto, para estes dados faltantes, utilizamos a média referente aos dias já avaliados de frequência ventilatória basal e pós estresse.

Para avaliar se houve diferença de tamanho (peso e/ou comprimento) entre os animais dos grupos controle e os animais do grupo experimental (espectadores), utilizamos teste-t independente.

Para avaliar diferenças entre as frequências ventilatórias basais e após os estresses, utilizamos ANOVA de medidas repetidas, utilizando o tempo como medida repetida e complementamos a análise com o teste à posteriori de Fisher LSD, quando necessário.

Além disso, para avaliar se houve correlação entre o número de confrontos dos peixes em grupo e o número de confrontos dos peixes espectadores no teste do espelho, e entre o número de

confrontos do grupo e as frequências ventilatórias basais e pós estresse dos peixes espectadores, realizamos regressão linear (Pearson).

Para todas as análises realizadas nesse estudo, consideramos $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

Os indivíduos focais, tanto do grupo controle quanto dos espectadores, apresentaram os mesmos padrões de coloração, em que possuíam manchas nas alturas das linhas laterais. Já nos grupos, indivíduos dominantes eram mais claros e com aparência brilhante e os submissos possuíam aparência mais escura, com manchas verticais por todo o corpo. Estes padrões de coloração relacionados à posição hierárquica em um grupo já são bem estabelecidos para esta espécie (Falter, 1987; Volpato et al. 1989).

Obtivemos algumas diferenças nas frequências ventilatórias entre os tratamentos espectador e controle e dentro de cada tratamento ao longo do tempo.

Primeiramente, obtivemos diferenças estatísticas quando comparamos as respostas do Dia 1 entre os tratamentos controle e espectador. Nesta análise, a FV dos espectadores foi menor que do controle (teste t independente: $df = 18$; $T = 4,65$; $p = 0,0001$), indicando existência de influência pelos grupos nas respostas relacionadas ao estresse apresentadas em situação aversiva de ambiente novo (Figura 3).

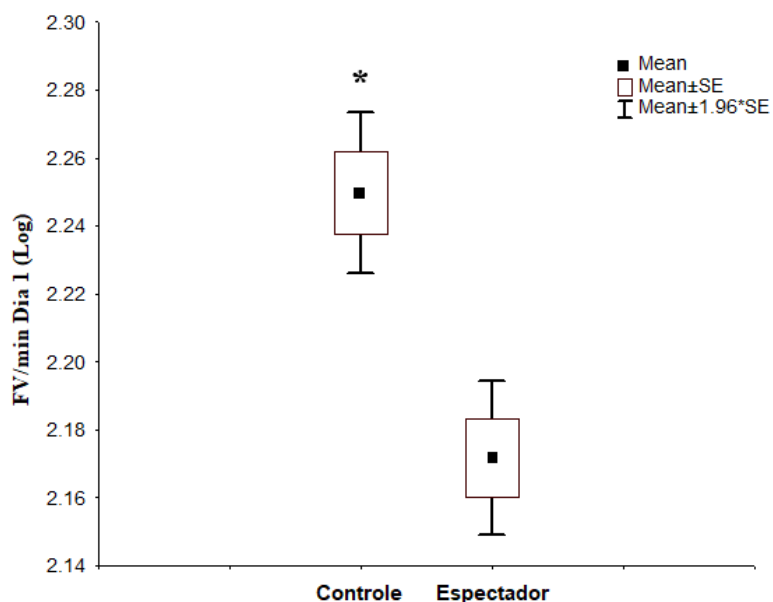


Figura 3 – Valores médios ($\pm$ erro padrão) de frequência ventilatória por minuto (FV/min) mensuradas no Dia 1 após inserção em ambiente novo. As médias diferiram estatisticamente (Teste t independente, $p < 0,05$).

Avaliando as respostas referentes às FVs basais ao longo do tempo, observamos uma diminuição ao longo dos dias, nos dois experimentos, porém sem diferenças estatísticas entre os dias e entre os tratamentos (ANOVA de dois fatores: $df = 2$; $F = 0,15$; $p = 0,8593$) (Figura 4).

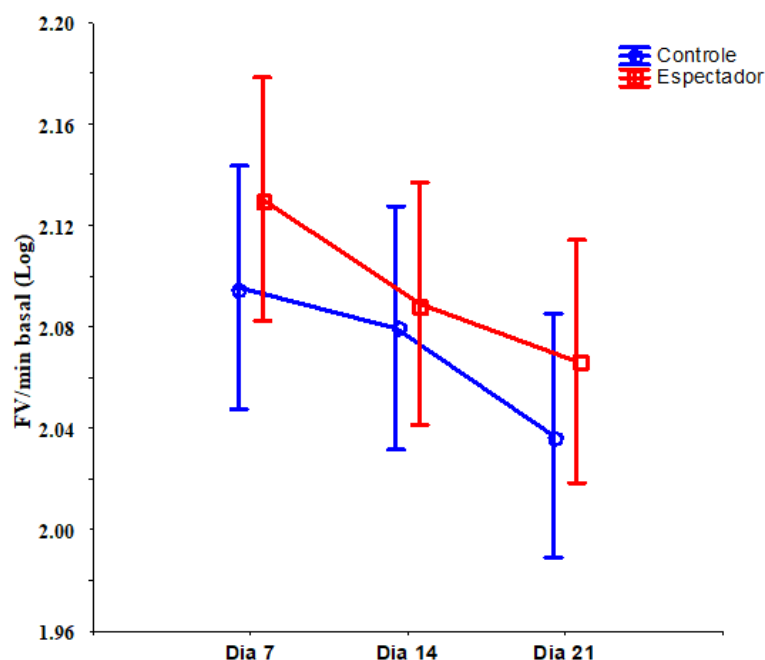


Figura 4 – Valores médios ($\pm$ erro padrão) de frequência ventilatória por minuto (FV/min) basal ao longo dos dias de experimento. As médias não diferiram estatisticamente (ANOVA de dois fatores, $p > 0,05$).

Quando avaliamos as respostas Pós Estresse, obtivemos diferenças ao longo do tempo (ANOVA de dois fatores: $df = 1$; $F = 8,87$; $p = 0,0043$) e quando comparamos momentos/dias (ANOVA de dois fatores: $df = 2$; $F = 6,45$; $p = 0,0030$). Na primeira análise, a FV do Dia 7 foi estatisticamente maior que a do Dia 21 tanto no tratamento controle (Fisher LSD: $p = 0,0036$), quanto no espectador (Fisher LSD: $p = 0,0466$). Isso pode indicar uma resposta de aclimação com o estressor, que foi o mesmo durante os dias avaliados. Já quando comparamos momentos, obtivemos diferença no Dia 21, no qual a FV do grupo controle foi menor que do grupo espectador (Fisher LSD: $p = 0,0252$), indicando que, apesar das mesmas diferenças ao longo do tempo, o grupo controle ainda teve uma recuperação mais rápida ao estresse, em relação ao grupo espectador no referido dia (Figura 5).

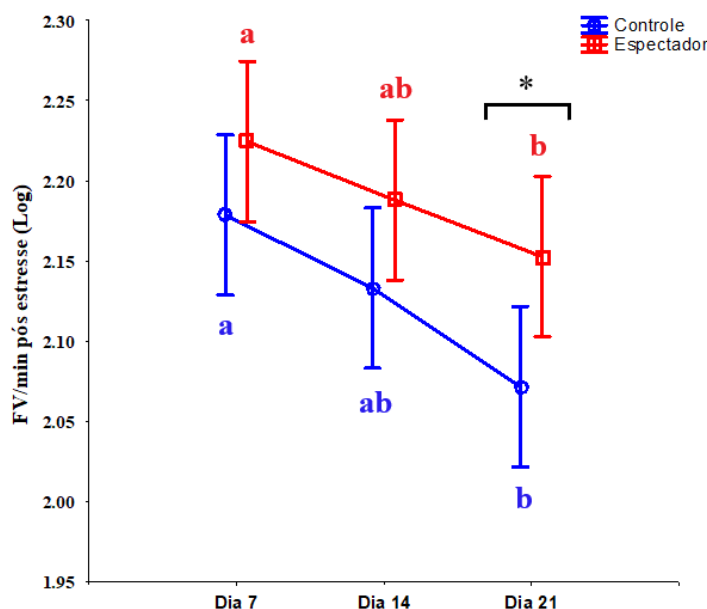


Figura 5 – Valores médios ($\pm$ erro padrão) de frequência ventilatória por minuto (FV/min) pós estresse de perseguição com rede, ao longo dos dias de experimento. Foram obtidas diferenças ao longo do tempo e em um momento entre tratamentos (ANOVA de dois fatores, Fisher LSD, $p < 0,05$). Letras indicam diferenças em um mesmo tratamento. Barra horizontal com asterisco indica diferença entre tratamentos. Traços conectando as médias não indicam valores entre os dias de experimento.

Quando comparamos as respostas de FV nos Dias 1 e 21, observamos diferença ao longo do tempo (ANOVA de dois fatores: $df = 1$; $F = 17,74$; $p = 0,0001$). No tratamento controle a FV do Dia 21 foi estatisticamente menor que a do Dia 1 (Fisher LSD: $p = 0,0000$). Já no tratamento espectador, não houve diferença entre os dias (Fisher LSD: $p = 0,4809$) (Figura 6). Ainda, quando comparamos as respostas em momentos, observamos diferenças estatísticas entre tratamentos tanto do Dia 1 (Fisher LSD: $p = 0,0059$) como mostrado na primeira análise, quanto no Dia 21 (Fisher LSD: $p = 0,0044$), com inversão de comportamentos. Essa inversão no último dia de experimento pode indicar que houve uma recuperação mais rápida ao estressor no grupo controle e o estresse se manteve no grupo espectador. Este poderia ter sido resultado do estresse social (Figura 6).

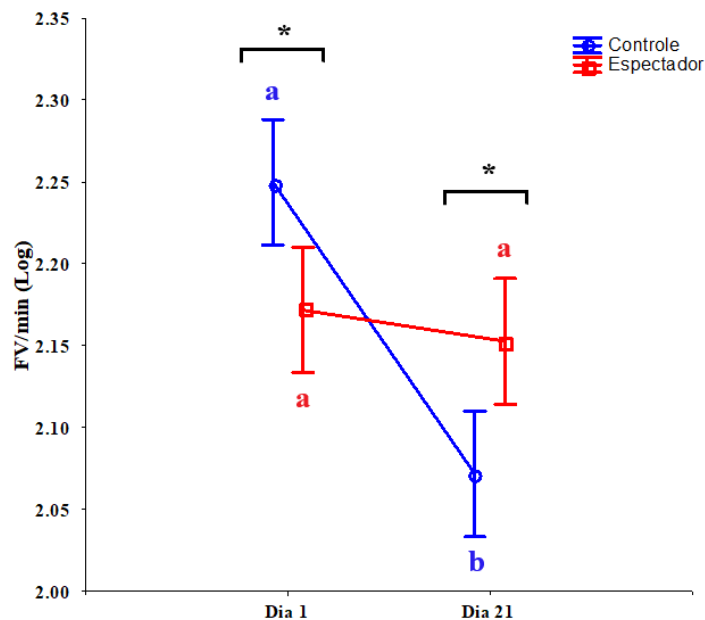


Figura 6 – Valores médios ($\pm$ erro padrão) de frequência ventilatória por min (FV/min) de contextos diferentes pós estresse (ambiente novo e perseguição com rede, respectivamente). Foram obtidas diferenças entre dias em um mesmo tratamento e entre tratamentos (ANOVA de dois fatores, Fisher LSD, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças em um mesmo tratamento, ao longo do tempo. Barras com asterisco indicam diferenças em mesmos momentos, entre tratamentos. Traços conectando as médias não indicam valores entre os dias de experimento.

Por último, para uma visão geral do experimento ao longo do tempo, para cada tratamento realizamos uma média dos valores basais e pós estresse de todos os dias e comparamos entre si e entre o Dia 1 (ANOVA de dois fatores: $df = 2$; $F = 8,01$; $p = 0,0009$). Quando avaliamos o tratamento controle, obtivemos que todos os contextos são diferentes entre si, em que a FV do Dia 1 maior que a média basal (Fisher LSD: $p = 0,0000$) e a média pós estresse (Fisher LSD: $p = 0,0000$), e média basal menor que média pós estresse (Fisher LSD: $p = 0,0290$). Já quando avaliamos o tratamento espectador observamos que o Dia 1 foi maior que a média basal (Fisher LSD: $p = 0,0040$) e estatisticamente igual a média pós estresse (Fisher LSD: $p = 0,5163$), e média basal menor que média pós estresse (Fisher LSD: $p = 0,0005$). Ainda, quando comparamos os tratamentos, obtivemos diferenças no Dia 1, com a FV do controle maior que a dos espectadores (Fisher LSD: $p = 0,0033$) e as médias pós estresse, em que houve inversão quando comparado ao Dia 1 (Fisher LSD: $p = 0,0208$), e sem diferenças estatísticas entre as médias basais (Fisher LSD: $p = 0,3385$) (Figura 7).

Isto pode indicar que o contexto (isolado ou em grupo) foi importante para a recuperação de situações aversivas nos peixes experimentados.

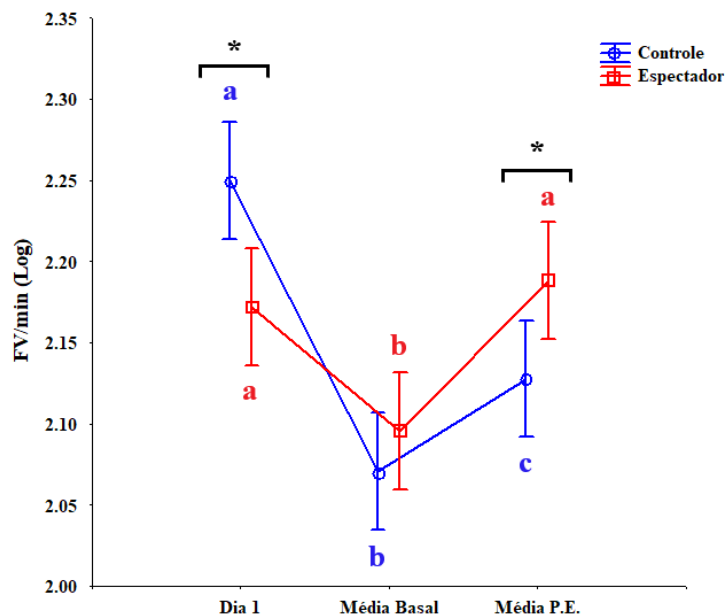


Figura 7 – Valores médios ($\pm$ erro padrão) de frequência ventilatória por minuto (FV/min) do Dia 1 e das médias dos valores basais e pós estresse. Foram obtidas diferenças em cada tratamento ao longo do tempo e em momentos entre tratamentos (ANOVA de dois fatores, Fisher LSD, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças em um mesmo tratamento, ao longo do tempo. Barras com asterisco indicam diferenças em mesmos momentos, entre tratamentos. Traços conectando as médias não indicam valores entre os dias de experimento.

Em relação às respostas obtidas nos testes do espelho, não houve diferença entre as latências para início de confrontos entre os grupos espectador e controle (teste t independente: $p = 0,0652$; $t = 2,02$; $df = 12$) (Figura 8).

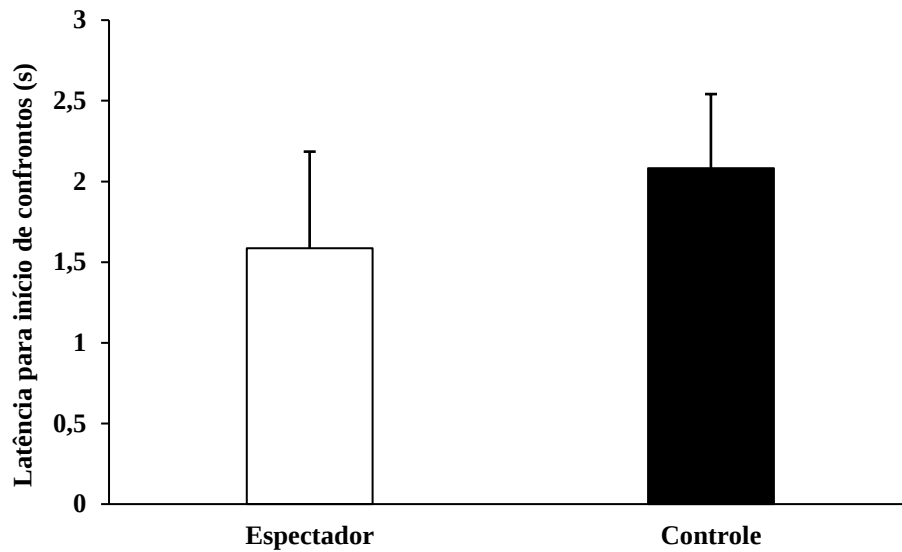


Figura 8 – Valores médios ($\text{Log} \pm \text{dp}$) da latência para início de confrontos de peixes espectadores e controle. Não houve diferença estatística (teste t independente; $p > 0,05$).

Além disso, houve diferença entre o número de confrontos deflagrados pelos peixes espectadores e controle nos testes do espelho (Teste t independente: $p = 0,0256$; $t = 2,54$; $df = 12$) (Figura 9).

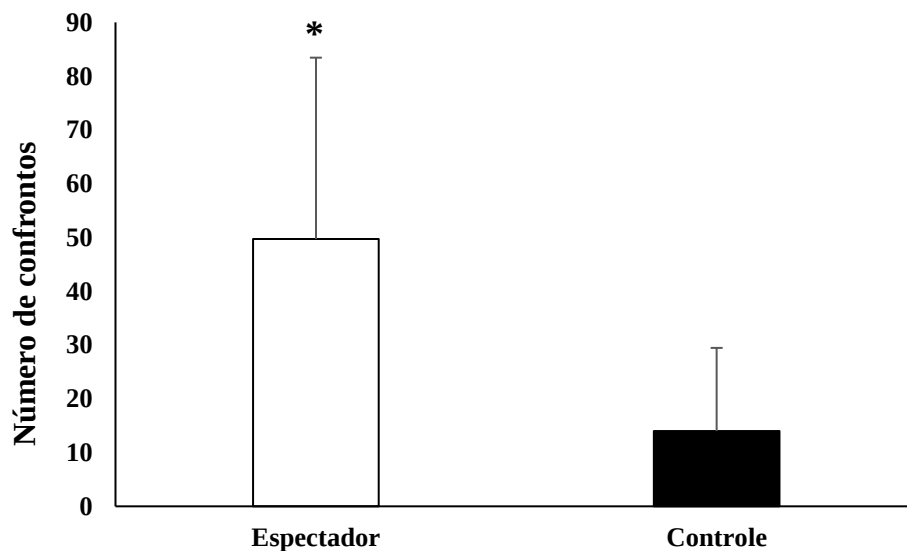


Figura 9 – Valores médios ($\pm \text{dp}$) do número de confrontos totais de peixes espectadores e controle deflagrados no teste do espelho. As médias diferiram estatisticamente (Teste t independente;

p<0,05).

Ainda, houve uma correlação linear negativa entre o número de confrontos do grupo (média dos dois dias avaliados) e o número de confrontos dos peixes espectadores (Pearson: $r^2 = 0,5442$; $p = 0,0367$), em que quanto menor o número de confrontos em um grupo, maior o número de confrontos deflagrados no teste do espelho pelo respectivo espectador (Figura 6).

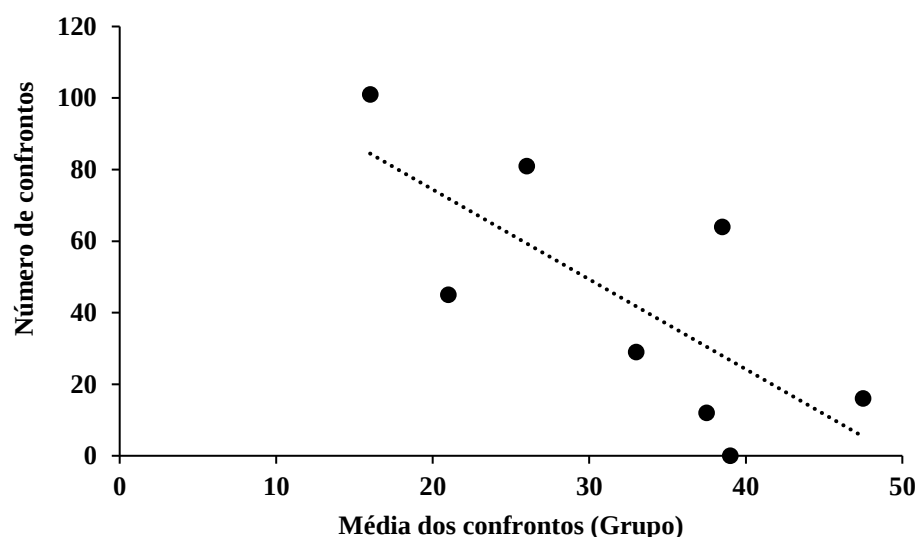


Figura 6 – Regressão linear entre a média de confrontos dos grupos e o número de confrontos emitidos pelos respectivos indivíduos espectadores (Pearson: $r^2 = 0,5442$; $p = 0,0367$).

Houve também uma correlação linear negativa entre a média do número de confrontos dos peixes em grupos e a média das FVs basais dos peixes espectadores (dias 7, 14 e 21) ($r^2 = 0,4375$; $p = 0,0373$) (Figura 7), mas não houve diferença entre a média do número de confrontos dos grupos com a média das FVs pós estresse ($r^2 = 0,0001$; $p = 0,9773$). Ainda as médias das FVs basais de peixes espectadores e controle não diferiram estatisticamente.

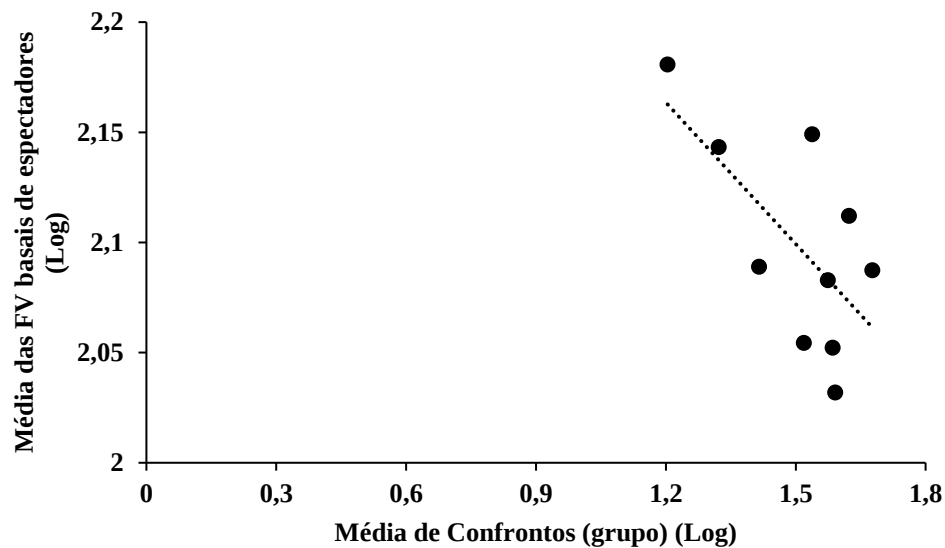


Figura 7 – Correlação negativa entre as médias de FV basais de peixes espectadores e a média dos confrontos apresentados pelos respectivos grupos. Os dados foram transformados utilizando a função Log (Pearson: $r^2 = 0,4375$; $p = 0,0373$).

Estudo 2 – A modulação da agressividade por influências sociais agressivas

4. Metodologia

4.1. Animais e Manutenção

Juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura, foram aclimatados em tanques de 310 L; 1 peixe/ 6 L antes dos procedimentos experimentais. A temperatura (28-30° C) e o fotoperíodo (12C:12E) foram mantidos constantes. Os tanques eram providos com aeração contínua e renovação de água constante. Os peixes eram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes (38% de proteína bruta) e o tanque sifonado a cada 15 dias para remoção de restos de alimento e fezes. Os níveis de nitrito e amônia foram mantidos abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente, para manutenção da qualidade da água.

4.2. Delineamento Geral

Para avaliar se diferentes níveis de agressividade em grupo influenciam o comportamento

agressivo de indivíduos espectadores, avaliamos a agressividade de indivíduos antes e após a observação de coespecíficos com altas ou baixas taxas de agressividade. Dessa forma, primeiramente isolamos indivíduos de tilápia-do-Nilo em aquários de vidro por 72 h. Após o período de aclimação, realizamos testes de mensuração agonística, através do teste do espelho. Em seguida, os animais foram divididos em 3 grupos, em que seriam expostos ou não, durante 4 dias consecutivos, a diferentes imagens de vídeo contendo coespecíficos nos seguintes contextos: 1) dois indivíduos em intensas interações agressivas; 2) dois indivíduos sem interações agressivas; e 3) controle, que não era exposto a nenhum tipo de estímulo. Após 24 h da última exposição, realizamos novamente um teste do espelho para mensurar a agressividade após o período de exposição visual. Para melhor visualização, o esquema do delineamento se encontra na Figura 8.

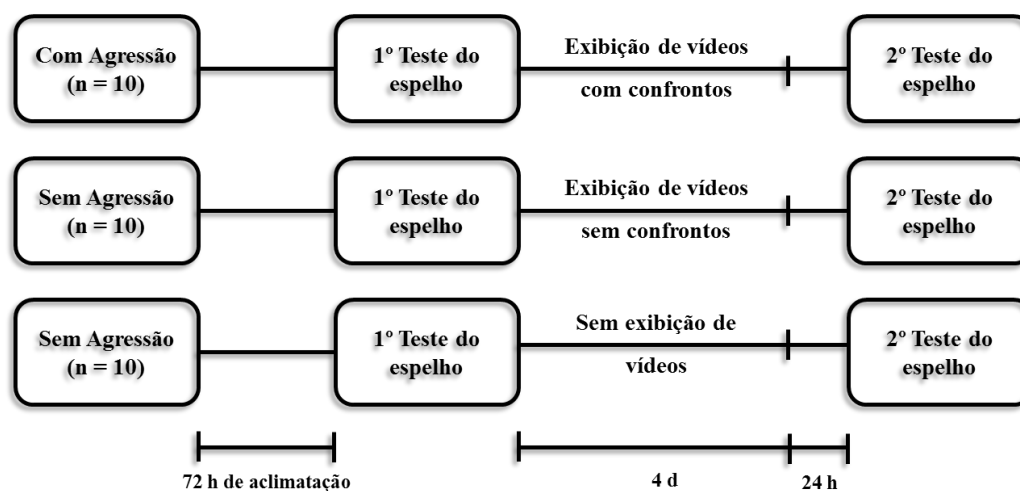


Figura 8 – Esquema do delineamento experimental.

4.3. Procedimentos específicos

4.3.1. Produção dos vídeos-estímulo

Para a produção dos vídeos que serviriam de estímulo aos peixes experimentais, utilizamos adultos de tilápia-do-Nilo. Foram isolados 8 indivíduos em aquários de 40 cm x 20 cm x 25 cm por

48 h e colocados em pares em aquários “arenas” do mesmo tamanho que os aquários de isolamento. Em seguida, os peixes foram filmados por 10 min para registro das interações agonísticas. Para fins de padronização, selecionamos um mesmo par de peixes que serviria de modelo tanto para o tratamento que foi exposto aos pares sem interação agressiva física, quanto os que foram expostos a tal interação. Para isso, editamos a filmagem, selecionando cenas com ou sem interação agressiva, com duração total de 5 min.

4.3.2. *Teste do espelho*

Para o teste do espelho, os peixes dos 3 tratamentos foram aclimatizados individualmente em aquários de 40 cm x 20 cm x 25 cm por 72 h. Após isso, realizamos o primeiro teste do espelho. O segundo teste foi realizado 24 h após o término do período de exposição dos vídeos-estímulo ou não, para cada tratamento.

Para esse teste, colocamos um espelho justaposto ao aquário, sendo escondido por uma folha branca de papel. No momento em que a folha foi retirada, registramos durante 5 min os comportamentos agressivos emitidos por cada indivíduo. Analisamos a latência para início de comportamentos agressivos (intervalo de tempo entre a exposição do espelho ao peixe e o início de interações agonísticas), o número de mordidas (interação frontal, com aberturas da boca), o número de investidas (interação frontal, sem aberturas da boca) e o número de confrontos laterais (o peixe se dispõe lateralmente ao espelho e emite ondulações corporais) emitidos contra o espelho. O presente etograma foi adaptado de Alvarenga & Volpato (1995).

4.3.3. *Exibição dos vídeos modelo*

Após 24 h do primeiro teste do espelho, dois dos grupos experimentais foram submetidos a exposição das imagens produzidas, a partir de um *tablet* (19 cm x 11,5 cm) posicionado horizontalmente, durante 10 min. Por mais 3 dias consecutivos, repetimos a exposição, totalizando em 4 dias de estímulo.

4.3.4. *Análise de dados*

Inicialmente para avaliar se os dados possuíam distribuição normal e homocedasticidade,

utilizamos os testes de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e Levene ($p > 0,05$), respectivamente. Dessa forma, constatando a distribuição não normal ou não homocedástica dos dados de latência para início de confrontos, número de mordidas, número de investidas, número de confrontos laterais e número de confrontos totais, realizamos a transformação dos mesmos utilizando a função Log. Mesmo assim, ainda os dados apresentaram distribuição não normal e portanto, utilizamos testes paramétricos (ANOVA de medidas repetidas, utilizando o tempo como medida repetida), restringindo o nível de significância de 0,05 para 0,01.

5. Resultados

Não obtivemos diferenças estatísticas quanto ao tempo de latência para início dos confrontos entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas: $df = 2$; $F = 1,69$; $p = 0,2108$) (Figura 9).

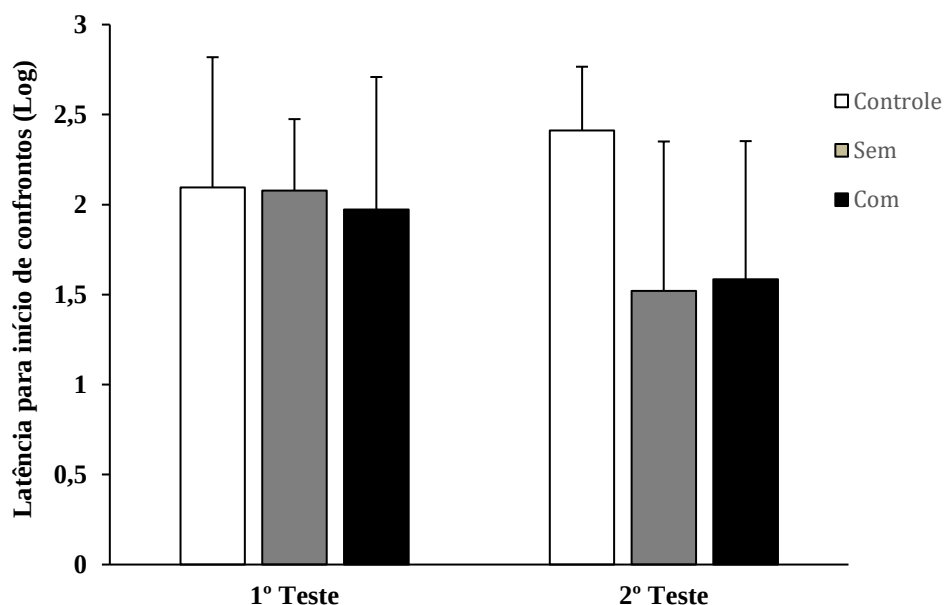


Figura 9 – Latência para início de confrontos agressivos (s). Valores médios transformados utilizando a função Log ($\pm dp$). Não houve diferença estatística entre tratamentos (ANOVA de medidas repetidas; $p > 0,01$).

Além disso, em relação aos confrontos deflagrados, obtivemos diferenças quanto ao número de mordidas (ANOVA de medidas repetidas: $df = 2$; $F = 5,45$; $p = 0,0140$), em que no 2º teste do

espelho, o número de mordidas do grupo Sem agressão foi estatisticamente maior que o do grupo controle (Fisher-LSD: $p = 0,0097$) (Figura 10).

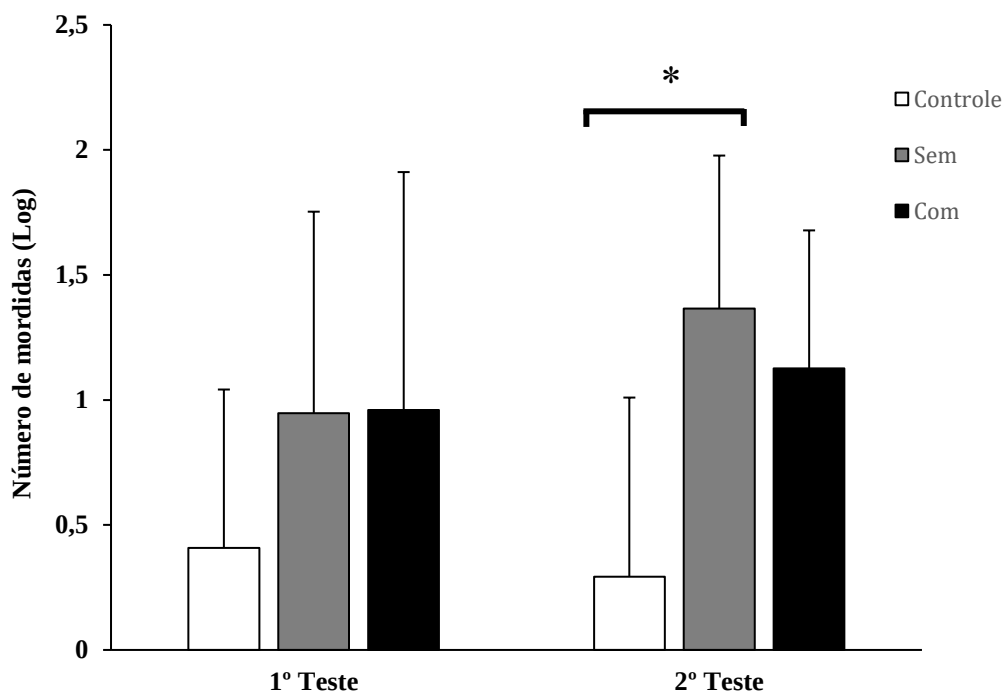


Figura 10 – Valores médios transformados utilizando a função Log ($\pm dp$) dos números de mordidas nos dois testes do espelho. Diferença estatística indicada pela barra contendo asterisco (ANOVA de medidas repetidas; $p < 0,01$).

Quando avaliamos o número de investidas, não obtivemos diferenças significativas ao longo do tempo e nem entre tratamentos (ANOVA de medidas repetidas: $df = 2$; $F = 1,86$; $p = 0,1843$) (Figura 11).

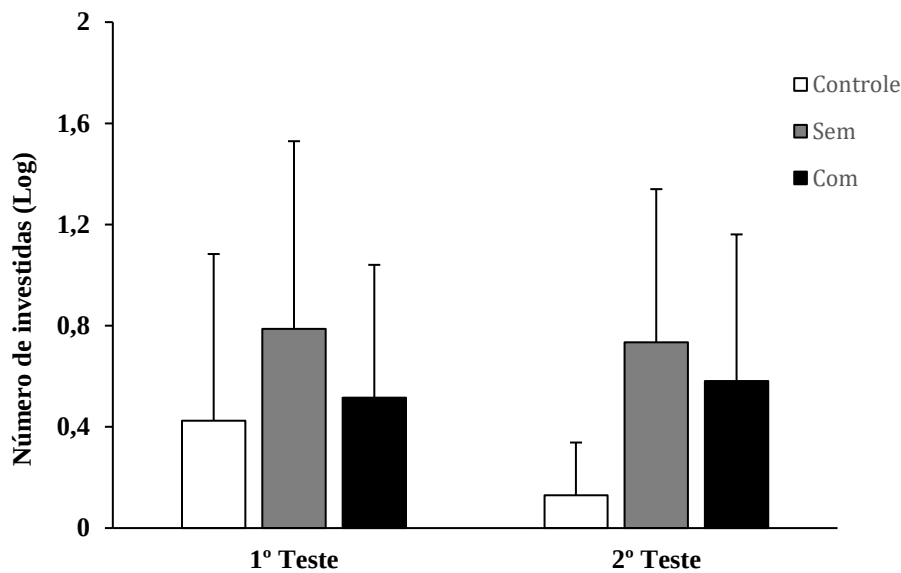


Figura 11 – Número de investidas nos dois testes do espelho. Não obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $p > 0,05$).

Por fim, quando avaliamos o número de confrontos laterais, obtivemos diferenças entre tratamentos (ANOVA de medidas repetidas: $df = 2$; $F = 5,19$; $p = 0,0165$). Neste, o número de confrontos laterais deflagrados pelo grupo controle, nos dois dias de testes, foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo que observou coespecíficos em confrontos agressivos no 2º teste do espelho (Fisher-LSD: Controle 1º Teste x Com 2º Teste, $p = 0,0066$; Controle 2º Teste x Com 2º Teste, $p = 0,0035$) (Figura 12).

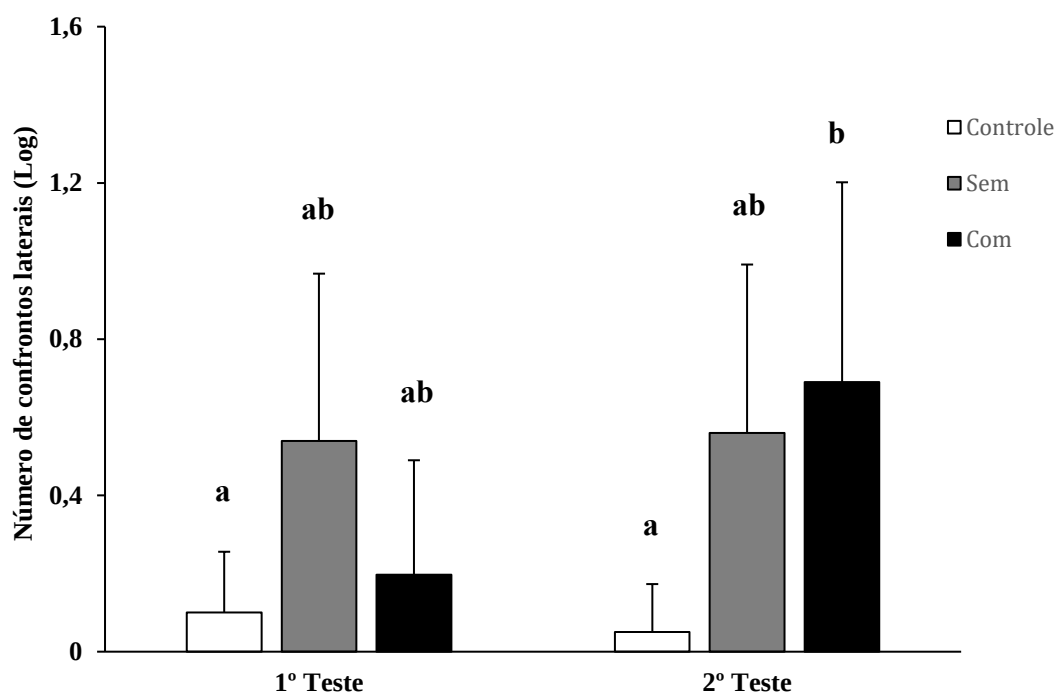


Figura 12 – Número de confrontos laterais deflagrados nos dois testes do espelho. Letras indicam diferenças entre tratamentos e ao longo do tempo (ANOVA de medidas repetidas; $p < 0,01$).

Além disso, quando realizamos a somatória dos confrontos (mordidas, investidas e confrontos laterais), obtivemos diferenças entre tratamentos (ANOVA de medidas repetidas: $df = 2$; $F = 5,49$; $p = 0,0137$), em que no 2º teste do espelho, o grupo controle diferiu estatisticamente do grupo que observou coespecíficos sem agressão (Fisher-LSD: $p = 0,0081$) (Figura 13).

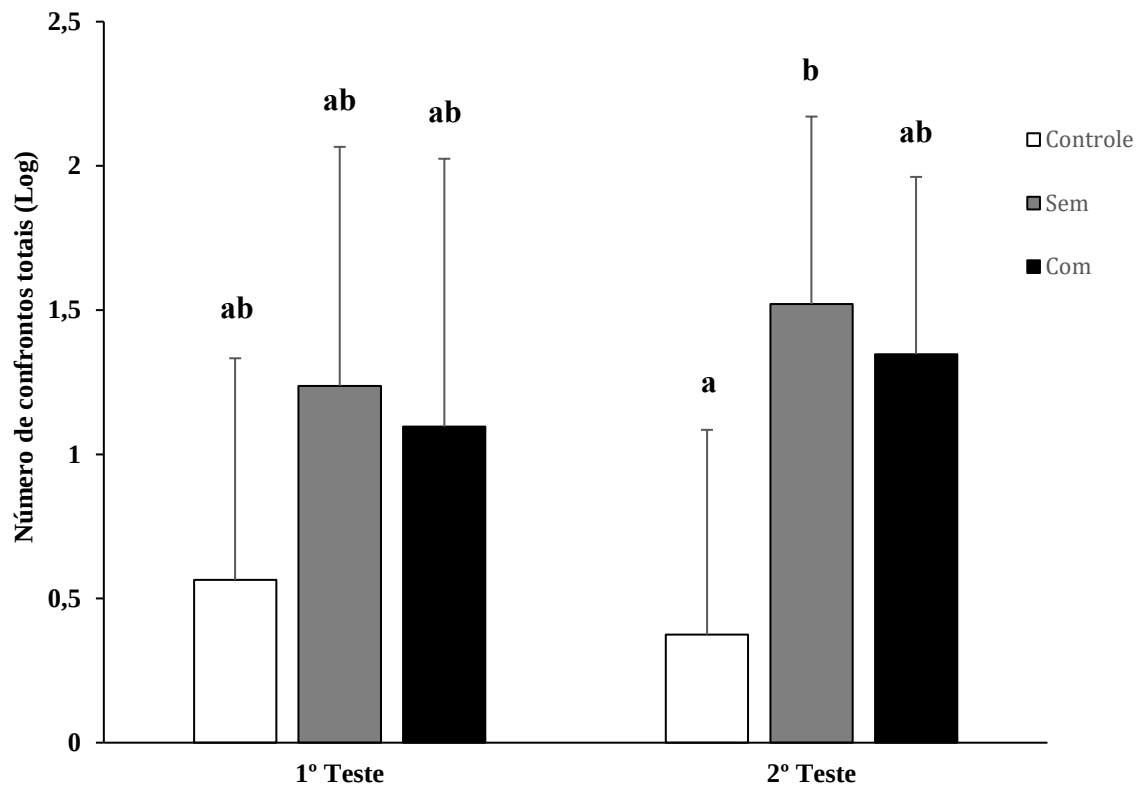


Figura 13 – Número de confrontos totais deflagrados nos testes do espelho. Letras indicam diferenças estatísticas (ANOVA de medidas repetidas, $p < 0,01$).

6. Discussão

Neste estudo observamos que, na tilápia-do-Nilo, influências sociais podem gerar diferentes respostas na recuperação de estresse, de acordo com o contexto em que o indivíduo espectador está inserido, com consequente modulação da agressividade. Dessa forma, mostramos que um contexto social pode influenciar positivamente na recuperação do estresse a ambientes desconhecidos, mas pode atuar contrariamente em situações em que há presença de estresse social, como quando o ambiente e o grupo já são familiares. Ainda, este contexto está relacionado a um aumento de agressividade individual, com modulação da mesma, de acordo com o nível de agressão do grupo experienciado. Este fenômeno é chamado de agressão deslocada e poderia representar uma estratégia de enfrentamento comportamental que modula respostas ao estresse.

O apoio social é descrito como um efeito positivo relacionado à presença de coespecíficos sobre situações que apresentam fatores de risco a indivíduos (Heinrichs et al. 2003). Em nosso estudo este evento ocorreu após o estresse de ambiente novo, onde a frequência ventilatória (FV) dos indivíduos que possuíam pistas visuais de um grupo de coespecíficos se apresentou menor quando comparada a de indivíduos isolados. Portanto, neste primeiro momento, o grupo promoveu um efeito atenuador nas respostas ao estresse do peixe espectador. Ambientes desconhecidos podem representar um contexto potencialmente perigoso e animais isolados estariam mais vulneráveis a riscos (Aryiomo & Watt, 2012). Dessa forma, sujeitos sociais se sentem seguros quando estão com outros coespecíficos, pois o agrupamento promove maior proteção ao indivíduo contra possíveis ameaças ambientais (Kikusui et al. 2006).

Entre os mamíferos, o fenômeno é bastante conhecido e já foi demonstrado que a presença de coespecíficos diminui a resposta ao medo (Kiyokawa et al. 2014; Fuzzo et al. 2015) e ao estresse (Smith & Wang, 2014). Em peixes, apenas foi mostrada a resposta de diminuição do medo à exposição de possíveis ameaças alertadas por substâncias de alarme, através da observação de comportamentos de *freezing*, realizados por indivíduos que possuíam sinais visuais ou químicos de coespecíficos (Faustino et al. 2017). Ainda, estes mostraram que os sinais visuais foram mais efetivos na diminuição de respostas relacionadas ao medo. Aqui, nossos resultados corroboram o estudo sobre a existência do fenômeno de apoio social em peixes, mostrando ainda, que os sinais visuais também são efetivos para diminuição de respostas fisiológicas ao estresse, como a

643 frequência ventilatória. A tilápia, assim como o *zebrafish*, é descrita como uma espécie diurna
644 (Toguyeni et al., 1997) e com isso, os sinais visuais são importantes vias para a detecção de risco
645 no ambiente (Oliveira & Faustino, 2017). Assim, as interações dos coespecíficos indicam pistas da
646 segurança ou de prováveis riscos do ambiente e assim, animais sociais acessam informações a
647 possíveis ameaças, adequando suas respostas a contextos dinâmicos (Oliveira & Faustino, 2017).

648 Apesar disso, nossos resultados mostram que nem sempre um grupo promove apoio social
649 em contextos de ameaça. Um outro fator, como a familiaridade do ambiente e entre indivíduos
650 pertencentes a um grupo devem ser considerados. Neste estudo, após a aclimatização com o
651 ambiente novo, e consequente alteração do contexto, surgiram outras respostas que podem ser
652 consideradas contrárias ao ‘apoio social’. Aqui, após outros eventos estressantes, como a
653 perseguição com rede utilizada neste experimento, os indivíduos já familiarizados com o ambiente
654 e com o grupo apresentaram recuperação prejudicada ao evento estressante quando comparados
655 aos indivíduos controle (Figura 6). No último dia de experimento, os indivíduos do grupo controle
656 se recuperaram mais rápido do evento estressante do que os indivíduos que visualizavam um grupo.
657 Isso pode indicar que o grupo influenciava na recuperação do estresse, promovendo um estresse
658 adicional aos indivíduos espectadores. Uma provável causa seria o estresse social, relacionado às
659 interações entre os coespecíficos em um grupo (Alvarenga & Volpato, 1995). Dessa forma, as
660 subsequentes respostas dos indivíduos espectadores obtidas neste estudo estariam relacionadas à
661 observação da performance agressiva e à estrutura hierárquica apresentadas pelos grupos,
662 característicos da espécie. A tilápia-do-Nilo é uma espécie territorialista, que apresenta hierarquia
663 de dominância e submissão estabelecida por confrontos agonísticos entre os indivíduos (Giaquinto
664 & Volpato, 1997). Assim, o estabelecimento e a manutenção hierárquica provocam uma situação
665 de estresse nos indivíduos envolvidos (Barcellos et al. 1999). Portanto, a conclusão de que um
666 grupo influencia positivamente na recuperação de estresse é restrita ao contexto de novidade em
667 que um indivíduo se encontra. Ainda, as características de interações sociais da espécie estudada
668 também são fatores importantes a serem levados em consideração.

669 Outra observação importante neste estudo, é a de que os peixes espectadores estavam
670 fisicamente isolados do restante do grupo e ainda assim apresentaram respostas comportamentais
671 relacionadas ao estresse social após um evento estressante, mas não em uma situação basal.

Geralmente, as interações físicas entre indivíduos que participam diretamente de um estabelecimento hierárquico, promovem estresse nos animais (Alvarenga & Volpato, 1995; Barcellos et al. 1999). Nossos resultados mostrando que as respostas de FV basais não diferiram entre os tratamentos, controle e espectadores, indicam que o contato físico pode ser importante para que ocorram influências do estresse social nos parâmetros comportamentais basais avaliados nos animais, como a FV. Ainda, o contato físico pode ser importante para que o indivíduo seja capaz de perceber sua inclusão e/ou posição em um grupo social. Neste estudo, os padrões de coloração da pele dos indivíduos de ambos os tratamentos se assemelhavam. Com isso, podemos discutir que o indivíduo espectador possuía percepção de que não participava diretamente do grupo, mesmo interagindo com indivíduos que se aproximavam dele. Em grupos que formam hierarquias, indivíduos subordinados têm concentrações basais elevadas de glicocorticoides, por conta das interações com indivíduos dominantes (Virgin & Sapolsky, 1997). Dessa forma, podemos considerar que os eventos de perseguição com rede simularam possíveis interações agressivas com o grupo e este contexto foi consolidado com as pistas visuais dos grupos no momento de recuperação, já que as FV pós estresse foram maiores nos indivíduos espectadores. Apesar disso, podemos inferir que houve influências visuais do ambiente social observado, por conta das respostas que obtivemos no estudo como um todo. Os indivíduos espectadores não responderam comportamentalmente diferentemente do tratamento controle, entretanto, seriam importantes mensurações hormonais para avaliação de possíveis alterações fisiológicas relacionadas ao estresse social em indivíduos observadores.

Ainda, quando avaliamos o experimento como um todo (Figura 7), observamos que no tratamento dos espectadores, a FV do Dia 1 não diferiu estatisticamente das médias Pós Estresse (P.E.). Apesar de serem consideradas estatisticamente “iguais”, esta estabilidade nas respostas deve ser analisada comparando os tratamentos. As respostas do tratamento controle indicam que um ambiente desconhecido pode ser mais estressante do que o estresse por perseguição com rede em ambiente já conhecido. Ainda, a presença do grupo influencia nos dois contextos: positivamente na recuperação do estresse em situação de ambiente novo, mas negativamente após estresse de perseguição com rede, provavelmente por conta do estresse social. O estresse pode ser definido como um estado de ameaça da perda da homeostase, ou seja, da manutenção da constância das condições corpóreas pelo organismo, por um estímulo aversivo denominado “estressor” (Chrousos

702 & Gold, 1992). Assim, as respostas desencadeadas por um indivíduo frente a um estressor são
703 adaptativas, pois auxiliam o organismo a retornar a seu estado inicial de homeostase. Dessa forma,
704 o organismo está adaptado a lidar com situações de estresse agudo, o qual é definido como
705 ocorrência recente e transitória de um único estressor, mas quando essa condição se torna
706 repetitiva/crônica, ou seja, como uma dificuldade constante enfrentada pelo indivíduo (Shields et
707 al., 2016), seus efeitos se multiplicam em cascata, podendo gerar consequências deletérias para o
708 organismo quando a homeostase não é reestabelecida. Nesse caso, o organismo entra em um estado
709 alostático, em que há a atividade alterada e sustentada de níveis de mediadores primários
710 relacionados ao estresse, como por exemplo glicocorticoides, com consequentes respostas
711 fisiológicas e comportamentais em resposta a mudanças ou desafios ambientais (McEwen &
712 Wingfield, 2003). Em nosso estudo, podemos discutir que o indivíduo isolado foi mantido em um
713 contexto favorável à recuperação dos estresses agudos de perseguição com rede, já que não
714 precisavam lidar com outras ameaças no ambiente. Ao passo que os animais em grupo
715 necessitavam também lidar com o estresse social, que poderia representar um ambiente estressor
716 crônico ao organismo, gerando um efeito alostático. Este parece então influenciar e se sobrepor ao
717 estresse de perseguição com rede. Nesse contexto, o estabelecimento e constante manutenção
718 hierárquica do grupo pode ter promovido um ambiente que gerou estresse social nos indivíduos
719 espectadores, promovendo estresse crônico e prejudicando a recuperação do estado de homeostase.
720 Dessa forma, as respostas de FV após o estresse nos indivíduos indicam que estes podem ocorrer
721 como mecanismos de alostasia, em que são necessários ajustes comportamentais como meio de
722 promover ajustes fisiológicos, buscando a homeostase do organismo.

723 Outra consequência do ambiente social foi o aumento do nível de agressão de indivíduos
724 espectadores. Entre os efeitos mais característicos do estresse social está uma elevação
725 generalizada e sustentada do metabolismo, com liberação de neurotransmissores envolvidos no
726 controle de uma série de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse, como a liberação de
727 glicocorticóides e hormônios peptídicos, com inibição do apetite e agressão (De Pedro et al., 1998;
728 Hoglund et al., 2002; Larson & Summers, 2001; Øverli et al., 1998, 1999; Winberg & Nilsson,
729 1993; Winberg et al., 1997). Dessa forma, um contexto estressante pode motivar o surgimento de
730 comportamentos que induzem a diminuição do estresse, em que há diminuição da secreção de
731 glicocorticoides e consequente diminuição de respostas fisiológicas relacionadas ao estresse

(Virgin & Sapolsky, 1997). Estes são chamados de comportamentos de deslocamento e abrangem autoindução de alimentação, ingestão de água e até aumento de deflagração agressiva (Overli et al, 2004). Neste estudo podemos observar que, após o período de convivência com os grupos, sob influência de estresse social, os indivíduos espectadores aumentaram o nível de agressividade quando comparado aos indivíduos controle. Este comportamento pode ser chamado de agressão deslocada e possui mecanismos comportamentais e neuroendócrinos evolutivamente conservados entre os vertebrados (Overli et al, 2004).

A agressão deslocada também pode estar relacionada à correlação negativa que obtivemos entre o número de confrontos dos grupos com o número de confrontos de seu respectivo indivíduo espectador: quanto menor o número de confrontos do grupo observado, maior os confrontos dos espectadores quando expostos em conflito com um espelho. A variação da quantidade de agente causal do estresse social em cada contexto (agressão entre indivíduos dos grupos) proporcionou uma variação de respostas comportamentais e fisiológicas apresentadas pelos indivíduos espectadores, com modulação da agressividade de acordo com o nível de agressão presenciado. Estas respostas teriam ação compensatória e/ou adaptativa, provendo a estes animais a possibilidade de superar as prováveis ameaças encontradas no ambiente (Wendelaar-Bonga, 1997). Outro resultado que complementa esta observação é a correlação negativa entre o número de confrontos do grupo e a FV basal dos peixes espectadores. Aqui, maiores FV estão correlacionadas a menores quantidades de conflitos nos grupos. Em peixes, a oxigenação do sangue pelo aumento da frequência ventilatória pode ser um importante ajuste para preparação do organismo a uma atividade repentina, como luta ou fuga (Rupia et al. 2016). Estes então, podem ser fatores importantes para respostas comportamentais de tomadas de decisão, moduladas pelo contexto apresentado. Tais respostas podem indicar inferências sobre o contexto agressivo dos coespecíficos. Este fenômeno pode ser chamado de inferência transitiva (*Transitive Inference*), em que indivíduos realizam inferências sobre confrontos e hierarquia de coespecíficos, aumentando as chances de vitórias em confrontos posteriores (Grosenick et al. 2007). Isto representa que o indivíduo espectador, mesmo separado fisicamente do grupo, consegue inferir características agressivas em um grupo e avaliar a probabilidade de ganhar um conflito. Dessa forma, em nossos experimentos, quando houve o momento de enfrentamento, representado pelo teste do espelho, o animal modulou seu comportamento agressivo baseado nas experiências observacionais recentes.

Assim, a inferência de confrontos pode otimizar o processo de tomada de decisão do indivíduo, aumentando suas chances de sobrevivência (Rutte et al. 2006).

A capacidade de classificar ou reconhecer a dinâmica social de membros de um grupo de acordo com parentesco, filiação e dominância é uma adaptação importante à vida em grupos sociais. Esse conhecimento sobre terceiros é a base para prever mudanças na hierarquia de dominância, e para detectar oportunidades de acasalamento (Seyfarth & Cheney, 2015). Além disso, observar e entender estas interações permite que os espectadores façam inferências sobre o status dos concorrentes ou parceiros de cooperação, o que, por sua vez, facilita a antecipação de resultados das interações futuras. Tal conhecimento é importante para tomada de decisão e foi documentado em uma ampla gama de espécies, como em aves (Massen et al. 2014), primatas (Kitchen et al. 2005) e outros mamíferos, como hienas (Engh et al. 2005). Esta habilidade ainda é vista em peixes, os quais, são capazes de inferir o nível social de indivíduos em grupo através da observação das interações (Grosenick, et al. 2007). O nosso segundo estudo também corrobora este feito avaliativo que o espectador tem em relação ao grupo social. Quando controlamos as variáveis ‘níveis de agressividade’ no estudo onde o estímulo social apresentava-se em vídeo, mostramos que ainda sim, a agressividade total aumenta quando os coespecíficos observados não apresentam comportamentos agressivos.

Ainda, quando avaliamos separadamente os componentes dos confrontos, o item ‘número de confrontos laterais’ apresentou-se maior em espectadores que observaram coespecíficos com altas taxas de agressão. No vídeo exibido, os coespecíficos interagiam apenas com confrontos bucais (mordidas) e não houve estabelecimento de hierarquia. Portanto este nosso resultado pode representar que houve um efeito avaliativo pelo espectador, com modulação de estratégia de interações. Aqui, a estratégia para vencer a briga poderia ser a mudança de *display* agressivo, já que no vídeo apresentado, os coespecíficos interagiam apenas com um tipo de comportamento agressivo e não houve vitória. Além disso, com este estudo também mostramos que a inferência transitiva pode ocorrer por influências virtuais. Dessa forma, nossos resultados com a metodologia de reprodução de vídeos são comparáveis aos resultados com o estímulo do grupo social real. Isto poderia estar relacionado às características sensoriais da espécie utilizada. A tilápia é uma espécie diurna e com isso possui a visão como uma das principais modalidades sensoriais desenvolvidas

(Enquist et al. 1987). A metodologia de exibição de vídeos e animações já foi utilizada em pesquisas anteriores sobre comportamento e cognição de peixes (Kodric-Brown & Nicoletto, 1997; Landmann et al. 1999; Gonçalves et al., 2000; Trainor & Basolo, 2000; Schluessel et al. 2015; Schluessel et al. 2018), mostrando ser um procedimento eficiente. Tal abordagem pode ser vantajosa, pois permite fácil manipulação do estímulo visual. Por exemplo, pode-se controlar a velocidade dos movimentos e coloração dos animais (Rowland, 1999).

Considerações Gerais

Nossos estudos demonstram que as influências sociais dependem das características do agrupamento social da espécie e das relações apresentadas. Dependendo das circunstâncias, as interações sociais podem ser uma fonte de estresse ou fornecer um amortecedor contra o mesmo. A maioria dos estudos sobre as influências sociais sobre o estresse concentrou-se nos aspectos negativos e indutores de estresse na interação social. De fato, resta pouca dúvida de que exposição crônica ao estresse psicossocial altera a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e compromete saúde física e mental em humanos e outros animais. Neste caso, as vias ativadas evocam alterações nas funções metabólicas e celulares, promovendo distúrbios osmorregulatórios e alterações na função imune (Nardocci et al. 2014). No entanto, mesmo em relações hierárquicas, que tendem a ser mantidas através de displays e confrontos, há evidências de que a interação social positiva pode modular a função do eixo HPA (Virgin & Sapolsky, 1997). Estas apontam que machos dominantes que apresentam padrões positivos de afiliação social com fêmeas e a prole do grupo, apresentam baixos níveis basais de glicocorticoides relacionados ao estresse. Assim, destacamos a necessidade de aprofundamentos em estudos sobre relações sociais para se avaliar o papel do grupo social como agente estressor ou aliviador.

Acreditamos que nossos resultados possam estimular o concebimento de mais estudos sobre o efeito do apoio social modulando o desenvolvimento individual, utilizando peixes como modelo experimental. O peixe é um modelo animal que possui mecanismos neurais menos complexos que mamíferos e, investigando aspectos de influências sociais, pode-se estabelecer um conhecimento mais geral e evolutivamente conservado da influência dos grupos sociais como apoiadores no desenvolvimento individual e na manifestação de comportamentos ao longo da vida. Resolver os desafios adaptativos ligados à vida em grupo requer mecanismos para manter a coesão e modular

o estresse social entre os membros do grupo.

7. Referências

Alcock, J. (2011). *Comportamento Animal: uma abordagem evolutiva*. Porto Alegre, Artmed, 9º edição, 606p.

Alexander, R.D. (1974). The evolution of social behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5, 325-383.

Alvarenga, C.M.D., Volpato, G.L. (1991). Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology and Behavior*, 57(1), 75-80.

Alvarenga, C.M.D., Volpato, G.L. (1995). Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology Behavior* 57, 75-80.

Aryiomo, T.O., Watt, P.J. (2012). The effect of variation in boldness and aggressiveness on the reproductive success of zebrafish. *Animal Behaviour*, 83, 41-46.

Balzarini, V., Taborsky, M., Wanner, S., Koch, F., Frommen, J.G. (2014). Mirror, mirror on the wall: the predictive value of mirror tests for measuring aggression in fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology*.

Barbosa, A.C., Ferreira, P.M.F., Souza, R.N., Barbosa, J.M. (2009). Avaliação da taxa metabólica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista brasileira de engenharia de pesca*, 4(2), 46-55.

Barcellos, L. J. G., Nicolaiewsky, S., de Souza, S. M. G., Lulhier, F. (1999a). The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research*, 30(11-12), 887–892.

Barcellos, L. J. G., Nicolaiewsky, S., de Souza, S. M. G., Lulhier, F. (1999b). Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) superimposed to chronic stress. *Aquaculture Research*, 30, 437-444.

- Barcellos, L. J. G., Woehl, V. M., Wassermann, G. F., Quevedo, R. M., Ittzés, I., Krieger, M. H. (2001). Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture Research*, 32, 121-123.
- Barki, A., Volpato, G.L. (1998). Early social environment and the fighting behaviour of young *Oreochromis niloticus* (pisces, cochlidae). *Behaviour*, 135, 913-929.
- Barreto, R.E., Luchiari, A.C., Marcondes, A.L. (2003). Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naive Nile tilapia. *Behavioural Processes*, 60, 235-239.
- Barreto R.E., Volpato G.L. (2004). Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioral Processes*, 66, 43–51.
- Beeching, S.C. (1992). Visual assessment of relative body size in a cichlid fish, the oscar, *Astronotus ocellatus*. *Ethology*, 90(3), 177-186.
- Boscolo, C. N. P., Morais, R. N., Gonçalves-de-Freiras, E. (2011). Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. *Applied Animal Behaviour Science*, 135, 154–159.
- Brockmark S., Adriaenssens B. & Johnsson J.I. (2010). Less is more: density influence the development of behavioural life skills in trout. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 3035–3043.
- Cohen, S., Wills, T.A. (1985). Stress, social support, and buffering hypothesis. *Physiological Bulletin*, 98(2), 310-357.
- Chrousos, G., Gold, P. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders. *JAMA*, 267(9), 1244-1252.
- Doran, C., Bierbach, D., Laskowski, k.L. (2019), Familiarity increases aggressiveness among clonal fish. *Animal behavior*, 148, 153-159.

- Doutrelant, C., McGregor P.K. & Oliveira, R.F. 2001. The effect of an audience on intrasexual communication in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Behavioral Ecology*, 12, 283–286.
- Earley, R.L. (2010). Social eavesdropping and the evolution of conditional cooperation and cheating strategies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365, 2675–2686.
- Edgar, J. et al. (2015). Social buffering in a bird. *Animal Behavior* 105, 11–19.
- Ellis, T., James, J.D., Stewart, C., Scott, A.P. (2004). A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 65, 1233–1252.
- Engh, A.L., Siebert, E.R., Greenberg, D.A., Holekamp, K. (2005). Patterns of alliance formation and postconflict aggression indicate spotted hyenas recognize third-party relationships. *Animal Behaviour*, 69, 209–217.
- Enquist, M., Ljungberg, T., Zandor, A. (1987). Visual assessment of fighting ability in the cichlid fish *Nannacara anomala*. *Animal Behaviour*, 35, 1262–1264.
- Falsarella, L.N., Bandão, M.L. Gonçalves-de-Freitas, E. (2017). Fish adjust aggressive behavior to audience size with limited information on bystanders' fighting ability. *Behavioural Processes*. 142, 116–118.
- Falter, U. (1987). Description des padrons de coloration chez *Oreochromis niloticus* (L.) (Teleostei: Cichlidae). *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117 (2), 201–219.
- Faustino, A. I., Tacão-Monteiro, A., Oliveira R. F. (2017). Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Scientific Reports*, 7, 44329.
- Fernandes, M.O. (1997). Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 82p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista.
- Fuzzo, F. et al. Social buffering suppresses fear-associated activation of the lateral amygdala in male rats: behavioral and neurophysiological evidence. *Frontiers in Neuroscience*, 9,

896 1–8.

897 Giaquinto, P.C., Volpato, G.L. (1997). Chemical communication, aggression, and
898 conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiology and Behavior*, 62(6), 1333-1338.

899 Gonçalves, D.M., Oliveira, R.F., Körner, K., Poschadel, J.R., Schlupp, I. (2000). Using
900 video playbacks to study visual communication in a marine fish, *Salaria pavo*. *Animal Behaviour*,
901 60, 351–357.

902 Gonçalves-de-Freitas, E., Teresa, F.B., Gomes, F.S., Giaquinto, P.C., 2008. Effect of water
903 renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. *Applied Animal Behavior Science*. 112,
904 187–195.

905 Graves, F. C., Hennessy, M.B. (2000), Comparison of the effects of the mother and an
906 unfamiliar adult female on cortisol and behavioral responses of pre-and postweaning guinea pigs.
907 *Developmental Psychobiology*, 36, 91–100.

908 Grosenick, L., Clement, T. S., Fernald, R. D. (2007). Fish can infer social rank by
909 observation alone. *Nature*, 445(7126), 429-432.

910 Gross, M.R. & MacMillan, A.M. (1981). Predation and the evolution of colonial nesting in
911 bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 8, 163-174.

912 Heinrichs, M., Baumgartner, T., Kirschbaum, C., Ehler, U. (2003). Social support and
913 oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biological*
914 *Psychiatry*, 54, 1389–98.

915 Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals New York Academy of Sciences*.

916 Jobling, M. (1983). Effect of feeding frequency on food intake and growth of Arctic charr,
917 *Salvelinus alpinus* L. *Journal of Fish Biology*, 23, 177-185.

918 Johnsson, J.I., Winberg, S., Sloman, K.A. (2006). Social interactions. In *Fish Physiology:*
919 *Behaviour and Physiology of Fish*. Sloman, K., Balshine, S., Wilson, R. (eds.). San Diego,
920 Academic Press, 24th ed, p151.

- Kitchen, D.M., Cheney, D.L., Seyfarth, R.M. (2005). Male chacma baboons (*Papio hamadryas ursinus*) discriminate loud call contests between rivals of different relative ranks. *Animal Cognition*, 8, 1-6.
- Killen, S. S., Marras, S., Nadler, L., & Domenici, P. (2017). The role of physiological traits in assortment among and within fish shoals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 372(1727), 20160233.
- Kikusui, T., Winslow, J. T., Mori, Y. (2006). Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361 (1476).
- Kiyokawa, Y., Honda, A., Takeuchi, Y., Mori, Y. (2014). A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behavioral Brain Research*. 267, 189–93.
- Kodric-Brown, A., Nicoletto, P.F. (1997). Repeatability of female choice in the guppy: response to live and videotaped males. *Animal Behaviour*, 54(2), 369-376.
- Landmann, K., Parzefall, J., Schlupp, I. (1999). A sexual preference in the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Environmental Biology of Fishes*, 56, 325–331.
- Larson, E.T., O'malley, D.M., Mellonijr, R.H. (2006). Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 167, 94–102.
- Lucas, M.C., Johnstone, A.D.F., Priede, I.G. (1993). Use of physiological telemetry as a method of estimating metabolism of fish in the natural environment. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122, 822–833.
- Massen, J. J. M., Szípl, G., Spreafico, M., Bugnyar, T. (2014). Ravens intervene in others' bonding attempts. *Current Biology*, 24(22), 2733-2736.
- McEwen, B. S., Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43, 2-15.
- McGregor, P.K., Peake, T.M., (2000). Communication networks: social environments for

receiving and signalling behaviour. *Acta Ethologica*, 2, 71–81.

Merkle, J. A., Sigaud, M., Fortin, D. (2015). To follow or not? How animals in fusion-fission societies handle conflicting information during group decision making. *Ecology Letters*, 18(8), 799-806.

Miczek, K. A. (1974). Intraspecies aggression in rats: Effects of d-amphetamine and chlordiazepoxide. *Psychopharmacologia*, 39, 275–301.

Nardocci, G., Navarro, C., Cortés, P. P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B., Jara, P., Acuña-Castillo, C., Fernández, R. (2014). Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 40 (2), 531-538.

Nicol, C.J. (1995). The social transmission of information and behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 44, 79-98.

Oliveira, R.F. et al. (1998) Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B), Biological sciences*, 265, 1045–1049.

Oliveira, R. F., Faustino, A. I. (2017). Social information use in threat perception: Social buffering, contagion and facilitation of alarm responses. *Communicative & Integrative Biology*, 10(3), e1325049.

Pinto A., Oates J., Grutter A. & Bshary R. (2011). Cleaner wrasses *Labroides dimidiatus* are more cooperative in the presence of an audience. *Current Biology* 21, 1140–1144.

Rowland, W.J. (1999). Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. *Environmental Biology of Fish*, 56, 285–305.

Rupia, E.J., Binning, S.A., Roche, D.G., Lu, W. (2016). Fight-flight or freeze-hide? Personality and metabolic phenotype mediate physiological defence responses in flatfish. *Functional Ecology*, 85, 927-937.

Rutte, C., Taborsky, M., Brinkhof, M.W.G. (2006). What sets the odds of winning and losing? *Trends in ecology and evolution*. 21, 1.

- Schluessel, V., Kortekamp, N., Ortis-Cortes, J.A., Klein, A., Bleckmann, H. (2015). Perception and discrimination of movement and biological motion patterns in fish. *Animal Cognition*, 18, 1077–1091.
- Schluessel, V., Hiller, J., Krueger, M. (2018). Discrimination of movement and visual transfer abilities in cichlids (*Pseudotropheus zebra*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72, 61.
- Seyfarth, R. M., Cheney, D. L. (2015). Social cognition. *Animal Behaviour*, 103, 191-202.
- Shields, G., Sazma, M., Yonelinas, A. (2016). The effects of acute stress on core executive functions: A meta-analysis and comparison with cortisol. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 651-668.
- Smith, A. S., Wang, Z. (2014). Hypothalamic oxytocin mediates social buffering of the stress response. *Biological Psychiatry*, 76, 281–8.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83, 13-34.
- Stamps, J., Groothuis, T.G.G. (2010). The development of animal personality: relevance, concepts and perspectives. *Biological Reviews*, 85, 301-325.
- Székely, T., Moore, A.J., Komdeur, J. (2010). Social behaviour: genes, ecology and evolution. New York: Cambridge University Press.
- Tian, L., Preisser, E.L., Haynes, K.F., Zhou, X. (2017). Social buffering in a eusocial invertebrate: termite soldiers reduce the lethal impact of competitor cues on workers. *Ecology*, 98, 952–960.
- Toguyeni, A., Fauconneau, B., Boujard, T., Fostier, A., Kuhn, E.R., Mol, K.A., Franc, J., Baroiller, O. (1997). Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. *Physiology Behavior*, 62, 273–279.
- Trainor, B.C., Basolo, A.L. (2000). An evaluation of video playback using *Xiphophorus helleri*. *Animal Behaviour*, 59(1), 83-89.
- Turner, G.F., Huntingford, F.A. (1986). A problem for game theory analysis: assessment

and intention in male mouthbrooder contests. *Animal Behavior*, 34, 961–970.

Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G., Iwama, G. K. (1997). Metabolic Responses Associated with Confinement Stress in Tilapia: The Role of Cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116 (1), 89-95.

Virgin, C., Sapolsky, R. (1997). Styles of male social behavior and their endocrine correlates among low-ranking baboons. *American Journal of Primatology*, 42, 25 – 39.

Voipato, G. L., Frioli, P. M. A., Carried, M. P. (1989). Heterogeneous growth in fishes; Some new data in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and a general view about the causal mechanisms. *Boletim de Fisiologia Animal*, 13, 7-22.

Volpato, G.L. & Fernandes, M.O. (1994). Social control of growth in fish. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27, 797-810.

Wendelaar-Bonga, S. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591-625.

Wittig, R. M., Crockford, C., Weltring, A., Langergraber, K. E., Deschner, T., Zuberbühler, K. (2016). Social support reduces stress hormone levels in wild chimpanzees across stressful events and everyday affiliations. *Nature Communications*, 7, 13361.

Anexo

Ao longo do doutorado, tive a oportunidade de orientar alunos do curso de graduação em Ciências Biológicas, matriculados na disciplina de Comportamento Animal, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Nesta disciplina, a avaliação era referente à elaboração de um projeto e experimento, em relação aos canais de comunicação existentes entre os animais. Dessa forma, os alunos que estudariam sobre o canal visual me procuraram e juntos elaboramos um projeto que teria relações com o tema de minha tese. Assim, o projeto envolveria as influências sociais através de sinais visuais. Ainda, fomos além e nos questionamos se indivíduos menos complexos, como peixes, seriam capazes de realizar associações através da observação de terceiros, como ocorre em humanos. Com isso, o projeto foi intitulado “Aprendizagem de condicionamento por observação em peixes”. Mesmo já tendo coorientado alguns projetos de mestrado e bacharelado anteriores, esta experiência foi muito importante e enriquecedora. Eram alunos que realmente estavam iniciando a vivência científica e, com isso, foi necessário adequar a atenção aos mesmos e a todo o processo de planejamento e experimentação do projeto.

Aprendizagem de condicionamento por observação em peixes.

Introdução

Aprendizagem é uma mudança de comportamento que ocorre de acordo com as experiências vividas pelos indivíduos (Dill, 1983), das quais, quando aprendidas, passam a ser codificadas através da memória (Kandel et al., 2014). O desenvolvimento da memória e da aprendizagem nos animais são essenciais para a sobrevivência, auxiliando os indivíduos em atividades como forrageamento, fuga de predadores e busca por parceiros sexuais (Roy & Bhat, 2016). Além disso, a habilidade de memorização de experiências passadas permite organismos a responder de forma adequada a situações de risco (Braithwaite & Girvan, 2003; Dall et al., 2005).

A aprendizagem também pode ocorrer por meio do ambiente social. Animais respondem a presença de espectadores (“efeito de público”) alterando seu comportamento de acordo com o tipo de público e contexto social (Doutreland et al., 2001; Pinto et al., 2011). Dessa interação, os espectadores extraem informações, utilizando-as em subseqüentes interações com os mesmos

indivíduos (Oliveira et al, 1998; Earley, 2010). Dessa forma, a experiência no ambiente pode moldar a expressão de habilidades comportamentais (Stamps & Groothuis, 2010; Brockmark et al., 2010).

O armazenamento das informações que são adquiridas sem esforço consciente e que orientam o comportamento de modo inconsciente, é também a base do aprendizado de hábitos ou do condicionamento clássico (Kandel et al., 2014). Este último, é um processo de aprendizagem baseado nos efeitos “estímulo-resposta” sobre o sistema nervoso central de seres vivos, em que a associação aprendida entre estímulos biologicamente relevantes (estímulos incondicionados) e estímulos inicialmente neutros (estímulos condicionados) induz uma resposta condicionada (Lieberman, 2000).

O condicionamento clássico é utilizado em pesquisas que envolvem testes de questões cognitivas em diversas espécies de animais, principalmente em mamíferos (Steinmetz et al., 1986, 1989; Thompson, 1990; Kim et al., 1995; Freeman & Rabinak, 2004; Boele et al., 2010; Yang et al., 2015). Recentemente, o interesse na possibilidade de que peixes seriam capazes deste tipo de aprendizagem tem se intensificado. Estudos têm demonstrado que as habilidades cognitivas de peixes são bastante desenvolvidas (Bratland et al., 2010; Nilsson et al., 2007; Moreira & Volpato, 2004). Peixes desenvolvem comportamentos complexos baseados na percepção e análise do ambiente ao seu redor (Odling-Smee & Braithwaite, 2003a; Perera, 2004), utilizando pistas visuais e espaciais para gerar respostas antipredatórias (McCormick & Manassa, 2008) e de forrageamento (Braithwaite et al., 1996; Hughes & Blight, 2000), aumentando chances de sobrevivência (Odling-Smee & Braithwaite 2003).

Esse tipo de condicionamento ocorre quando o peixe experiencia o processo, que ocorre de uma relação entre dois estímulos (Lieberman, 2000). Entretanto, com base nas habilidades cognitivas e nas capacidades de percepção e análise do ambiente dos peixes, a aprendizagem pode ocorrer principalmente através da observação, como ocorre no ambiente social (Nicol, 1995) e os comportamentos de conformação, em que indivíduos tendem a adotar o comportamento que a maioria dos seus coespecíficos presentes exhibe (Webster & Ward, 2011). Dessa forma, testamos se a aprendizagem do condicionamento clássico pode ocorrer exclusivamente através da observação (sinais visuais) de coespecíficos que já realizam tal associação, em tilápia-do-Nilo. Para isso,

utilizamos a metodologia de exibição de vídeos, em que pudemos manipular o comportamento de um indivíduo “influenciador”, em que realizava tal condicionamento com luz e alimento durante vários dias. Essa metodologia é importante pois permite a exibição de um comportamento específico, sem haver interferências de comportamentos agressivos entre o indivíduo influenciador e o espectador.

Material e Métodos

Animais e Manutenção

Adultos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes de piscicultura, foram aclimatados por 30 dias em tanques de 500 L (1 peixe/ 6 L) antes do início dos experimentos. Os tanques possuíam aeração contínua, biofiltros e tubos de PVC usados como tocas pelos animais. A temperatura (28-30°C) e fotoperíodo (12C : 12E) foram mantidos constantes e os níveis de nitrito e amônia mantidos abaixo de 0,05 mg/L e 0,5 mg/L, respectivamente, para a manutenção da qualidade da água. Os peixes eram alimentados uma vez ao dia com ração comercial para peixes tropicais (38% de proteína bruta).

Delineamento Geral

Para avaliar se peixes aprendem através da observação de coespecíficos, utilizamos indivíduos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), divididos em 2 tratamentos: 1) Tratamento estímulo - peixes que observaram coespecíficos em processo de condicionamento clássico (N=12) e; 2) Tratamento controle - peixes que não passariam por qualquer estímulo (N=9).

Previamente aos experimentos, dois peixes foram utilizados como modelos, dos quais registramos com filmadoras o processo de condicionamento clássico com luz/alimento. Apenas as imagens de um dos peixes foram selecionadas para padronização, em que foi exibido um indivíduo já condicionado. Dessa forma, após a aclimação em aquários individuais, os vídeos foram exibidos aos peixes do tratamento estímulo duas vezes por dia, durante 10 dias seguidos. Após 24 h do término do período de exibição dos vídeos, os peixes foram testados quanto a aprendizagem da percepção prévia da ocorrência de um evento (recebimento de pellets de ração) após um estímulo

visual (acendimento de luz). Avaliamos a latência para início de movimentação após acendimento da luz e a movimentação nos indivíduos através da análise do cruzamentos de linhas desenhadas na parede dos aquários.

Procedimentos Específicos

Condicionamento dos peixes “influenciadores”

A estratégia básica consistiu em parear luz (CS) com uma recompensa (alimento). Para o condicionamento clássico utilizamos 2 indivíduos de tilápia-do-Nilo. Estes foram individualizados em aquários de vidro (40 cm x 20 cm x 25 cm) durante 48 h, sobre uma estante parcialmente revestida com lona preta em sua porção posterior, evitando que os animais percebessem a movimentação do pesquisador. O aparato para o procedimento de condicionamento consistia na utilização de luzes de LED vermelhas, dispostas a uma altura de 15 cm acima do centro dos aquários. Além disso, cada aquário possuía mangueiras com o bocal em uma das laterais para despejo do alimento que serviria de recompensa. Com isso, a luz era acesa por 30 s, após isso 1 pellet era despejado em alguma das laterais do aquário e a luz acendia por mais 30 s. Nessas condições, os condicionamentos eram feitos em 3 períodos do dia (manhã, meio do dia e à tarde), durante 10 dias consecutivos. Com os peixes devidamente condicionados, registramos o processo para exposição aos animais experimentais. Apenas a imagem de um dos dois peixes influenciadores foi exposto aos animais experimentais para fins de padronização.

Exposição dos vídeos de condicionamento aos espectadores

Os vídeos foram editados para que o processo do condicionamento fosse repetido durante 5 min. Dessa forma, o vídeo foi transmitido por um tablet (20 cm x 25 cm) e era disposto na lateral dos aquários no momento da exposição individual. O vídeo era transmitido individualmente, por 5 min, 3 vezes ao dia, durante 10 dias consecutivos.

Teste de aprendizagem

Após 24 h do 10º dia de exposição do vídeo (11º dia), foi realizado o teste de condicionamento clássico luz/alimento com cada indivíduo do tratamento que passou pelo estímulo dos vídeos. O objetivo deste teste seria de avaliar se houve a associação entre luz e alimento, apenas

pela observação das imagens exibidas pelo *tablet*. Assim, o processo (luz + recompensa) foi aplicado a estes indivíduos experimentais. Após 48 h, o teste foi repetido.

Análise de dados

Inicialmente para avaliar se os dados possuíam distribuição normal e homocedástica, utilizamos os testes de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e Levene ($p > 0,05$), respectivamente. Dessa forma, constatando a distribuição não normal e não homocedástica dos dados, utilizamos ANOVA de medidas repetidas, restringindo o nível de significância a 1%, para avaliar a latência para início de movimentação após acendimento da luz no teste de condicionamento e o número de quadrantes ultrapassados (movimentação) durante o teste.

Resultados

Não obtivemos diferenças estatísticas quanto ao tempo que o peixe leva para início de movimentação (latência) após acendimento da luz (estímulo) em nenhum dos dias de experimento, comparando os grupos controle e estímulo (ANOVA de medidas repetidas: $df = 1$; $F = 1,08$; $p = 0,3095$) (Figura 1).

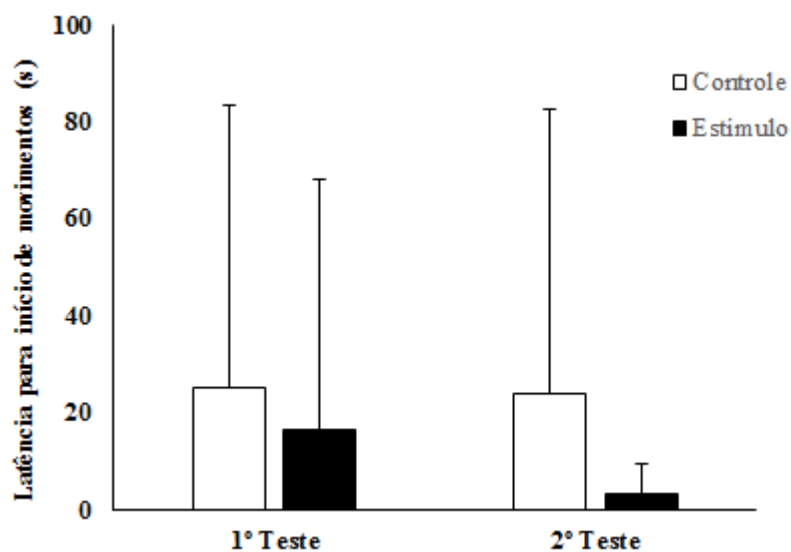


Figura 1 - Latência para início de movimentação após acendimento do estímulo (luz). Não houve diferença estatística entre os tratamentos (ANOVA de medidas repetidas; $p > 0,01$).

Ainda, não obtivemos diferenças quanto ao número de quadrantes ultrapassados (movimentação) durante o teste de condicionamento/aprendizagem (ANOVA de medidas repetidas: $df = 1$; $F = 2,17$; $p = 0,1570$) (Figura 2).

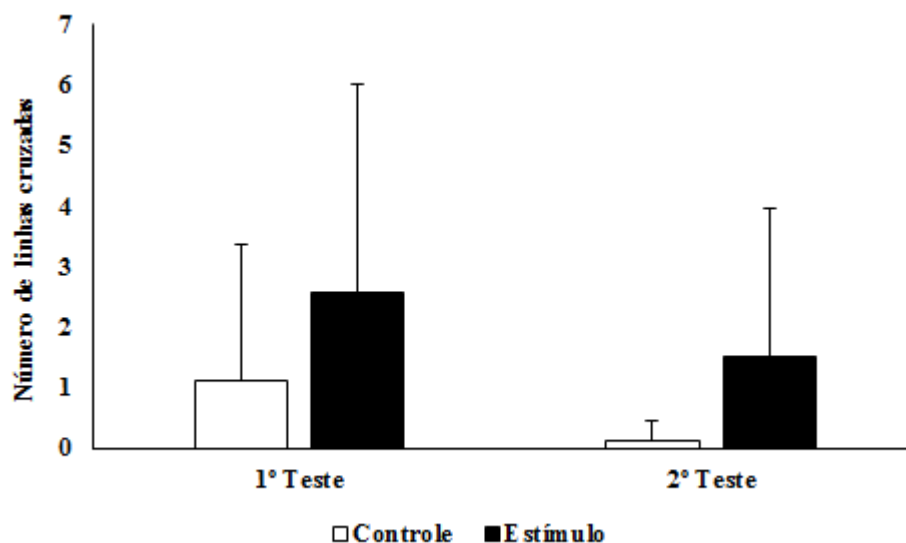


Figura 2 - Número de linhas cruzadas pelos peixes, representando a movimentação. Não houve diferença entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $p > 0,01$).

Discussão

Este estudo mostrou que peixes não realizam associações de aprendizagem clássica através da observação de terceiros. Aqui, realizamos um estudo inicial do processo, através da análise de latência para início de movimentação e a própria movimentação, quando o teste de condicionamento era realizado com os indivíduos espectadores, após a observação de vídeos contendo coespecíficos influenciadores. Com isso, podemos considerar este estudo como uma base para aperfeiçoamento de metodologias que futuramente avaliem de forma mais fidedigna o fenômeno proposto. Com base nos resultados apresentados, algumas correções ou alterações poderiam ser realizadas, como por exemplo, a realização de correções nos vídeos, aumento do número de indivíduos utilizados, e utilização de influenciadores reais.

Apesar dos aparelhos utilizados na metodologia serem projetados para utilização humana, diversos estudos mostram responsividade de animais a reproduções de vídeo com comportamentos de adaptação natural (Losos, 1985; Macedonia et al., 1994). Isso pode ocorrer porque pistas sem cor, como formato ou movimento, fornecem informações suficientes para compensar as informações incorretas de cor ou porque a cor não estava tão incorreta na aparência que eliminava a resposta (Fleishman et al, 1998). Dessa forma, como em nosso estudo a coloração não é prioridade, podemos considerar que a metodologia está adequada. Ainda, a reprodução de vídeo oferece algumas das vantagens da apresentação simulada, e é possível digitalizar video-sequências e manipulá-las em programas de edição de vídeo. Com essa técnica, é possível modificar praticamente todas as características visuais do estímulo, incluindo o movimento.

Além disso, a utilização de indivíduos reais como estímulo poderia ser considerada. Muito do que se sabe sobre comunicação visual em peixes vem da observação de sujeitos que interagem livremente, em que tais observações refletem o comportamento da espécie na natureza (Rowland, 1999). Com a utilização de influenciadores reais, poderíamos inicialmente confirmar nossa hipótese e, então com isso, testar se é possível a aprendizagem de processos associativos através de influências digitais.

Apesar de não obtermos diferenças estatísticas nas respostas entre os grupos controle e estímulo, acreditamos que o tema merece maior atenção. O fenômeno de que modelos de

comportamento aprendidos através de interações de terceiros ocorre em humanos (Graham-Bermann, 1998). Neste, comportamentos como agressão podem ser aprendidos por crianças na primeira infância e usados em situações próprias. Neste caso, a expressão destes comportamentos podem estar associados a transtornos de conduta, em que violam normas ou regras em sociedades humanas (American Psychiatric Association, 2003). Dessa forma, o estudo do fenômeno em animais menos complexos, como peixes, pode ser de suma importância para o estudo e entendimento deste processo em humanos. Por fim, consideramos importante futuros estudos sobre o tema.

Referências

American Psychiatric Association. (2003). Manual de Diagnostico Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV-TR). Porto Alegre: Artes Médicas.

Boele H., Koekkoek S., De Zeeuw C. (2010). Cerebellar and extracerebellar involvement in mouse eyeblink conditioning: the ACDC model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, 1-13.

Bratland S., Stien L., Braithwaite V., Juell J., Folkedal O., Nilsson J., Oppedal F., Fosseidengen J., Kristiansen T. (2010). From fright to anticipation: using aversive light stimuli to investigate reward conditioning in large groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*, 18(6), 991-1001.

Braithwaite V.A., Armstrong J.D., McAdam H.M., Huntingford F.A. (1996). Can juvenile Atlantic salmon use multiple cue systems in spatial learning? *Animal Behavior*, 51(6), 1409-1415.

Braithwaite, V.A., Girvan J.R. 2003. Use of water flow direction to provide spatial information in a small-scale orientation task. *Journal of Fish Biology*, 63, 74-83.

Brockmark S., Adriaenssens B., Johnsson J.I. (2010). Less is more: density influences the development of behavioural life skills in trout. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 3035–3043.

Dall S.R.X., Giraldeau L-A., Olsson O., McNamara J.M., Stephens D.W. (2005).

1214 Information and its use by animals in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution*,
1215 20(4), 187-193.

1216 Dill, L.M. (1983). Adaptive Flexibility in the Foraging Behavior of Fishes. *Canadian*
1217 *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(4), 398-408.

1218 Doutrelant, C., McGregor P.K., Oliveira, R.F. (2001). The effect of an audience on
1219 intrasexual communication in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Behavioral Ecology*,
1220 12, 283–286.

1221 Earley, R.L. (2010). Social eavesdropping and the evolution of conditional cooperation and
1222 cheating strategies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365, 2675–2686.

1223 Fleishman L.J., McClintock W.J., D'Eath R.B., Brainard D.H., Endler J.A. (1998). Colour
1224 perception and the use of video playback experiments in animal behaviour. *Animal Behavior*, 56,
1225 1035–1040.

1226 Freeman J., Rabinak C. (2004). Eyeblick conditioning in rats using pontine stimulation as
1227 a conditioned stimulus. *Integrative Physiological Behavioral Science*, 39(3), 180-191.

1228 Graham-Bermann, S.A. (1998). The impact of woman abuse on children's social
1229 development: Research and theoretical perspectives. Em G. W. Holden, R. Geffner & E .F. N.
1230 Jouriles (eds.), *Children exposed to marital violence: Theory research and applied issues* (p. 21-
1231 54) Washington, DC:American Psychological Association.

1232 Hughes R.N., Blight C.M. (2000). Two intertidal fish species use visual association learning
1233 to track the status of food patches in a radial maze. *Animal Behavior*, 59 (3), 613-621.

1234 Kandel E., Schwartz J., Jessel T., Siegelbaum S., Hudspeth, A. (2014). Princípios de
1235 neurociências. 5th ed. Porto Alegre: McGraw-Hill-Education, pp. 1256-1273.

1236 Kim J., Clark R., Thompson R. (1995). Hippocampectomy impairs the memory of recently,
1237 but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. *Behavioral Neuroscience*, 109(2),
1238 195-203.

1239 Lieberman, D. (2000). Learning: Behavior and cognition. Belmont: Wadsworth.

- Losos J. B. (1985). An experimental demonstration of the species recognition role of Anolis dewlap color. *Copeia*, 1985, 905–910
- Macedonia J.M., Evans C. S., Losos J. B. (1994). Male Anolis lizards discriminate video-recorded conspecific and heterospecific displays. *Animal Behaviour*, 47, 1220–1223.
- McCormick M.I., Manassa R. (2008). Predation risk assessment by olfactory and visual cues in a coral reef fish. *Coral Reefs*, 27(1), 105-113.
- Moreira P., Volpato G. L. (2004). Conditioning of stress in Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*, 64(4), 961-969.
- Nicol, C.J. (1995). The social transmission of information and behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 44, 79-98.
- Nilsson J., Kristiansen T., Fosseidengen,J., Fernö A., van den Bos R. (2007). Learning in cod (*Gadus morhua*): long trace interval retention. *Animal Cognition*, 11(2), 215-222.
- Odling-Smee L., Braithwaite V. (2003). The influence of habitat stability on landmark use during spatial learning in the three-spined stickleback. *Animal Behaviour*, 65(4), 701-707.
- Oliveira R.F., McGregor P.K., Latruffe C. (1998). Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 265, 1045–1049.
- Perera T.B. (2004). Fish can encode order in their spatial map. *Proceedings of the Royal Society of London. B: biological sciences*, 271, 2131–2134.
- Pinto A., Oates J., Grutter A., Bshary R. (2011). Cleaner wrasses *Labroides dimidiatus* are more cooperative in the presence of an audience. *Current Biology* 21, 1140–1144.
- Rowland, W.J. (1999). Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. *Environmental Biology of Fish*, 56, 285–305.
- Roy T., Bhat A. (2016). Learning and memory in juvenile zebrafish: what makes the difference - population or rearing environment? *Ethology*, 122(4), 308-318.

1265 Stamps, J.A., Groothuis, T.G.G. (2010). The development of animal personality: relevance,
1266 concepts and perspectives. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 85, 301-
1267 325

1268 Steinmetz, J., Rosen D., Chapman, P., Lavond, D., Thompson, R. (1986). Classical
1269 conditioning of the rabbit eyelid response with a mossy-fiber stimulation CS: I. Pontine nuclei and
1270 middle cerebellar peduncle stimulation. *Behavioral Neuroscience*, 100(6), 878-887.

1271 Steinmetz, J., Lavond, D., Thompson R. (1989). Classical conditioning in rabbits using
1272 pontine nucleus stimulation as a conditioned stimulus and inferior olive stimulation as an
1273 unconditioned stimulus. *Synapse*, 3(3), 225-233.

1274 Thompson, R. (1990). Neural Mechanisms of Classical Conditioning in Mammals.
1275 *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 329(1253), 161-170.

1276 Webster, M. M., Ward, A. J. W. (2011). Personality and social context. *Biological Reviews*.
1277 86, 759–773.

1278 Yang Y., Lei C., Feng H. & Sui J. (2015). The neural circuitry and molecular mechanisms
1279 underlying delay and trace eyeblink conditioning in mice. *Behavioural Brain Research*, 278, 307-
1280 314.