



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

Caracterização de indivíduos hesitantes e ousados na tilápia-do-Nilo

Graziela Valença da Silva

Orientador: Dr. Gilson Luiz Volpato

Mestrado

**Botucatu-SP
2010**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências

Campus de Botucatu

Caracterização de indivíduos hesitantes e ousados na tilápia-do-Nilo

GRAZIELA VALENÇA DA SILVA

Orientador: Dr. Gilson Luiz Volpato

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
UNESP, Botucatu como
parte dos requisitos para
obtenção do título de
Mestre em Ciências
Biológicas, Área de
Concentração: Zoologia

**Botucatu-SP
2010**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Marly e Antônio, que
me apoiaram e incentivaram e por tudo que fizeram,
dentro e fora de seus alcances.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Gilson Luiz Volpato pela oportunidade que me concedeu, pelos ensinamentos sobre o fascinante mundo científico e principalmente pela confiança que depositou em mim. Expresso o meu maior agradecimento e meu profundo respeito.

Ao Professor e amigo Dr. Hugo Medeiros Garrido de Paula (in memorian) que foi quem me impulsionou ao trabalho com comportamento animal, sempre me incentivando a seguir em frente. A ciência perdeu um grande pesquisador. Você faz falta por aqui!

Aos meus pais Marly e Antônio e ao meu irmão Gabriel pelo apoio e incentivo e por acreditarem em mim. Amo vocês!

Aos meus familiares, principalmente as “Três Marias” da família: Sabrina, Nathália e Valderez. Obrigada por entenderem minha ausência nesses anos de vida acadêmica.

Ao pessoal do depto. de fisiologia: Luciana, Juninho, Janete, Meire, Hélio, Braz (Zuza), Eduardo (Popetar) e do depto. de Zoologia: Juliana Ramos e Hamilton por estarem sempre dispostos a ajudar no que for preciso. Em especial ao Antônio Carlos Tardivo pelo enorme auxílio técnico durante a execução dos meus experimentos e por sempre me fazer rir com suas piadas de “são paulino”.

À Selma Maria pela elaboração da ficha catalográfica.

À Dra. Percília C. Giaquinto e Dr. Rodrigo E. Barreto pelas dicas ao longo do mestrado.

Aos Professores do dpto. de fisiologia: Dra. Denize Sartori por me ensinar sobre análise de glicose plasmática, Dra. Maria José Queiroz (Zezé) pela sua simpatia, Dra. Sivia Nishida pelas dicas sobre cognição animal, e aos Dr. e Fernando Gomes e Helton Delício.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação: Luciene e Herivaldo por toda dedicação e auxílio.

Ao Guilherme Galvão pela inesquecível ajuda pessoal durante a 1ª fase do meu mestrado.

À querida amiga e companheira Patrícia Hoffmann (Pitot) pelo incentivo, apoio nas horas difíceis, por ouvir meus “chororôs”, por ter sempre uma palavra linda pra consolar e por ser a pessoa maravilhosa que é. Obrigada por TUDO!

À Fernanda Corbeira pela ENORME e essencial ajuda durante todo o meu projeto, por todo apoio, pelas horas compartilhadas dentro e fora do laboratório, pelas “filosofias de butecos” que sempre contribuíram significativamente para nossas pesquisas e amizade. Obrigada Ferzoca!

À Patrícia Mendes (Jorjão) e Bruna Talmelli: Só porque tenho por elas um apreço imenso!

Aos colegas de laboratório: Fernanda, Lara, Carla, Narayane (Azia), Vivian, Nilo (Nilinho), Thaís (Peteca), Thiago (Balboa), Dyeno, Renato (Retrato), Helena, Carol Colombo e Danielle pelo convívio e troca de experiências. Em especial a Lúgia por me acolher em sua casa no início do mestrado e por ser uma pessoa maravilhosa; ao Renato (cipó) pela amizade, simpatia e por toda ajuda que me deu e à Caroline Maia e Dani Victoratti pela atenção e grande ajuda nas correções.

Aos amigos zoólogos da “Cobra Criada”: Rafael Gregati (Xuxa), Gustavo Hirose (Japa) e Gilmar Neves. Em especial ao Xuxa que foi um dos primeiros amigos que fiz em Botucatu. Obrigada pela amizade, pelas dicas, caronas e companhia nas “filosofias de buteco”.

Aos “Kissasseiros” Marcio, Helan, Neto, João Paulo e Paulinho, pelos diversos momentos de descontração e “n festerês”.

Aos novos e velhos amigos da zoologia: Augusto Zanatta, (querido “Dangerous Mind”), Rafael (Gabi), Bruno (Pessoa), Vanessa Morishita, Fernando Yuldi, Armando, Rosângela, Andreli, Sabrina, Mateus, Fernanda Maciel e aos que já passaram por aqui: Ricardo (Nasia), Bruna Talmelli, Aline Benetti, Nathalia Giovanetti, e Juliano (Gaúcho), pela companhia aqui e ali.

As companheiras de República: Luciana, Thalita, Vanessa e as anteriores: Priscila, Fabiana (Himen), Milene e Evelise. Obrigada pela companhia meninas!

As meninas do trajeto Bauru-Botucatu: Juliana, Camila, Ana Paula, Dani e Adriana. O cansaço podia ser grande, mas as risadas eram garantidas!

Aos meus velhos amigos e companheiros de graduação que tanto adoro: Camilo Santos, Cesar Ornelas, Marcio Geretti (Freckles) e Ramon Bicudo, por continuarem presentes na minha vida.

Aos queridos da Psicologia Evolucionista: José Henrique, Altay e Marco pelas discussões sobre comportamento humano e pela companhia na viagem ao Chile durante a melhor discussão científica que já participei: “o legado de Darwin...” e ao Luiz Biondi pelos vídeos de uso de ferramentas e por ter sempre uma palavra inteligente e bonita a dizer (mesmo via msn!).

Aos meus amigos Bauruenses: Flávia, Luciana, Rafaella, Alexandre, Alice, Karla, Fernanda Caldeira, Marcelo Antunes e André Gardiolo, por compartilharem comigo muitas de minhas conquistas, alegrias e angústias.

A todos vocês meu muito obrigada!

Esse projeto teve suporte financeiro da CAPES

*A variação individual é a condição chave para a **EVOLUÇÃO!***
Baseado em Charles Darwin

...

Quem disse que tem que ser uma coisa ou outra?
Você pode ter raízes e asas!

Sumário

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Princípios Éticos.....	3
Introdução.....	4
ESTUDO 1.....	7
Material e Métodos.....	7
Manutenção dos Animais.....	7
<i>Identificação dos indivíduos hesitantes e ousados – Reação à novidade</i>	<i>7</i>
Resultados.....	9
ESTUDO 2.....	13
Material e Métodos.....	13
Seleção dos Animais.....	13
Teste do Espelho.....	13
Pareamento entre coespecíficos.....	14
Análise de dados.....	15
Resultados.....	16
ESTUDO 3.....	21
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	22
Discussão.....	25
Referências.....	31

Resumo

Nós identificamos percentuais de indivíduos que se distribuem no contínuo hesitação-ousadia na tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Avaliamos a reação de peixes isolados (100 peixes, 22.1 ± 5.9 g) a um objeto-estímulo introduzido subitamente no aquário. Dividimos a parede frontal do aquário em quatro regiões iguais, através de linhas externas verticais. Após isolamento por 24 h nesse aquário, assim que o peixe estava numa das duas extremidades, introduzíamos subitamente o objeto-estímulo (cilindro de PVC de 10 cm diâmetro) na extremidade oposta (~ 30 cm do peixe). Nos 5 min seguintes registrávamos: a) tempo para sair da região inicial; b) tempo para chegar à região do objeto-estímulo; e c) tempo em locomoção. Identificamos dois perfis extremos de resposta: permanência na região inicial (peixes hesitantes) e aproximação do objeto-estímulo em até 40 s (peixes ousados). Este critério resultou em 20% de indivíduos hesitantes, 29% de ousados e 51% de intermediários, sendo os peixes ousados os mais ativos. Esses perfis não tiveram associação com o sexo dos animais. Para testar a associação dos perfis hesitante e ousado com a agressividade, uma nova amostra de peixes foi avaliada (115 peixes) como descrito acima, porém 24h horas depois um segundo teste foi realizado, mas com outro objeto-estímulo introduzido no aquário. Os peixes considerados hesitantes ou ousados nos dois testes consecutivos foram submetidos à análise da agressividade. Esta foi avaliada através do teste do espelho (20 peixes de cada perfil) e pareamento entre coespecíficos (10 duplas de cada perfil). Os peixes ousados foram mais agressivos que os hesitantes. Em um terceiro estudo, esses peixes foram submetidos a estresse de confinamento por 30 min e o estresse foi avaliado pela mudança na frequência ventilatória e coloração do olho. Peixes ousados foram mais responsivos ao estresse. Concluimos que os perfis hesitante e ousado ocorrem na tilápia-do-Nilo, podendo ser identificados pela reação à novidade e estão associados aos níveis de agressão e responsividade ao estresse.

Palavras-chave: Personalidade, hesitante, ousado, *Oreochromis niloticus*, agressividade, estresse

Abstract

We identified percentage of fish in the shy-bold continuum in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). This was achieved from the reaction of isolated fish (100 fish, 22.1 ± 5.9 g) to a stimulus-object suddenly introduced into the aquarium. The frontal glass of the test aquarium was divided in four regions of same area by vertical lines outside the aquaria. After 24-h isolation in the test aquarium, when the fish was in one of the extremities of the aquarium, the stimulus-object (10-cm diameter PVC cylinder) was suddenly immersed into the aquarium in the opposite side (~ 30 cm from the fish). We registered in the next 5 min: a) latency to the fish exit from the initial area; b) time to reach the stimulus-object area; and c) time spent in locomotion. We could identify two extreme responses: staying in the initial area (fish considered shy) and approaching the stimulus-object in up to 40 s (bold fish). This criterion resulted in 20% shy, 29% bold and 51% intermediate fish, with the bold fish being more active. These profiles were not associated with fish sex. To test the association of shy and bold fish with aggression, these fish were identified in other sample (115 fish) as described above; 24 h later a second test was performed (but now with another object introduced). Fish considered shy or bold in these two consecutive testes were then tested for aggression. Aggression was evaluated by the mirror test (20 fish each profile) and also pairing with conspecific fish (10 pairs in each profile). Bold fish were more aggressive than the shy fish. In a third study, these fish were subjected to stress confinement for 30 min and stress evaluated in terms of changes in ventilation rate and eye color. Bold fish were the most responsive to stress. In conclusion, shy and bold profiles occur in the Nile tilapia, can be identified by reaction to a sudden stimulus and are associated with levels of aggression and responsiveness to stress.

Palavras-chave: Personality, shy, bold, Cichlidae, *Oreochromis niloticus*, aggressiveness, stress.

Princípios Éticos

Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos em pesquisa com animais e foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, Brasil (Protocolo nº: 53/08 – CEEA)

Introdução

Indivíduos de uma mesma espécie que são similares quanto à idade, tamanho e sexo podem consistentemente diferir um do outro em seus comportamentos (Wilson *et al.* 1994; Wilson 1998; Sih *et al.* 2004; Realé *et al.*, 2007). Há evidências que animais de diversos táxons exibem comportamentos que são consistentes ao longo do tempo e/ou situações e, desta maneira, podem apresentar certos padrões de “temperamento” ou “personalidade” (Réale *et al.*, 2007, Budaev, 1997).

Uma das dimensões consideradas em estudos da personalidade é o contínuo hesitação-ousadia (*shy-bold continuum*), que refere-se à propensão para correr riscos, especialmente em situações desconhecidas. Nesse contexto, os indivíduos podem ser classificados como ousados (do inglês *bold*) ou hesitantes (do inglês *shy*). Indivíduos hesitantes normalmente reagem à novidade reduzindo os níveis de atividade, retraindo-se ou tornando-se mais vigilantes, enquanto indivíduos ousados comumente se aproximam de novos objetos explorando-os, sendo mais ativos e se expondo mais ao perigo. (Wilson *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2007). A posição do indivíduo nesse contínuo tem consequências em seu sucesso adaptativo, influenciando na escolha de parceiros, sucesso reprodutivo (Godin & Dugatkin, 1996), comportamento anti-predatório, relações interespecíficas (Webster *et al.*, 2009), movimentação e uso do espaço (Fraser *et al.*, 2001), e também pode afetar a maneira como o animal reage a novas situações, como evita predadores, como investe em reprodução e interage socialmente (Realé *et al.*, 2000).

Variações individuais no grau de ousadia têm sido documentadas em uma variedade de táxons, incluindo peixes (Wilson *et al.*, 1993, Coleman & Wilson, 1998), aves (Verbeek *et al.*, 1999, Azevedo & Young, 2006), mamíferos (Svartberg, 2002, Svartberg & Forkman, 2002) e também alguns invertebrados, como aracnídeos (Johnson & Sih, 2007) e crustáceos (Briffa *et al.*, 2008). Em peixes, as diferenças de personalidade entre indivíduos da mesma espécie já foram descritas em Centrarquídeos (*Lepomis gibbosus*, Wilson *et al.* 1993; Coleman & Wilson, 1998), Poecilídeos (*Poecilia reticulata*, Budaev, 1997), Salmonídeos (*Onchorhynchus mykiss*, Sneddon, 2003; Wilson & Stevens, 2005) e Gasterosteídeos (*Gasterosteus aculeatus*, Webster *et al.*, 2009).

A sobrevivência de uma população depende, entre outras coisas, da variabilidade de seus indivíduos. Diferenças individuais no comportamento (como

hesitação ou ousadia) devem proporcionar meios pelos quais as populações podem se diferenciar. Assim sendo, o entendimento da natureza do contínuo hesitação-ousadia em novos contextos comportamentais é importante e integra critérios evolucionários e ecológicos no estudo do comportamento (Wilson & Stevens, 2005).

A capacidade de ajuste individual, em um contexto ecológico, compreende a habilidade de lidar com os desafios ambientais, e as estratégias individuais bem sucedidas podem melhor ajustar o indivíduo ao meio em que vive. É bem possível que as diferenças individuais nos traços de personalidade representem padrões do comportamento adaptativo que surgiram por meio da seleção natural em resposta a diferentes condições ambientais.

Assim, numa primeira etapa deste estudo, avaliamos uma técnica adequada para identificação desses perfis no ciclídeo tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus, 1758). Tendo em vista que as diferenças individuais na personalidade do animal podem refletir na sua reação a novas situações, avaliamos se o comportamento da tilápia frente a uma situação nova (não familiar) pode ser um sinalizador fidedigno dos perfis hesitante e ousado. Assim, os termos “ousado” e “hesitante” se aproximam mais do que realmente é visto e mensurado em tais experimentos (mede-se, geralmente, o tempo necessário para se aproximar de uma situação nova). Não usamos as traduções convencionais “corajoso” e “tímido”, pois não se baseiam nas variáveis operacionais comumente registradas. Dessas quantificações, é válido inferir que os indivíduos que demoram mais tempo para se aproximar do objeto novo foram, por algum motivo (medo, ansiedade etc.), mais hesitantes para se aproximarem, e os que demoraram menos, foram ousados (se aventuraram mais rapidamente a experimentar o novo estímulo). Uma vez identificados os perfis, avaliamos sua associação com níveis de agressividade e resposta ao estresse, que são dois componentes importantes na sobrevivência, bem como na organização social.

A agressividade foi escolhida pela sua íntima possibilidade de relação com os perfis investigados. Por exemplo, um peixe ousado se aproxima mais de novos estímulos, revelando maior potencial de exploração e menos restrição à novidade ambiental, o que pode influenciar seu potencial de luta. Além disso, grande variabilidade no perfil agressivo é relatada em peixes (Francis, 1990; Alvarenga & Volpato, 1995).

Em relação ao estresse, sabe-se que há grande variabilidade individual nessas respostas (Alvarenga & Volpato, 1995; Pottinger, 1994). A validade dessa associação

(Hesitação-Ousadia vs responsividade ao estresse) é também reforçada pela possibilidade de que indivíduos mais sensíveis a estímulos nocivos acumulem, ao longo da vida, experiências negativas tornando-os mais hesitantes frente a situações potencialmente perigosas (mudanças súbitas do ambiente, por exemplo). Sabe-se que as experiências adquiridas na ontogenia do organismo influenciam a resposta ao estresse (Schreck, 1981; Zayan, 1991) e padrões de agressividade (Barki & Volpato, 1998). Na medida em que os perfis de hesitação ou ousadia refletem experiências individuais, bem como podem ser o reflexo dessas experiências, a possibilidade de associação entre esses perfis e níveis de agressividade e de resposta a estressores é bastante plausível.

ESTUDO I – Identificação de indivíduos hesitantes e ousados na tilápia-do-Nilo

Material e Métodos

Manutenção dos Animais

Exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), foram mantidos em biotério por cerca de um mês antes da experimentação, onde permaneceram em tanques de 1000 L (1 peixe/6 L), com aeração constante, temperatura entre 24 e 26°C, pH entre 6,2 e 6,8, amônia < 0,04 ppm e fotoperíodo das 06:00 h às 18:00 h, sendo alimentados diariamente (5% da biomassa) com ração extrusada para peixes tropicais (36% PB).

Identificação dos indivíduos hesitantes e ousados – Reação à novidade

A estratégia básica consistiu em registrar a reação dos peixes a um objeto não-familiar (objeto estímulo) introduzido no aquário e, a partir dessas reações, definir um critério de seleção de indivíduos hesitantes e ousados. Utilizamos 100 peixes que foram isolados individualmente por 24 h em um aquário de vidro (40 cm comprimento x 20 cm de base e 25 cm de altura) com aeração constante, fotoperíodo das 06:00 às 18:00 h e temperatura de 25 ± 1 °C. Todos os aquários possuíam substrato de pedra de rio. Iniciávamos a filmagem dos peixes e, então, introduzíamos subitamente o objeto-estímulo, um cilindro de PVC de 10 cm de diâmetro (Fig. 1). As observações eram mantidas por 5 min (tempo estimado a partir de estudos-piloto). Todas as observações foram feitas no período da manhã.

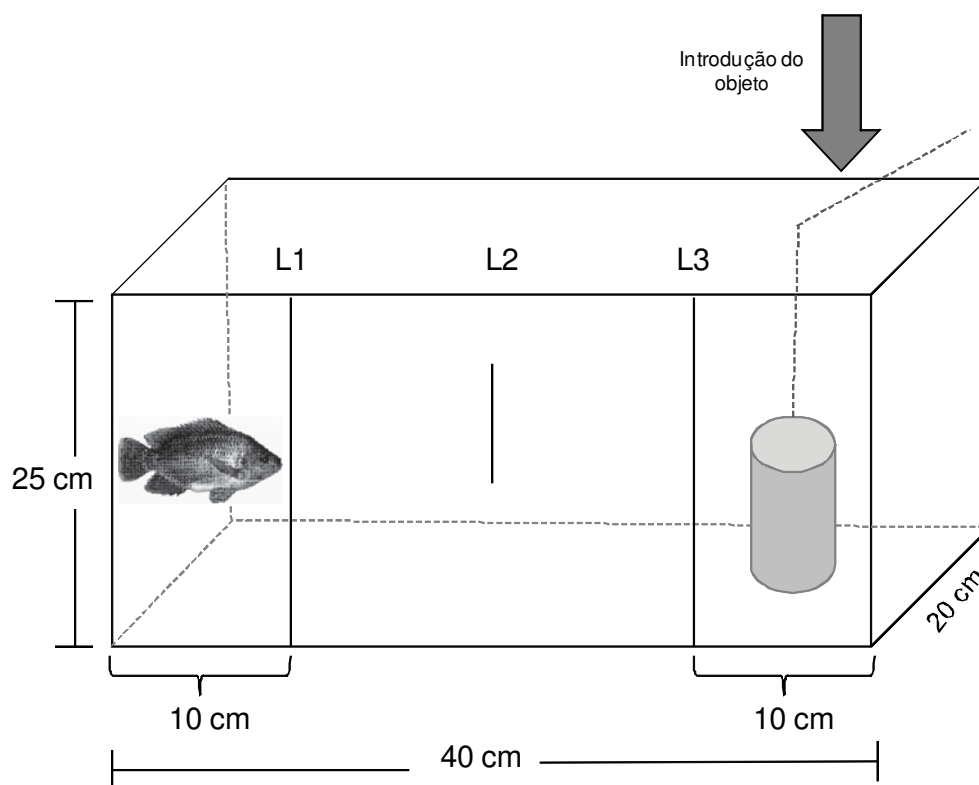


Figura 1 – Esquema do aquário teste. Um cilindro de PVC (6 x 8 cm) é introduzido verticalmente no aquário quando o peixe está no espaço limitado pela linha L1 (até 10 cm da lateral esquerda do aquário - delimita a região inicial); L2 (20 cm de L1); L3 (a 30 cm de L1).

Em cada filmagem analisamos a aproximação do peixe ao objeto-estímulo, quantificando as seguintes variáveis: a) tempo para sair da região inicial (ultrapassar a linha L1 em direção ao objeto-estímulo); b) tempo para ultrapassar L2 pela primeira vez; c) tempo para ultrapassar L3; d) tempo despendido em locomoção (independente da distância) ao longo dos 5 min.

Logo após, o peso e o comprimento-padrão dos peixes foram mensurados e a sexagem foi realizada pela inspeção da papila genital corada com azul de metileno, que evidencia a abertura do oviduto das fêmeas (Mendonça & Golçalves-de-Freitas, 2008).

Os dados foram testados para normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk's sendo realizadas as análises correspondentes, considerando-se $\alpha = 0,05$.

Resultados

Numa primeira análise, separamos os indivíduos em função do tempo que levaram para ultrapassar as áreas delimitadas no aquário (L1, L2 e L3), o que evidenciou dois extremos de resposta: permanecer na região inicial e chegar na região do objeto estímulo.

Os peixes que permaneceram apenas na região inicial, seja movimentando-se verticalmente, parados ou exibindo comportamento de congelamento (*freezing*) ao longo dos 5 min, foram considerados hesitantes. Para determinação dos peixes ousados, avaliamos inicialmente o número de peixes que ultrapassava L3 em função do tempo limite estabelecido (5 min) (Fig. 2). O tempo para ultrapassar L3 variou de 5 a 295 s, com maior número de peixes que ultrapassaram L3 no intervalo de 1 a 40 s. Assim, adotamos esse tempo limite para seleção dos peixes ousados. Os peixes que não obedeceram a nenhum desses dois critérios foram considerados intermediários. Com base nesses critérios, mostramos na Fig. 3 a proporção de indivíduos hesitantes, intermediários e ousados, reforçando os extremos representados pelos hesitantes e pelos ousados.

Além disso, detectamos nos animais ousados correlação linear positiva entre o tempo para ultrapassar as linhas demarcadoras das áreas (L1, L2 e L3 – Fig. 4), o que indica que o movimento registrado não foi aleatório.

Os resultados obtidos foram também confrontados com um referencial que não implica necessariamente a presença de objeto novo, que foi a locomoção. Constatamos um aumento progressivo no tempo despendido em locomoção a partir do perfil hesitante até o perfil ousado (Fig. 5).

Os perfis hesitante e ousado selecionados não tiveram relação com sexo e/ou peso e comprimento dos animais (Tabela I). Ao longo do experimento, constatamos uma alta ocorrência (68%) do comportamento de construção de ninhos (*nest building*) no substrato do aquário. Notamos que tanto machos quanto fêmeas construíram ninhos. Porém, esses construtores de ninhos não foram associados aos perfis de hesitante ou ousado (Tabela II).

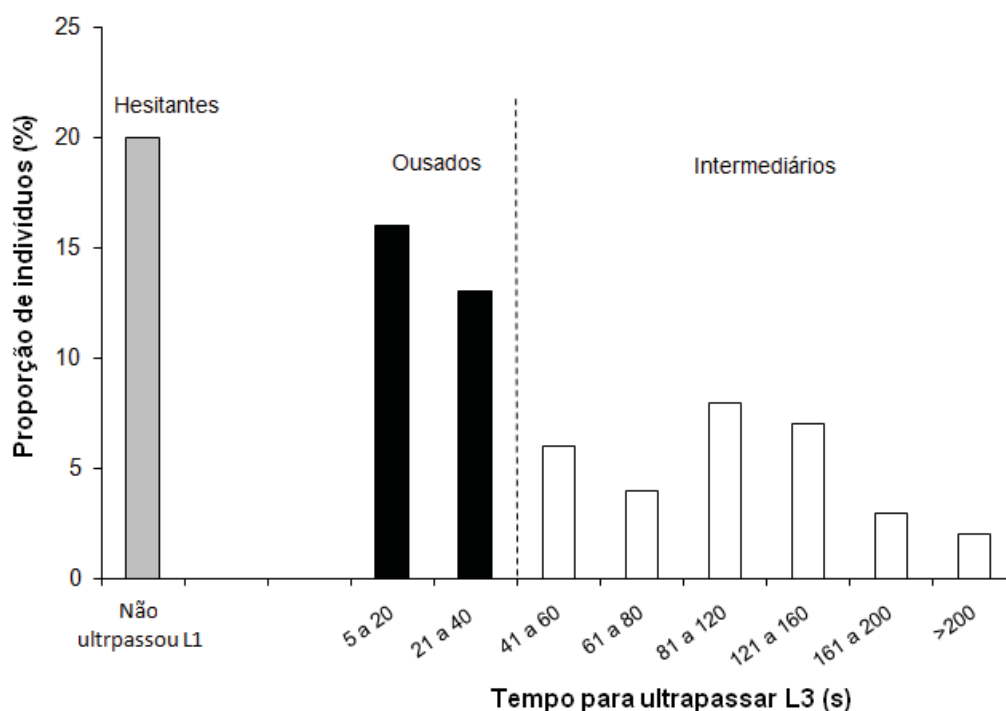


Figura 2 – Variabilidade nos tempos de aproximação ao objeto-estímulo. Proporção de peixes que permanecem na região inicial e peixes que ultrapassam L3 em diferentes tempos (chegando ao objeto). Desse perfil estabelecemos os animais hesitantes como aqueles que não ultrapassaram L1 e ousados os que ultrapassaram L3 em menos de 40 s. (n=100)

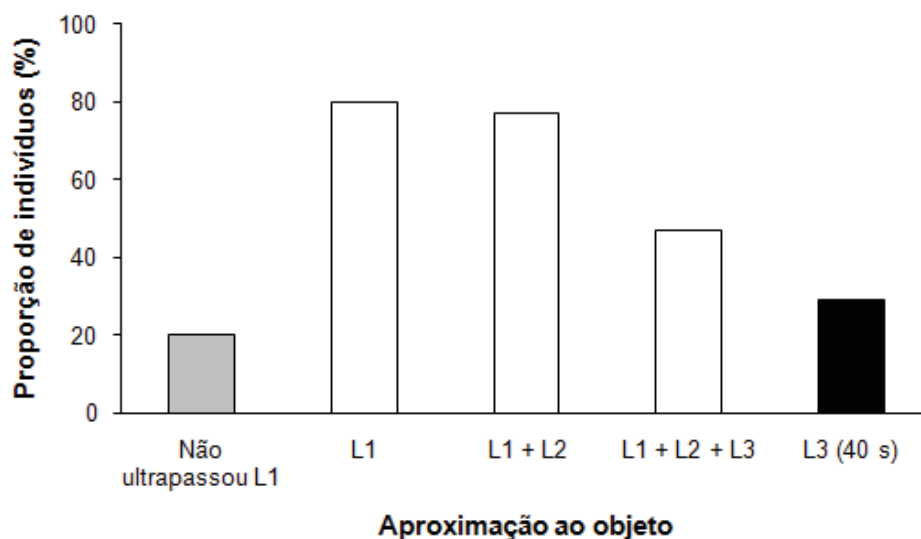


Figura 3- Variabilidade do deslocamento em direção ao objeto-estímulo da tilápia-do-Nilo. Não ultrapassou L1 = porcentagem de peixes que não saíram da região inicial durante 5 min; L1: peixes que ultrapassaram apenas a primeira linha; L1+ L2: peixes que ultrapassaram apenas as duas primeiras linhas; L1+ L2+L3: peixes que ultrapassaram as três linhas. L3 (40s): peixes que ultrapassaram a linha 3 em até 40s (n = 100).

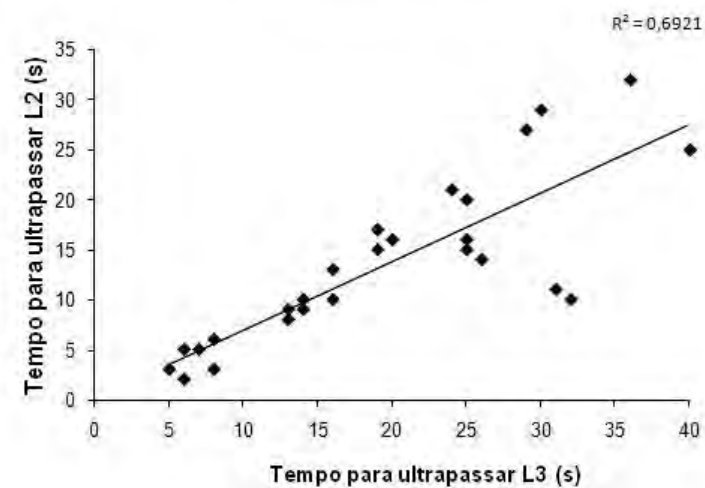
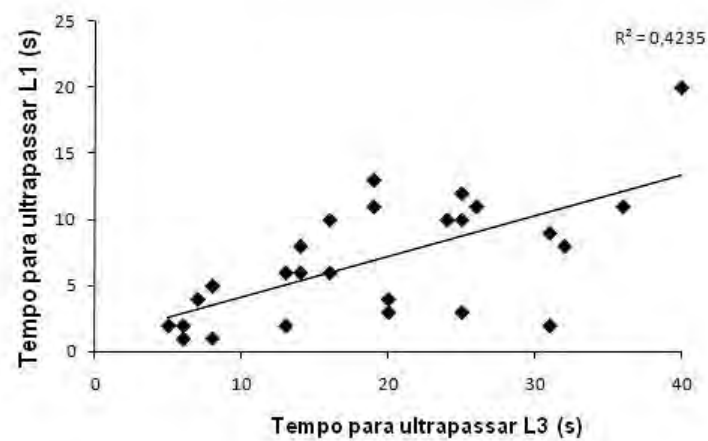
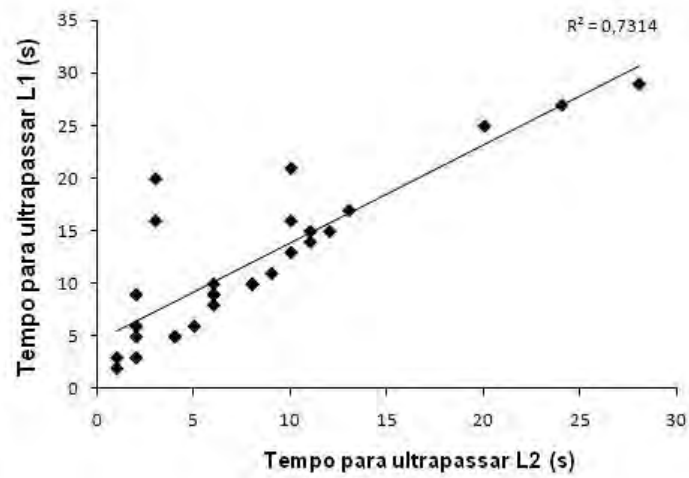


Figura 4 – Correlações dos tempos de deslocamento entre as áreas do aquários teste. L1 = linha 1; L2 = linha 2; L3 = linha 3. (Correlação de Pearson: (A) $p < 0,001$; (B) $p < 0,001$; (C) $p < 0,001$).

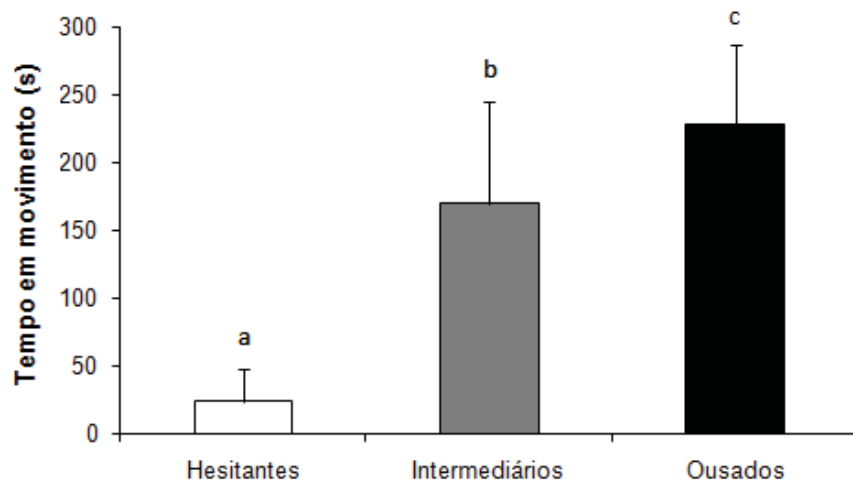


Figura 5 – Tempo em movimento (locomção). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA, $F= 60,20$; $p < 0,001$).= 20 peixes hesitantes, 51 intermediários e 29 ousados.

Tabela I – Biometria dos indivíduos em função da personalidade. (média $\pm$ desvio padrão).

Perfil	Peso (g)	Comprimento (cm)	Sexo		
			♀	♂	NI
Hesitante	22,6 $\pm$ 5,8	8,9 $\pm$ 0,8	7	11	2
Intermediário	23,5 $\pm$ 5,9	9,0 $\pm$ 0,7	23	20	8
Ousado	23,2 $\pm$ 6,3	9,0 $\pm$ 0,8	17	11	1

Não houve qualquer efeito do sexo e/ou da biometria no perfil comportamental dos peixes (ANOVA, Peso: $F = 0,03$, $p = 0,97$; comprimento: $F = 0,13$, $p = 0,88$). NI = sexo não identificado.

Tabela II – Número de peixes que construíram ninho em função do sexo e do perfil hesitante e ousado na tilápia-do-Nilo.

Perfil	Número de peixes que construíram de Ninho			
	Fêmeas	Machos	NI	Total
Hesitante	6	9	1	16
Ousado	9	5	1	14

NI = sexo não identificado - Teste de Goodman ($p > 0,05$).

ESTUDO II – Associação entre os perfis hesitante e ousado e a agressividade na tilápia-do-Nilo

Material e Métodos

Os peixes foram separados pelos perfis hesitante e ousado e mantidos em caixas de 500 L por 2 meses, nas mesmas condições de manutenção descritas no estudo 1. Após esse período, testamos a agressividade dos indivíduos desses perfis pelo teste do espelho e pelo pareamento entre coespecíficos. No teste do espelho, cada animal foi avaliado individualmente, enquanto que no pareamento, os pares foram compostos de animais de mesmo perfil com o objetivo de intensificar os efeitos do perfil, caso existissem. Como o sexo dos animais pode afetar a agressividade (Trainor *et al.*, 2009) este fator foi considerado na quantificação e análise dos resultados no teste do espelho. A partir desse resultados, vimos que não houve qualquer efeito do sexo nas respostas, de forma que no teste do pareamento o sexo não foi considerado.

Seleção dos Animais

Inicialmente, separamos os animais nos perfis hesitante e ousado. Para tanto, 115 exemplares adultos de tilápia-do-Nilo foram submetidos a dois testes de introdução de objeto novo, com intervalo de 24 h entre eles, como descrito no estudo anterior, exceto que no segundo teste usamos um objeto diferente (estrutura plástica amarela na forma de paralelepípedo - 10 cm de comprimento x 5 cm de altura x 3cm de profundidade). Em cada teste os peixes foram classificados como hesitantes, intermediários ou ousados. Para este estudo, no entanto, consideramos hesitantes ou ousados apenas os peixes que se enquadraram consistentemente em um desses perfis nos dois testes consecutivos.

Teste do espelho

A estratégia básica consistiu em mensurar a agressividade através do teste do espelho (Francis, 1990; *et al.*, 2005). Segundo Rowland (1999) os peixes não reconhecem sua própria imagem no espelho e então o atacam como se fosse um intruso.

Os animais foram testados isoladamente frente à própria imagem refletida em espelho. O aquário teste era de vidro (20 x 10 x 15 cm) com um espelho fixado do lado externo de uma das laterais. Um pedaço de papel opaco evitava a visão do peixe no espelho. Esse papel era removido para dar início ao teste. Após permanecerem 7 dias no aquário teste, para minimizar efeitos de hierarquia prévia, um espelho era apresentado através de uma das laterais do aquário e a interação filmada por 10 min. Na análise de videotape computamos a latência para o primeiro confronto, o tempo despendido em confronto e as frequências dos tipos agonísticos. Foram testados 20 peixes de cada perfil.

Além da latência para o primeiro confronto e do tempo despendido em confrontos, os seguintes tipos agonísticos foram quantificados (baseado em Alvarenga & Volpato, 1995):

- *Mordidas*: o agressor morde partes do corpo do oponente.
- *Ameaça lateral*: apenas um dos peixes exibe movimento lateral alterno entre cauda e cabeça (item acima), próximo ao oponente.
- *Confrontos totais*: incluiu os dois tipos (mordidas e ameaça lateral)

Pareamento entre coespecíficos

Após o teste do espelho, os peixes permaneceram no próprio aquário e, cinco horas após (no período da tarde), foram pareados (dentro de um mesmo perfil) em aquário neutro para registro dos confrontos durante 5 min. Em cada par, cuidamos para incluir animais de diferentes tanques-estoque para evitar efeitos de reconhecimento prévio (vide Giaquinto & Volpato, 1997). O uso de aquário neutro visou evitar efeito da residência prévia (Chellappa *et al.*, 1999). As interações foram filmadas para posterior análise em videotape. Foram testadas 10 duplas para cada perfil.

Além dos itens agonísticos descritos no teste do espelho, os seguintes itens foram também quantificados (adaptados de Alvarenga & Volpato, 1995) e Giaquinto & Volpato, 1997):

- *Confrontos laterais*: os peixes permanecem próximos entre si, dispostos lado a lado (mesmo sentido ou sentidos opostos), e batem a nadadeira caudal para ambos os lados.
- *Confronto bucal (mouth fight)*: ambos os peixes se aproximam frontalmente com a boca aberta e mordem concomitantemente a boca do oponente, empurrando-o para trás.

Análise de dados

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk's e a homocedasticidade por meio do teste de Levene's. Os respectivos testes estão descritos na apresentação dos resultados, considerando-se $\alpha = 0,05$.

Resultados

Dos 115 peixes, 24% preencheram os critério do perfil hesitantes, 19% de ousado e 57% de intermediário. Não houve diferença entre o peso e comprimento entre peixes hesitantes (fêmeas: $28 \pm 6,6$ g e $9,5 \pm 0,6$ cm; machos: $31,4 \pm 11,6$ g e $9,4 \pm 1,0$ cm) e ousados (fêmeas: $30,5 \pm 7,6$ g e $9,6 \pm 0,9$ cm; machos: $28,1 \pm 8,2$ g e $9,5 \pm 1,0$ cm) (ANOVA fatorial 2 x 2: Peso, $F = 1,07$, $p = 0,30$; Comprimento, $F = 0,05$, $p = 0,82$).

No teste do espelho, 3 de 10 fêmeas e 1 de 10 machos hesitantes não se confrontaram com a imagem refletida, enquanto que nos peixes ousados todas as fêmeas confrontaram e apenas 2 de 10 machos não exibiram confrontos. Considerando apenas os animais que se confrontaram, os peixes ousados apresentaram uma menor latência para emissão do primeiro confronto (Fig. 6) e despenderam mais tempo em confronto que os animais hesitantes (Fig. 7). Os confrontos totais foram mais freqüentes nos animais ousados (Fig. 8), embora a análise isolada dos itens agonísticos (mordidas e ameaças laterais) não revelou qualquer diferença entre os perfis (Tabela III). Nenhuma análise da agressividade frente ao espelho revelou qualquer associação com o sexo dos animais (Figs. 6 a 8 e Tabela III).

No teste de pareamento com coespecífico, os peixes ousados também foram os mais agressivos apresentando maior número de mordidas (Fig 9), confrontos totais (Fig10) e despenderam mais tempo em confrontos (Fig11) Porém, a latência para o primeiro confronto foi igual entre os perfis (hesitantes = $77,8 \pm 68,7$; ousados = $80,11 \pm 75,07$; $t = 0,07$; $p = 0,94$), assim como os confrontos bucais e ameaças laterais (Tabela IV).

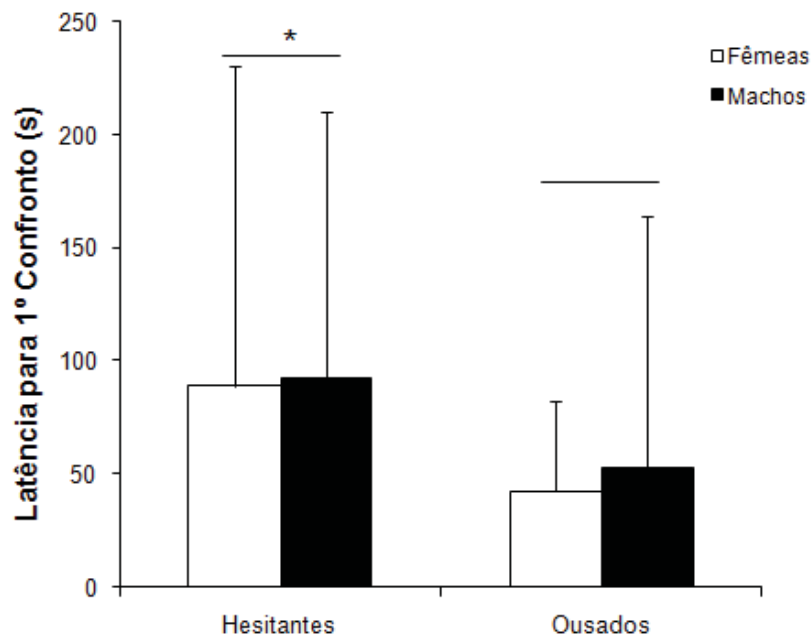


Figura 6. Agressividade em função do perfil e sexo na tilápia do Nilo – Teste do espelho. Dados médios (+ DP, n = 10 machos e 10 fêmeas para cada perfil) computados durante 10 min imediatamente após apresentação do espelho ao animal. Não houve interação entre sexo e perfil (ANOVA, $F = 0,10$; $p = 0,74$). O sexo não afetou as respostas (ANOVA, $F = 0,016$; $p = 0,89$). * Indica diferença entre os perfis (ANOVA, $F = 3,44$; $p = 0,07$; LSD, $p = 0,03$).

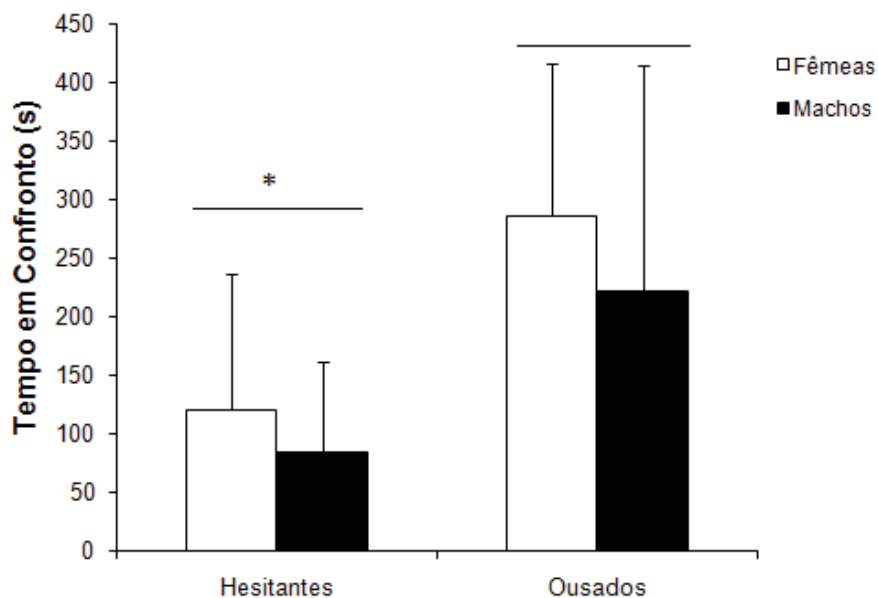


Figura 7. Agressividade em função do perfil e sexo na tilápia do Nilo – Teste do espelho. Dados médios (+ DP, n = 10 machos e 10 fêmeas para cada perfil) computados durante 10 min imediatamente após apresentação do espelho ao animal. Não houve interação entre sexo e perfil (ANOVA, $F = 0,74$; $p = 0,39$). O sexo não afetou as respostas (ANOVA, $F = 1,35$; $p = 0,25$). *Indica diferença entre os perfis (ANOVA, $F = 10,12$; $p = 0,003$; LSD, $p = 0,002$).

Tabela III. Agressividade em função do perfil e sexo da tilápia do Nilo - Avaliação por teste de espelho.

Perfil	Mordidas		Ameaças laterais	
	♀	♂	♀	♂
Hesitantes	51 ± 57	25,7 ± 27	4 ± 4,4	5 ± 4,2
Ousados	73 ± 45	46,3 ± 45	6,3 ± 6	7,6 ± 14

Valores expressos como média ($\pm$ DP) da frequência de confrontos.

Não houve qualquer diferença significativa no número de mordidas e ameaças laterais deflagradas ao espelho (ANOVA, $F = 0,24$; $p = 0,62$ e $F = 0,32$; $p = 0,57$; respectivamente).

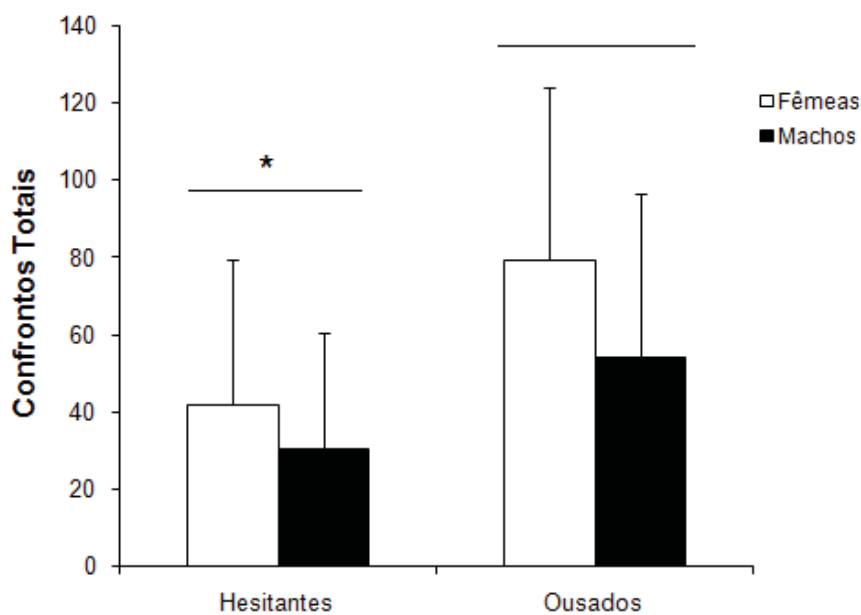


Figura 8. Agressividade em função do perfil e sexo na tilápia do Nilo – Teste do espelho. Dados médios ($\pm$ DP, $n = 10$ machos e 10 fêmeas para cada perfil) computados durante 10 min imediatamente após apresentação do espelho ao animal. Não houve interação entre sexo e perfil (ANOVA, $F = 1,0$; $p = 0,32$). O sexo não afetou as respostas (ANOVA, $F = 2,75$; $p = 0,10$). * Indica diferença entre os perfis (ANOVA, LSD, $p = 0,03$).

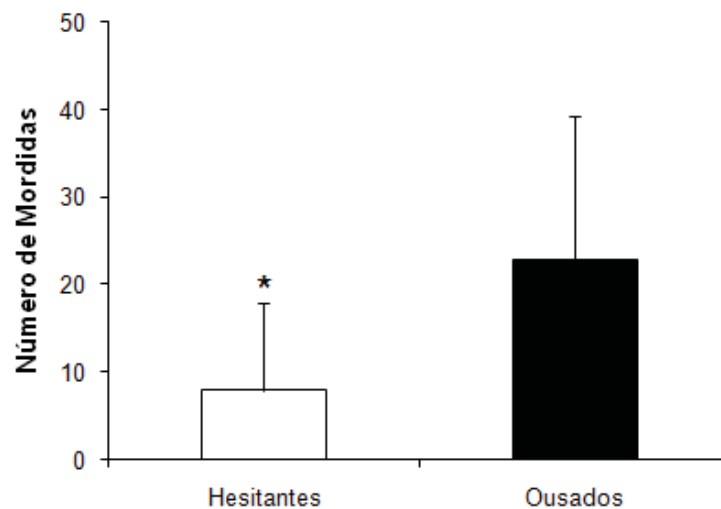


Figura 9. Agressividade em função do perfil na tilápia do Nilo – Teste do pareamento entre coespecíficos. Dados médios ($\pm$ DP, n = 10 duplas de cada perfil) computados em 5 min de pareamento. *Indica diferença significativa entre os perfis (Teste t de Student, $t = 2,36$; $p = 0,03$)

Tabela IV. Agressividade em função do perfil da tilápia do Nilo - Avaliação por teste de pareamento entre coespecíficos.

Perfil	Confrontos Bucais	Confrontos laterais
Hesitantes	$0,6 \pm 1,2$	$2,8 \pm 3,0$
Ousados	$2,44 \pm 3,4$	$3,22 \pm 2,64$

Valores expressos como média ($\pm$ DP) da frequência de confrontos.

Não houve qualquer diferença significativa no número de confrontos totais e ameaças laterais entre os perfis (Teste de Student, $t = 0,31$; $p = 0,76$ e Mann-Whitney, $U' = 32,0$; $p = 0,3$; respectivamente).

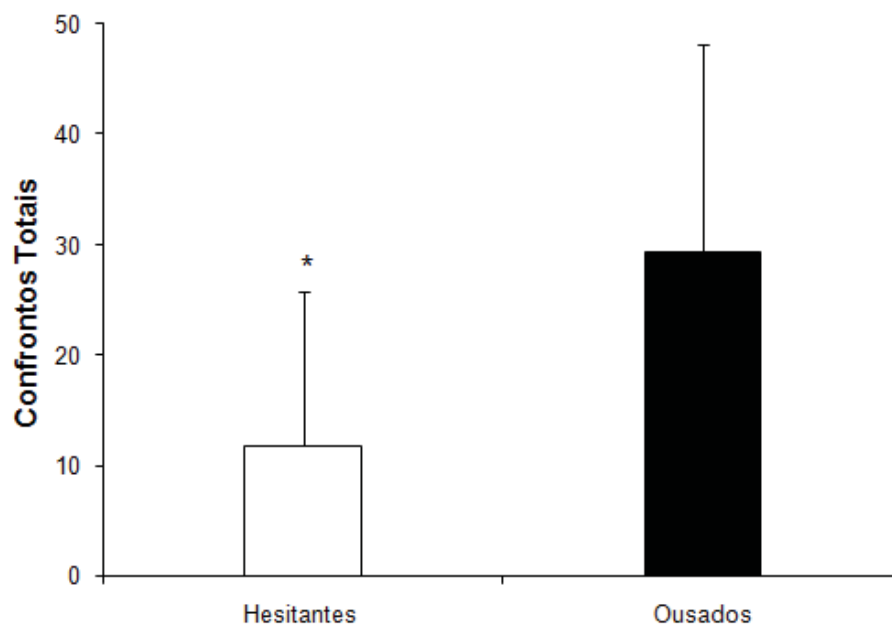


Figura 10 . Agressividade em função do perfil na tilápia do Nilo – Teste do pareamento entre coespecíficos. Dados médios ($\pm$ dp, n = 10 duplas de cada perfil) computados em 5 min de pareamento. *Indica diferença significativa entre os perfis (Teste t de Student, $t = 2,3$; $p = 0,33$).

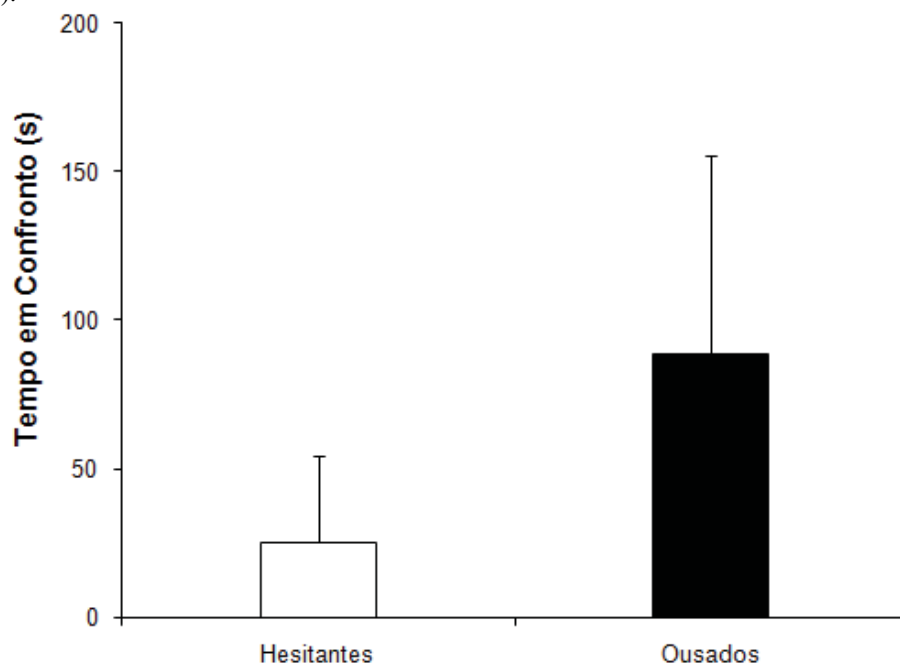


Figura 11 . Agressividade em função do perfil na tilápia do Nilo – Teste do pareamento entre coespecíficos. Dados médios ($\pm$ dp, n = 10 duplas de cada perfil) computados em 5 min de pareamento. *Indica diferença significativa entre os perfis (Teste t de Student, $t = 2,7$; $p = 0,014$).

Estudo 3: Associação entre os perfis hesitante e ousado e a resposta de estresse na tilápia-do-Nilo

Material e Métodos

Os procedimentos gerais de manutenção dos animais foram os mesmos descritos no primeiro estudo. Aqui, utilizamos os mesmos indivíduos avaliados no experimento anterior (agressividade), cerca de um mês depois. A estratégia básica consistiu em submeter os peixes a estressor de confinamento e avaliar se a resposta de estresse difere entre os animais hesitantes e ousados. Para tanto, usamos como indicadores de estresse a frequência ventilatória (FV) e a coloração do olho dos peixes, que foram medidos numa condição pré-estressor (5 min antes do início do estressor) e no último minuto do período de 30 min de estressor de confinamento.

Os peixes foram mantidos em grupos separados pelo perfil e foram isolados no aquário teste (40 x 20 x 25 cm, 18 L de água) durante 7 dias para minimizar efeitos da hierarquia prévia. No oitavo dia foram testados quanto ao estresse. O confinamento foi imposto conduzindo o peixe a uma das laterais do aquário com o auxílio de uma placa opaca de acrílico, com dimensões menores que a menor lateral do aquário, mantendo-o restrito a um espaço de aproximadamente 5% do volume total de água (adaptado de Volpato & Barreto, 2001).

A Frequência ventilatória (FV) foi mensurada por meio da contagem do tempo necessário para 20 batimentos operculares sucessivos, o que permitiu o cálculo da frequência de ventilação branquial por minuto (segundo Alvarenga & Volpato, 1995).

A coloração do olho foi registrada segundo descrito em Volpato *et al.* (2003). De acordo com essa técnica, desenhamos o olho do peixe num papel, dividindo-o em 8 áreas iguais a partir do traçado de 4 diâmetros equidistantes. Essas áreas eram preenchidas segundo o que se observava no olho do peixe e, posteriormente, transformadas em porcentagem.

Os dados da FV e da coloração do olho apresentaram distribuição normal pelos testes de Kurtosis e Skewness e foram avaliados com estatística paramétrica, conforme apresentado nos resultados, considerando-se o valor crítico ao nível de 5%.

Resultados

Na análise estatística para a FV, não houve efeito de interação entre perfil, momento em relação ao estresse e sexo dos animais (ANOVA, medidas repetidas, $F = 3,52$; $p = 0,069$). Porém, houve associação significativa entre momento no estresse e perfil ($F = 4,19$; $p = 0,049$). Apesar disso, o teste complementar (LSD) detectou apenas diferença do momento em relação ao estressor (hesitantes, $p = 0,001$; ousados, $p = 0,00000$), sem efeito dos perfis (pré, $p = 0,45$; estresse, $p = 0,44$). Esses dados estão apresentados na Figura 2A. Em função disso, avaliamos a variação da FV entre os momentos pré e estresse para os dois perfis e detectamos que os animais ousados tiveram um maior aumento dessa frequência em relação aos hesitantes (Fig. 2B).

O segundo indicador de estresse usado foi o escurecimento do olho dos animais. Observamos que, embora os valores médios na condição pré e na condição estresse não tenha diferido entre os perfis e sexo considerados, apenas os machos hesitantes não aumentaram significativamente o escurecimento do olho na condição de estresse (Fig. 3).

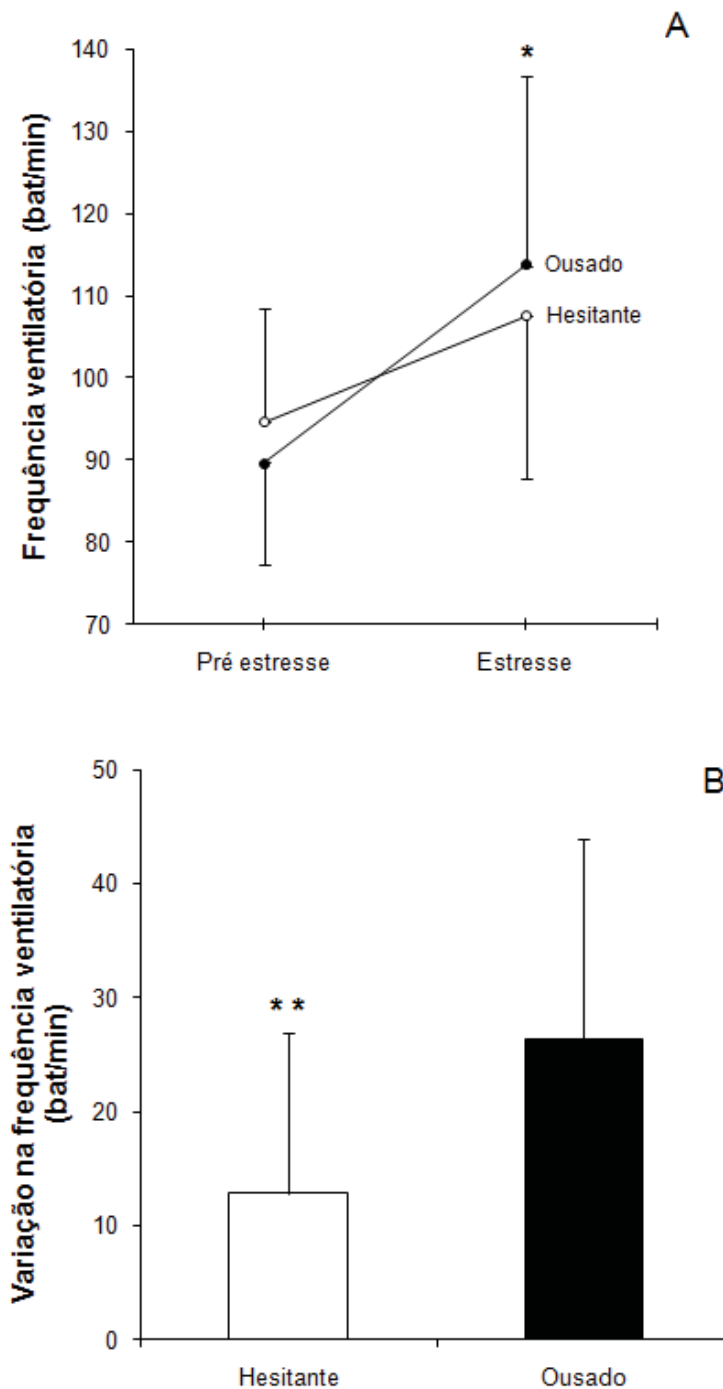


Figura 12 – Efeito dos perfis histante e ousado na atividade ventilatória da tilápia do Nilo. Dados médios (+ DP) de 17 animais hesitante e 19 ousados. *Indica que a atividade ventilatória foi maior no estresse, independente do perfil do peixe (ANOVA medidas repetidas, $F = 42,1$; $p < 0,0001$). **Indica diferença significativa (Teste t de Student, $t = 2,5$; $p = 0,018$). Dentre os ousados, encontramos 2 peixes *outliers* (2,2 e 2,6 bat/ min) para valores de variação da frequência ventilatória, cujos dados foram substituídos pelo valor da média do grupo.

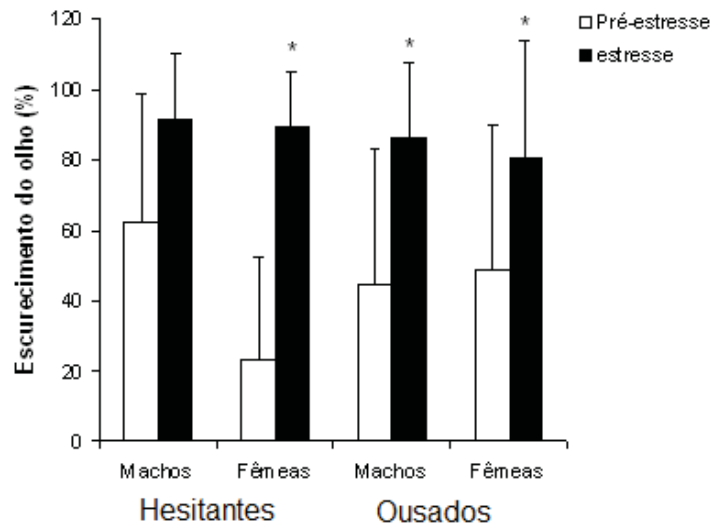


Figura 13: Efeito do estresse de confinamento no padrão de coloração do olho na tilápia-do-Nilo. Valores médios ($\pm$ DP) de 10 peixes em cada caso, mas 9 para as fêmeas do perfil ousado. Todas as médias foram iguais entre si na condição pré-estresse e na condição estresse (ANOVA, $p > 0,05$). *Indica diferença significativa na comparação pré-estresse e estresse (ANOVA, medidas repetidas: fêmeas hesitantes, $p = 0,000006$; machos hesitantes: 0,03; fêmeas ousadas, $p = 0,001$; e machos ousados, $p = 0,001$).

Discussão

Neste estudo estabelecemos uma metodologia simples para separação de peixe dentro do contínuo hesitação-ousadia, baseando-se na aproximação do animal a um objeto novo introduzido no aquário. Dessa separação, estabelecemos associações entre esses dois perfis com níveis de agressividade e resposta ao estresse, o que confirmou a validade dos perfis selecionados.

Técnica de identificação de peixes hesitantes ou ousados

O uso da reação do peixe a um objeto novo introduzido subitamente no aquário permitiu inferências adequadas desses perfis. Frente a um objeto novo, a tendência dos indivíduos pode ser a exploração desse novo estímulo. Porém, este também pode representar uma fonte de perigo. Nesse sentido, aqueles animais que se aproximam rapidamente dessa fonte foram ousados, considerando a potencialidade de risco. Da mesma forma, os que não se aproximaram, hesitaram, admitindo-se que a motivação para inspeção do novo objeto poderia existir. Além disso, devemos considerar que, embora influências relacionadas ao medo estejam presentes nesta condição, ele não é o único fator, pois a motivação de curiosidade, a agressão pela invasão ou perturbação territorial ou níveis de ansiedade podem estar presentes. Nesse sentido, as denominações de hesitante e ousado empregadas neste estudo parecem minimizar essas questões.

Dentro da abordagem teórica acima, no estudo 1, após a introdução do objeto-estímulo (novidade) no aquário, a parcela de animais que permaneceu parada nos 5 min de observação (20%) claramente evitou o novo estímulo (condição de hesitação). Os que rapidamente se aproximaram desse desafio ambiental, foram ousados (29%) em relação aos hesitantes. Ou seja, esses perfis representam aproximadamente os quartos extremos no perfil hesitação-ousadia. Além disso, nos animais ousados, as correlações positivas entre tempo para ultrapassar a marca L1 e o tempo para ultrapassar as outras marcas revelam que quando estes saíam da região de início tendiam a se dirigir ao local do estímulo novo e não apenas faziam movimentos aleatórios. Do contrário, atingir o objeto novo poderia ser uma consequência casual do comportamento exploratório do aquário. Mas devemos lembrar que esses animais já estavam habituados por 24 h nesse ambiente e, mais ainda, encontravam-se parados numa extremidade no início dos testes,

de forma que a hipótese de que o encontro com o objeto foi casual, decorrente da exploração do aquário, é pouco provável. Com isso, parece claro que o perfil de ousadia detectado refere-se mesmo ao comportamento de inspeção de um objeto recém introduzido no ambiente. Semelhantemente, Wilson *et al.* (1993) postularam que peixes hesitantes costumam reagir à novidade ou ameaça ficando parados ou vigilantes, enquanto os ousados se aproximam rapidamente do estímulo novo, explorando-o.

A análise da atividade de natação também reforça a validade do critério que adotamos, pois os peixes hesitantes se movimentaram menos que os intermediários e estes menos que os ousados (Fig. 4). De fato, alguns estudos têm mostrado que peixes hesitantes nadam menos que os ousados (Sneddon, 2003, Brown *et al.*, 2007). Apesar desse critério, pela abordagem teórica que apresentamos, a análise baseada na reação do peixe frente à introdução súbita de objeto no aquário é preferível. O simples aumento da locomoção pode expressar uma série de estados motivacionais, comparativamente à situação de exploração de objeto novo. Por exemplo, em peixes a locomoção varia diretamente proporcional ao nível de ansiedade, cuja análise é facilitada pela existência de substâncias ansiolíticas ou ansiogênicas (Carpenter *et al.*, 2007, López-Patiño *et al.*, 2007)

Um comportamento interessante que observamos foi que a maioria dos peixes, mesmo em isolamento, construiu ninho (68%). A construção de ninhos na tilápia-do-Nilo era tida como comportamento exclusivo dos machos e com função de atração de fêmeas (Lowe-McConnel, 1958). Mais recentemente, esse comportamento foi também atribuído em fêmeas (Golçalves-de-Freitas & Nishida, 1998; Castro *et al.*, 2009), como também verificado aqui. No entanto, a exibição do comportamento de construção de ninhos não foi associado a nenhum dos perfis aqui investigados, hesitante ou ousado (Tabela II). A mesma ausência de associação ocorreu em relação ao sexo dos animais. Todavia, Øverli *et al.* (2005) mostraram que em trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, as fêmeas reagem à novidade de forma diferente dos machos. Esses autores encontraram que uma semana depois de transportadas para um novo ambiente, em isolamento social, as fêmeas voltam a se alimentar mais rapidamente que os machos; porém quando as trutas são submetidas ao estresse de confinamento, as fêmeas exibem mais rápido que os machos um comportamento similar a um estado de pânico, caracterizado por movimentos agitados no fundo do tanque. Embora o estudo de Øverli *et al.* (2005) ocorra numa condição muito mais complexa de novidade, a diferença sugere que machos e fêmeas podem ter diferentes perfis psicológicos/personalidade.

Em se tratando de preferência por parceiro, Godin & Dugatkin (1996) relatam que fêmeas de guppy (*Poecilia reticulata*) preferem machos ousados (“bold”), sugerindo que eles podem ser mais viáveis e podem oferecer mais benefício na produção de descendentes. Porém, qual seria a vantagem adaptativa que garante a existência do perfil hesitante? Uma explicação plausível é que esse perfil resguarda os indivíduos de riscos potenciais (Wilson & Stevens, 2005), conferindo aumento na taxa sobrevivência.

Uma vez identificados os perfis de hesitante e ousado, no passo seguinte buscamos correlatos comportamentais (agressividade) e fisiológicos (estresse) associados a eles, o que reforça ainda mais a validade biológica desses perfis. Assim, no estudo 2 investigamos a associação entre os perfis hesitante e ousado e a agressividade, que foi avaliada tanto pelo teste do espelho quanto pelo pareamento. Nos dois testes nossos resultados mostraram que a agressividade está associada à personalidade da tilápia-do-Nilo, sendo os peixes ousados mais agressivos que os hesitantes.

Corroborando os dados do primeiro estudo, onde não houve associação do perfil com o sexo dos animais, aqui também não houve participação do sexo dos animais na expressão da agressividade e perfil. A agressividade mais acentuada dos machos é frequentemente atribuída aos níveis de testosterona (Trainor *et al.*, 2009; Kuepper *et al.*, 2010). Porém, quando analisamos conjuntamente com os perfis hesitante e ousado, tal associação não ocorreu. Embora não consigamos explicar porque os machos, mesmo sendo adultos, não expressaram maior agressividade, a não influência do sexo dos peixes nos dados associados aos perfis reforça o que obtivemos no primeiro estudo.

O teste do espelho tem sido utilizado em alguns estudos, pois pode eliciar respostas agressivas em peixes (Francis, 1990; Budaev, *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2005). Nesse teste os peixes ousados iniciaram confrontos mais rapidamente que os animais hesitantes, reforçando que apresentam uma menor restrição a possíveis perigos, visto que partem mais rapidamente para a luta. Apresentaram também maior emissão de comportamentos agressivos (mordidas e ameaças laterais) e maior tempo em confronto com o espelho.

O fato dos peixes ousados serem os mais agressivos pode ser entendido como uma característica adaptativa que dá a esses animais melhores condições de enfrentarem situações novas (decorrente do componente de ousadia). Ao se exporem mais, têm mais

chances de serem predados (Godin & Clark, 1997), de forma que a associação entre a ousadia e a agressão seja mantida na população.

Já animais hesitantes tendem a evitar situações de risco ficando em regiões mais abrigadas e movimentando-se pouco (Sneeden, 2003), o que diminui sua exposição a situações de risco. No teste do espelho, demoram mais para iniciar as lutas, confrontam-se menos e por menos tempo. Em *Cichlasoma (Archocentrus) nigrofasciatum*, os indivíduos que hesitaram a entrar em uma nova área foram também aqueles que hesitaram em se aproximar do espelho (Budaev *et al.*, 1999). Outros estudos também mostram que o perfil hesitante correlaciona-se negativamente com níveis de agressividade (Tulley & Huntingford 1988; Budaev 1997).

Mesmo a mudança do contexto de avaliação da agressividade não alterou sua relação com o perfil hesitante ou ousado. No teste do pareamento entre coespecíficos, situação que envolve contexto social, os peixes ousados brigaram mais que os hesitantes, embora sem diferença em relação à latência para iniciar os confrontos. A diferença no tipo agonístico investigado, ou mesmo na resposta da latência entre os testes do espelho e do pareamento, não reflete diferença de agressividade, mas apenas de contexto.

No terceiro estudo, nós avaliamos a resposta de peixes dos dois perfis (hesitante e ousado) a estressor de confinamento. A avaliação da resposta de estresse foi feita por medidas da frequência de ventilação (FV) e grau de escurecimento do olho dos peixes.

A FV tem sido mostrada como um bom indicador não invasivo de estados de estresse em peixes, inclusive quando contrastado com a resposta de cortisol plasmático, embora devamos ser cautelosos nessa interpretação, pois estímulos puramente alertantes, de curta duração, elevam a FV (Barreto & Volpato, 2004), sem refletir, necessariamente, o estado de estresse. Entretanto, no presente estudo, usamos estressor de confinamento com duração de 30 min, o que foge da situação puramente de alerta e adentra no quadro de estresse, como também verificado por Barreto & Volpato (2004). Em peixes, outros estudos também têm usado a FV como indicador de estresse, como Alvarenga & Volpato (1995), Sager *et al.* (2000).

A FV pré-estresse foi similar entre os perfis hesitante e ousado (94,6 e 89,7 bat/min, respectivamente) e também a resultados reportados em outros estudos com peixes: 76 – 81 bat/min (Volpato, *et al.*, 1989) e 96 – 109 bat/ min (Barreto & Volpato, 2004). Além disso, o estresse de confinamento aumentou a FV (Fig. 12A), o que é uma

resposta esperada (Barreto & Volpato, 2004, 2006) e confirma a adequação metodológica deste estudo.

A variação na coloração do olho é também outra forma indireta e não-invasiva de se avaliar o estresse em peixes (Volpato *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2002; Vera Cruz & Brow, 2007). De fato, em estado de estresse, há liberação de MSH (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002), o que interfere nos pigmentos escuros (no caso, a melanina) dentro das células epidermais, tornando a pele mais escura. Dentre as regiões afetadas, está a esclera que possui esses pigmentos.

Embora peixes de ambos os perfis tenham elevado a FV, o que mostra que estavam estressados, a amplitude de variação dessa atividade foi maior nos peixes ousados (Fig. 12B), o que significa que são mais sensíveis ao confinamento. Da mesma forma, a avaliação do estresse por meio da variação no grau de escurecimento do olho confirma que os peixes ousados são mais sensíveis ao estressor (Fig. 13). Apesar dessa resposta ser consistente a partir dos nossos dados, Ruiz-Gomes *et al.* (2008) mostram que trutas LR (*low responders to stress*), que respondem a estressor com menor elevação de cortisol plasmático, são peixes que após transporte a ambiente novo se alimentaram mais rapidamente que os peixes HR (*high responders to stress*). Considerando que a alimentação mais rápida a ambiente novo é perfil esperado em peixes ousados, então este perfil de ousadia está associado a uma menor sensibilidade ao estressor, ao contrário do que vimos em nosso estudo. Isto, no entanto, requer mais investigações para se esclarecer se trata-se de diferenças entre espécies ou questões metodológicas.

Parece haver uma associação entre a personalidade do animal e seu perfil agressivo, que pode ser predeterminado geneticamente ou ser uma estratégia adotada que aumente as chances de sobrevivência do indivíduo. A Teoria dos jogos prediz indivíduos que adotam diferentes estratégias competitivas (gavião ou pomba) podem obter igual *fitness*. Assim, é possível que tanto os perfis ousado quanto hesitante representem diferentes estratégias adaptativas numa população, o que explicaria a existência clara desses perfis num grupo.

Wilson (1998) desenvolveu um modelo conceitual para explicar por que os indivíduos podem divergir comportamentalmente. Dado um ambiente heterogêneo em que animais com o mesmo padrão comportamental são sequencialmente introduzidos, os indivíduos iniciais deverão habitar as regiões mais seguras e se alimentar de maneira mais segura, e quando o espaço nessas regiões diminuir eles passam a se alimentar em regiões de maiores riscos. Tal relação em que o indivíduo se coloca (perigo e

alimentação) deve seguir a teoria da distribuição livre ideal: menos peixes em áreas de risco e de recursos escassos, mais peixes em áreas seguras e de recursos abundantes, que leva os animais a escolhas facultativas especializadas, direcionando o surgimento de indivíduos hesitantes ou ousados (Wilson *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 2004).

Como todos os animais, os indivíduos devem ter um equilíbrio entre comportamentos que envolvam correr riscos (como se alimentar em áreas arriscadas) e aversão ao risco (como vigilância e formação de cardume). Quando um animal percebe que está em iminente risco de predação, espera-se que ele adote comportamentos que evitem tal situação, tal como cessar alimentação nessas áreas e manter um alto nível de vigilância. Ao fazê-lo, o indivíduo paga os custos de oportunidade de alimentação, mas tem o benefício de manter uma maior taxa de sobrevivência (Ward *et al.*, 2004). Há um equilíbrio entre os custos e benefícios do perfil apresentando: animais mais ousados apresentam um maior benefício em recursos alimentares e/ou parceiros sexuais, mas são mais suscetíveis à predação, enquanto os mais hesitantes obtêm menos recursos, mas apresentam um menor risco de serem predados (Wilson & Stevens, 2005; Bremner-Harrison *et al.* 2004).

Diante do exposto, caso os perfis hesitante e ousado tenham componente genético em sua determinação, a identificação desses indivíduos nas populações propicia a seleção dessas características para exploração comercial na piscicultura, bem como pode ampliar o conhecimento sobre seus reflexos na população natural. Além disso, trazem ao ramo das pesquisas mais uma variável a ser considerada nos perfis de interferência experimental.

Referências

- Alvarenga, C. M & Volpato, G. L. 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, 57, 75-80.
- Azevedo, C. S. & Young, R. J. 2006. Shyness and boldness in greater rheas *Rhea Americana* Linnaeus (Rheiformes, Rheidae): the effects of antipredator training on the personality of the birds. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23, 202-210.
- Barki A. & Volpato G. L. 1998. Early social environment and the fighting behaviour of young *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Behaviour*, 135, 913-929.
- Barreto, R. E. & Volpato, G. L. 2004. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Process*, 66, 43-51
- Barreto, R. E. & Volpato, G. L. 2006. Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors. *Journal of Experimental Animal Science*, 43, 189-196.
- Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 517-525.
- Bremner-Harrison, S., Prodohk, P. A. & Elwood, R. W. 2004. Behavioural trait assessment as a release criterion, boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox *Vulpes velox*. *Animal conservation*, 7, 313-320.
- Briffa, M., Rundle, S. D. & Fryer, A. 2008. Comparing the strength of behavioural plasticity and consistency across situations: animal personalities in the hermit crab *Pagurus bernhardus*. *Proceeding of Royal Society Biology*, 275, 1305-1311.
- Brown, C., Jones, F. & Braithwaite, V. 2005. In situ examination of boldness–shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyrhaphis episcopa*. *Animal Behavior*, 70, 1003-1009.
- Budaev, S. V. 1997. “Personality” in the Guppy (*Poecilia reticulata*): A correlational study of exploratory behavior and social tendency. *Journal of Comparative Psychology*, 111(4), 399-411.
- Budaev, S. V., Zworykin, D. D. & Mochek, A. D. 1999. Individual differences in parental care and behaviour profile in the convict cichlid: a correlation study. *Animal Behaviour*, 58, 195 – 202.
- Carpenter, E. R., Watt, M. J., Forster, G. L., Øverli, Ø., Bockholt, C., Renner, K. J. & Summer, C. H. 2007. Corticotropin releasing factor induces anxiogenic locomotion in trout and alters serotonergic and dopaminergic activity. *Hormones and Behavior* 52, 600–611

- Chellappa, S., Yamamoto, M. E., Cacho, M. S. R. F. & Huntingford, F. A. 1999. Prior residence, body size and the dynamics of territorial disputes between male freshwater angelfish. *Journal of Fish Biology*, 55, 1163–1170.
- Coleman, K. & Wilson, D. S. 1998. Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish, individual differences are context-specific. *Animal Behaviour*, 56, 927-936.
- Castro A. L. S., Gonçalves-de-Freitas, E., Volpato, G. L. & Oliveira, C. 2009. Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, 368-374
- Endo, M., Kumahara, C., Yoshida, T., & Tabata, M. 2002. Reduced stress and increased immune responses in Nile tilapia kept under self-feeding conditions. *Fisheries Science*, 68, 253–257.
- Francis, R. C. 1990. Temperament in a fish, a longitudinal study of the development of individual differences in aggression and social rank in the Midas cichlid. *Ethology*, 86, 311-325.
- Fraser, D. F., Gilliam, J. F., Daley, M. J., Le, A. N. & Skalski, G. T. 2001. Explaining leptokurtic movement distributions, intrapopulation variation in boldness and exploration. *American Naturalist*, 158, 124-135.
- Giaquinto, P. C. & Volpato, G. L. 1997. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiology Behaviour*, 62, 1333-1338.
- Godin, J. G. J. & Dugatkin, L. A. 1996. Female mating preferences for bold males in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 93, 10262-10267.
- Godin J. G. J. & Clark K. A. V. 1997. Risk-taking in stickleback fishes faced with different predatory threats. *Ecoscience*, 4, 246–251
- Gonçalves-de-Freitas, E., Nishida, S. M. 1998. Sneaking behavior of the Nile tilapia. *Boletim Técnico CEPTA*, 11, 71-79.
- Kuepper, Y., Alexandera, N., Osinskya, R., Muellera, E., Schmitzb, A., Nettera, P., Henniga, J. 2010. Aggression-Interactions of serotonin and testosterone in healthy men and women. *Behavioural Brain Research*, 206, 93–100.
- Lópes-Patiño, A. M., Cabral, H. & Zhdanova, V. 2007. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 93, 160-171.
- Lowe-McConnell, M. 1958. Breeding behavior patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 132, 1-31.
- Johnson, J. C. & Sih, A. 2007. Fear, food, sex and parental care: a syndrome of boldness in the fishing spider, *Dolomedes triton*. *Animal Behaviour*, 74, 1131-1138.

- Mendonça, F. Z. & Golçalves-de-Freitas, E. 2008. Nesting deprivation and mating succes in Nile tilapia (Teleostei: Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(3), 413-418.
- Oliveira, R. F., Carneiro, L. A. & Canário, A. V. M. 2005. No hormonal response in tied fights. *Nature*, 437, 207-208.
- Øverli, Ø., Sorensen, C. & Nilsson, G. 2006. Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: Do males and females react differently to novelty? *Physiology & Behavior*, 87, 506-512.
- Pottinger, T. G., Moran, T. A., Morganm, J. A. W. 1994. Primary and secondary indices of stress in the progeny or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high an low responsivessess to stress. *Journal of Fish Biology*, 44, 149-163.
- Realé, D., Gallant, B. Y., LeBlanc, M. & Festa-Bianchet, M. 2000. Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behaviour and life history. *Animal Behaviour*, 60, 589-597.
- Realé, D. Reader, S. M., Sol, D., McDougall, P. T. & Dingemanse, N. J. 2007. *Integrating animal temperament within ecology and evolution*. *Biological Reviews*, 82, 291-318.
- Rowland, W. J. 1999. Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. *Environmental Biology of Fish*, 56, 285–305
- Ruiz-Gomez, M. L., Kittilsen, S., Höglund, E., Hutinford, F., Sorensen, C., Pottinger, T. G., Ballen, M., Winberg, S., Korzan, W. J. & Øverli, Ø. 2008. Behavioral plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with divergent coping styles: When doves become hawks. *Hormones and Behavior*, 54, 534-538.
- Sager, D. R., Hocut, C. H., Stauffer, Jr. J. R. 2000. Base and stressed ventilation rates for *Leiostomus xanthurus* Lacépède and *Marone Americana* Gmelin exposed to strobe light. *Journal of Applied Ichthyology*, 16, 89-97.
- Schreck, C. B., Whaley, R. A., Bass, M. L. Maughan, O. E. Solazzi, M. 1976. Physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to electroshock. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 76-84.
- Sneddon, L. U. 2003. The bold and the shy, individual differences in rainbow trout. *Journal Fish Biology*, 62, 971-975.
- Sih A., Bell, A. M., Johnson J. C., Ziemba, R. E. 2004. Behavioral syndromes: An integrative overview. *The Quarterly Review of Biology*, 79, 241–277.
- Svartberg, K. 2002. Shyness-Boldness predicts performance in working dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 79, 157-174.

- Svartberg, K. & Forkman, B. 2002. Personality traits in the domestic dogs (*Canis familiaris*). *Applied Animal Behaviour Science*, 79, 133-155.
- Trainor, B. C., Sisk, C. L. & Nelson, R. J. 2009. Hormones and the development and expression of aggressive behavior. *In: Hormones brain and behavior* 2nd ed., 1, 167-203.
- Tulley, J. J. & Huntingford, F. A. 1988. Additional information on the relationship between intra-specific aggression and antipredator behaviour in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ethology*, 78, 219-222.
- Vera Cruz, E. M. & Brown, C. L. 2007. The influence of social status in the rate of growth, eye color pattern and Insulin-like Growth Factor-I gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Hormones and Behavior*, 51, 611-619.
- Verbeek, M. E. M., Goede, P. de, Drent, P. J. & Wiepkema, P. R. 1999. Individual behavioural characteristic and dominance in aviary groups of great tits. *Behaviour*, 136, 23-48.
- Volpato, G. L., Frioli, P. M. A. & Carrieri, M. P. 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanism. *Boletim Fisiologia Animal*, 13, 17-22.
- Volpato, G. L. & Barreto, R. E. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 1041-1045.
- Volpato G. L., Luchiani, A. C., Duarte, C. R. A., Barreto, R.E. & Ramazini, G. C. 2003. Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 1659-1663.
- Ward, A. J. W., Thomas, P., Hart, P. J. B. & Krause, J. 2004. Correlates of boldness in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, 561-568.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- Webster, M. M., Ward, A. J. & Hart, P. J. B. 2009. Individual boldness affects interspecific interactions in sticklebacks. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 511-520.
- Wilson, D. S., Coleman, K., Clark, A. B. & Biederman, L. 1993. Shy-bold continuum in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*), an ecological study of a psychological trait. *Journal Comparative Psychology*, 107, 250-260.
- Wilson, D. S., Clark, A. B., Coleman, K. & Dearstyne, T. 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology and Evolution*, 9, 442-446.

- Wilson D. S. 1998. Adaptive individual differences within single populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353, 199-205.
- Wilson, D. S. & Stevens, E. D. 2005. Consistency in Context-specific Measures of Shyness and Boldness in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ethology*, 11, 849-862.
- Zayan, R. 1991. The specificity of social stress. *Behavioral Process*, 25, 81-93.