



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



Hesitação e ousadia na tilápia-do-Nilo: identificação, comunicação intraespecífica e papel social

GRAZIELA VALENÇA DA SILVA

Orientador: Dr. Gilson Luiz Volpato

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas
(Zoologia) do Instituto de
Biociências da UNESP -
Campus de Botucatu para
obtenção do título de
Doutor.

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais, **Marly** e **Antônio**, e ao **Joel** por todo
carinho, apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Gilson Luiz Volpato, por todos os ensinamentos ao longo desses anos; pelo seu amor e dedicação pela Ciência; por dispor parte do seu tempo comigo e principalmente pela confiança que depositou em mim. Sou muito grata por tudo que aprendi com você.

Aos meus pais, Marly e Antônio, por sempre apoiarem minhas escolhas e por tudo que fazem por mim. Amo vocês!

Ao Joel, por estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e ajudando no que for preciso; *“Porque era ele, porque era eu”*

Ao meu irmão Gabriel, pelo companheirismo e amizade, e também por socorrer os meus “desenhos”; e a minha cunhada Suelen, pela amizade e por compartilhar comigo momentos muito agradáveis.

Ao Sherlock e ao Mostarda, meus filhotes de quatro patas, que preenchem meus dias e meu coração de alegria.

Aos meus avós Idália, Marcionílio e João (*in memoriam*), por me fazerem entender que realmente a felicidade está nas pequenas coisas. Sinto muitas saudades!

Aos Professores do nosso grupo: Dr^a. Percília Cardoso Giaquinto, Dr. Rodrigo Egidio Barreto, Dr. Katsumasa Hoshino, Dr. Helton Carlos Delicio, Dr^a. Eliane Golçalves-de-Freitas e Dr^a. Marisa Fernandes Castilho pela amizade e pela ajuda ao longo da minha pós-graduação;

À Dr^a. Eliane Golçalves-de-Freitas pela doação de fêmeas de tilápia-do-Nilo utilizadas no Estudo II.

À Dr^a. Silvia Mitiko Nishida por compartilhar comigo suas experiências durante o estágio de docência e ao amigo Dr. Wilson Uieda, por me convidar para ajudar na disciplina de Zoologia de Campo e me proporcionar uma excelente experiência com trabalho de campo e com comportamento de morcegos.

A **todos** meus colegas de laboratório (os de antes e os de agora), pelo convívio e troca de experiências que contribuíram muito para minha formação profissional e pessoal.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia, em especial ao Antônio Carlos Tardivo, por todo auxílio técnico, e à Luciana Spadotto, Janete Teixeira e Meire Darroza pela amizade e por estarem sempre dispostas a nos ajudar.

Ao Ronaldo Tadeu Felliti, que sem dúvida alguma, foi um ponto chave durante meu doutoramento.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação, pelo auxílio nas questões burocráticas. Obrigada pela paciência!

Aos amigos que conquistei em Botucatu, pelos momentos de companheirismo, diversão e leveza. Aos amigos de Bauru (os Roque-Braga, Braga-Volpato, Braga-Hilário e Juliana Capanacci), que me fazem um bem imenso. E aos amigos da graduação, que trago comigo pra sempre: Camilo de Lellis e Cesar Ornelas.

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

Sumário

CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
ESTUDO I.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	4
Resultados.....	8
Discussão.....	11
Referências.....	14
ESTUDO 2.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	18
Resultados.....	23
Discussão.....	27
Referências.....	30
ESTUDO 3.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	37
Discussão.....	40
Referências.....	42

Considerações iniciais

Esta tese é composta por três estudos, em que avaliamos o papel da hesitação e ousadia na tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

No primeiro estudo, buscamos uma forma rápida de identificação dos perfis hesitante e ousados. Assim, avaliamos a associação entre a hesitação e o escurecimento do olho na tilápia-do-Nilo. Concluimos que o olho escuro pode auxiliar na identificação de indivíduos hesitantes. Num segundo estudo, investigamos se o perfil hesitante e ousado de fêmeas de tilápia-do-Nilo influencia sua escolha pelo perfil do macho e, se sinais visuais e olfativos modulam essa escolha. Vimos que as fêmeas de perfil ousado identificam e preferem machos ousados. Essa comunicação é feita por via química, sem participação relevante da via visual. No terceiro estudo, avaliamos como esses perfis afetam a agressividade, a mortalidade e a biomassa produzida em grupos de juvenis com diferentes composições (apenas hesitantes, apenas ousados e mistos). O perfil comportamental influencia nas interações agonísticas do grupo, podendo afetar a ocorrência de mortes, mas não afetando a biomassa dos peixes.

Estudo I
Associação entre hesitação e
escurecimento do olho na tilápia-do-
Nilo

Associação entre hesitação e escurecimento do olho na tilápia-do-Nilo

Resumo

Avaliamos a associação entre o escurecimento do olho e a hesitação na tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. Para isso, mensuramos a porcentagem de escurecimento da esclera (cor do olho basal) de 48 peixes, que estavam isolados por 4 dias. Em seguida, avaliamos a hesitação e ousadia por meio do teste do objeto novo. Após 24 h, mensuramos novamente a cor do olho (cor pré-hipóxia) e submetemos o peixe a estressor (hipóxia: 2 min fora d'água), registrando a cor do olho imediatamente após esse estressor (cor pós-hipóxia). Ao retornarem ao aquário, avaliamos o tempo para o olho retornar à cor pré-hipóxia. O tempo despendido na exploração do objeto variou de 0 a 570 s. Desses dados, identificamos peixes hesitantes (1º quartil: Q1=0 a 10 s) e ousados (3º quartil: Q3=231 a 570 s). Os hesitantes tinham o olho mais escuro antes do teste do objeto novo (cor basal) e antes do estressor (pré-hipóxia). Com a hipóxia, todos os peixes escureceram o olho, mas o retorno à cor pré-hipóxia demorou mais nos hesitantes. O sexo não interferiu nessas respostas. Concluimos que o escurecimento do olho está associado à hesitação na tilápia-do-Nilo, o qual pode ser um indicador desse traço de personalidade.

Palavras-chave: Personalidade; ciclídeos; estresse; coloração

Introdução

Diferenças no perfil de personalidade têm implicações importantes na vida dos animais. Essas diferenças influenciam como o animal reage à novidade, como evita predadores e como interage socialmente (Réale *et al.*, 2000). Além disso, podem afetar o sucesso reprodutivo e a sobrevivência dos indivíduos (Smith & Blumstein, 2008; Cote *et al.*, 2010), podendo ser vantajosas em algumas situações (como na ousadia para aquisição de recursos) e desvantajosas em outras (exploração de área com alto risco de predação) (Wilson *et al.*, 1993).

Uma das dimensões em estudos sobre personalidade é a tendência para explorar uma novidade (Wilson *et al.*, 1994; Wilson & Stevens 2005). Indivíduos hesitantes reagem à novidade reduzindo os níveis de atividade, retraindo-se ou tornando-se mais vigilantes, enquanto indivíduos ousados exploram a nova situação (Wilson *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2007). Durante experimentos realizados com tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, frente a objeto novo, percebemos que peixes que hesitam em explorar o objeto, ficando em um canto do aquário, ou exibindo comportamento de congelamento (*freezing*), geralmente apresentam o olho escuro no início dos testes; enquanto peixes mais ativos, que exploram mais a novidade, têm o olho mais claro.

Para acessar o perfil de personalidade dos indivíduos, são necessários testes que indiquem claramente que se trata de um perfil. Basicamente, as diferenças comportamentais devem seguir um padrão de consistência, seja no tempo ou em diferentes contextos (Budaev & Zworykin, 2002; Castanheira *et al.*, 2013) de forma a se inferir o perfil de personalidade. Mas esses testes demandam tempo e um elevado número de animais precisa ser testado. Assim, encontrar nos animais sinais preditivos de seu perfil facilitaria muito a identificação dos perfis na população, tornando mais viável a inclusão da variável personalidade em diversos estudos biológicos.

Diante do exposto, avaliamos a possibilidade do escurecimento da cor do olho da tilápia-do-Nilo ser um sinal preditivo da hesitação e ousadia frente a novas situações. Sabe-se que o escurecimento do olho pode estar associado ao status social e ao estresse (Suter & Hutinford, 2002; Volpato *et al.*, 2003; Vera Cruz & Brown, 2007; Freitas *et al.*, *in press*). No estresse há aumento dos níveis de cortisol plasmático (Pottinger & Pickering, 1992; Barreto & Volpato, 2006) e concomitantemente aumento nos níveis de α -MSH, hormônio que modula a dispersão de cromatóforos, resultando no escurecimento da pele (Hoglund *et al.*, 2000). Embora os mecanismos da coloração do

olho dos peixes não tenham sido ainda desvendados, é possível que o estresse possa ter efeito similar nessa coloração, uma vez que o escurecimento do olho está associado aos níveis de estresse social (Volpato *et al.*, 2003; Miyai *et al.*, 2011) e físico (Freitas *et al.*, *in press*). Seguindo essa linha de raciocínio, podemos esperar que alguns peixes possam ser mais sensíveis às variações ambientais, ativando mais precocemente as vias de estresse. Ou seja, supomos que nos peixes hesitantes as reações de escurecimento (resposta de estresse) sejam mais frequentes, podendo ser usadas como preditivas da personalidade hesitante.

Material e Métodos

Sujeitos e manutenção dos animais

Exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), provenientes de piscicultura comercial durante a fase juvenil foram mantidos em biotério por cerca 10 meses, onde permaneceram em tanques de 1000 L (~ 1 peixe/5 L), com aeração constante, filtro biológico, temperatura ~ 26°C, amônia < 0,04 ppm e fotoperíodo das 06:00 h às 18:00 h, fornecido por luz fluorescente (~ 350 lux). Alimentamos os peixes uma vez ao dia (3 % da biomassa) com ração extrusada para peixes tropicais (36 % proteína bruta).

Delineamento Geral

A estratégia consistiu em investigar a associação entre o escurecimento do olho e a hesitação em machos e fêmeas adultos de tilápia-do-Nilo. O delineamento do experimento está esquematizado na figura 1.

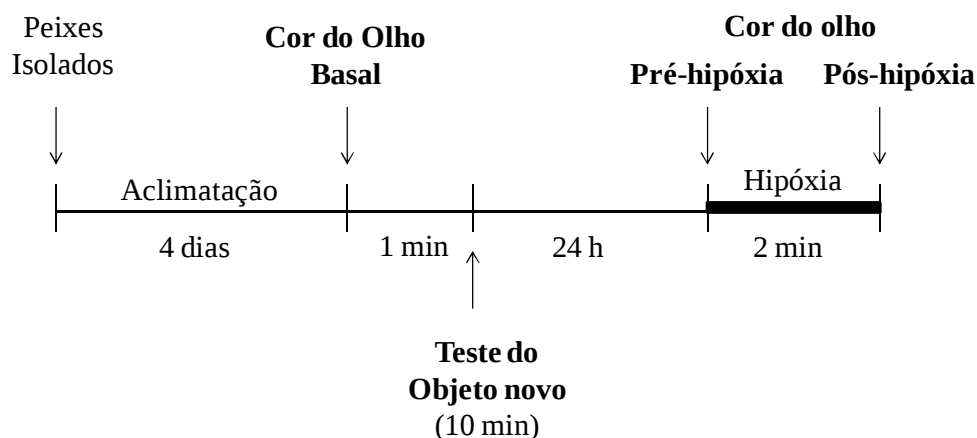


Figura 1. Delineamento geral do experimento. Individualizamos 25 machos ($31,0 \text{ g} \pm 5,7 \text{ g}$) e 23 fêmeas: ($29,1 \text{ g} \pm 2,9 \text{ g}$) (Teste t de Student, $t = 1,57$; $p = 0,13$) em aquário de vidro (40 cm x 20 cm de base x 25 cm de altura) durante todas as fases do estudo, sendo alimentados (3 % de peso corporal) apenas nos períodos da manhã durante a aclimação. Medimos a cor do olho em três momentos, cujos valores foram posteriormente associados com o perfil de personalidade detectado no teste do objeto novo. A cor do olho era medida diretamente pelo observador e a resposta ao objeto novo era filmada para posterior observação.

Procedimentos específicos

Estimativa do escurecimento do olho

A tilápia-do-Nilo tem o olho composto por uma pupila central circundada pela íris e esclera, que varia claramente do pálido ao escuro (Volpato *et al.*, 2003). Assim, quantificamos a porcentagem de escurecimento da esclera (baseado em Suter & Huntingford, 2002 e Volpato *et al.*, 2003). Para tanto, desenhemos a área circular do olho e dividimos a região em 4 diâmetros que resultaram em 8 áreas iguais. As observações consistiram em preencher o desenho de acordo com o padrão de escurecimento do olho (esquerdo ou direito, visto que a resposta é igual entre os olhos), calculando posteriormente a porcentagem de área escura (Figura 2).

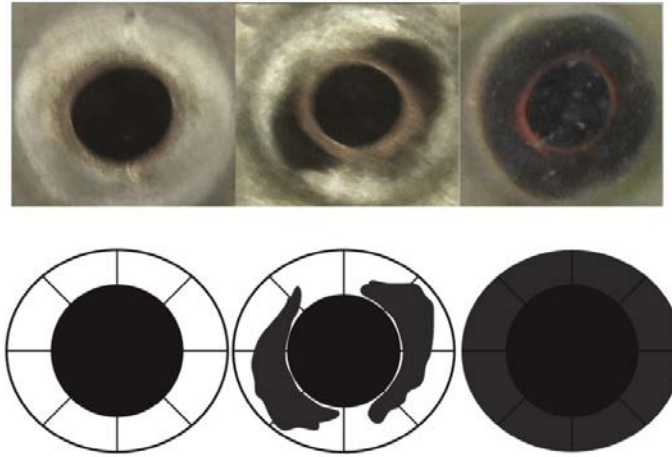


Figura 2. Exemplo do cálculo do escurecimento do olho. Do olho dos peixes (fotos acima) fazíamos o desenho (abaixo), do qual calculávamos o percentual de área escura da esclera (cada região preenchida representava 12,5 % de escurecimento do olho).

Teste do objeto novo

Este teste tem sido amplamente usado para avaliar hesitação e ousadia em humanos e outros animais, incluindo peixes (Wilson *et al.*, 1994; Sneddon *et al.*, 2003; Galhardo *et al.*, 2012). O aquário utilizado está na figura 3. Quando os peixes estavam em uma das extremidades do aquário (região até L1), introduzíamos subitamente o objeto novo no lado oposto e filmávamos por 10 min sua reação. Das filmagens, quantificamos o tempo despendido pelo peixe explorando o objeto novo, definido pela parte frontal da cabeça encostada no objeto ou direcionada a ele, sempre dentro da área delimitada por L2. Todas as observações foram feitas no período da manhã (entre 08:30 h e 11:30 h) para evitar possíveis influências do ritmo circadiano.

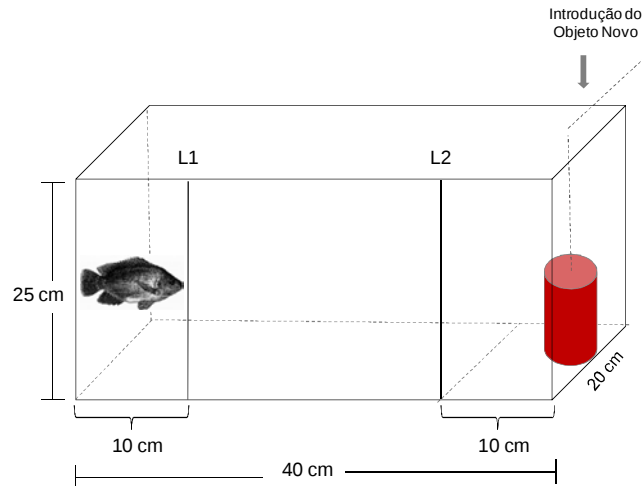


Figura 3. Esquema geral do aquário teste. A parede frontal do aquário foi dividida por linhas externas verticais em 3 regiões. A linha 1 (L1) delimitava a posição inicial do peixe; a linha 2 (L2) delimitava a região do objeto novo (cilindro de PVC Ø=6 cm, 8 cm comprimento, encapado com TNT vermelho).

Estressor

Para criar um estressor de exposição ao ar, logo após medirmos a cor do olho, capturávamos o peixe por meio de uma pequena rede (puçá) e o mantínhamos fora d'água (~ 2 cm acima da superfície da água) por 2 min dentro do puçá (baseado em Barreto & Volpato, 2007). Em seguida, devolvíamos o peixe ao aquário e imediatamente registrávamos a cor do olho.

Análise de dados

Utilizamos correlação de Spearman para avaliar a associação entre a cor do olho e o tempo explorando o objeto novo. Como não obtivemos correlação significativa (menor $p = 0,31$), investigamos se os peixes nos extremos das respostas apresentavam correspondência entre as variáveis. Para isso, determinamos os peixes dos extremos por meio dos quartis Q1 e Q3. Assim, Q1 (quartil inferior, menores tempos em exploração) representou os peixes hesitantes e Q3 (quartil superior, maiores tempos de exploração), os ousados. Dos peixes de cada quartil, calculamos suas respostas em termos de coloração do olho e resposta à hipóxia (estressor), comparando essas médias (ou medianas) entre os quartis (hesitantes e ousados).

Utilizamos o teste de Goodman para comparar a proporção de machos e fêmeas em cada perfil e ANOVA de duas vias para análise da cor do olho de machos e fêmeas hesitantes ou ousados. A coloração do olho (basal, pré-hipóxia e pós-hipóxia) apresentou distribuição não normal (Kolmogorov-Smirnov's) e heterocedástica (Levene's). Assim, comparamos os dados dos peixes hesitantes (Q1) e ousados (Q3) pelo teste de Mann-Whitney. Calculamos a variação da cor olho entre os momentos pré e pós-hipóxia em cada perfil e, para respeitar a homocedasticidade, transformamos os dados extraíndo a raiz quadrada e transformando em arcoseno. Para análise do retorno à cor pré-hipóxia, transformamos os dados utilizando $\log_x$ e, assim, aplicamos teste t de Student para comparação da variação (pós-hipóxia menos pré-hipóxia) e retorno à cor pré-hipóxia.

Posteriormente, fizemos uma análise inversa, *i.e.*, separamos as respostas de coloração basal do olho por meio de quartis e comparamos, usando o teste de Goodman, a proporção de indivíduos dos perfis hesitante, intermediário e ousado com olho claro ou escuro. Em todas as análises do estudo, consideramos o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Resultados

O tempo explorando o objeto variou de 0 s a 570 s. Os peixes hesitantes variaram esse tempo de 0 s a 10 s (Q1) e os ousados de 231 s a 570 s (Q3). A proporção de machos e fêmeas foi igual em cada perfil (Teste de Goodman, $p > 0,05$) e não houve diferença na cor do olho de machos e fêmeas hesitantes e ousados (ANOVA de duas vias, $F = 0,24$, $p = 0,62$). Por isso, apresentamos os resultados sem distinção entre os sexos.

Os peixes hesitantes tinham a cor do olho mais escura antes da introdução do objeto (cor basal; Figura 4A) e antes da hipóxia (cor pré-hipóxia, Figura 4B).

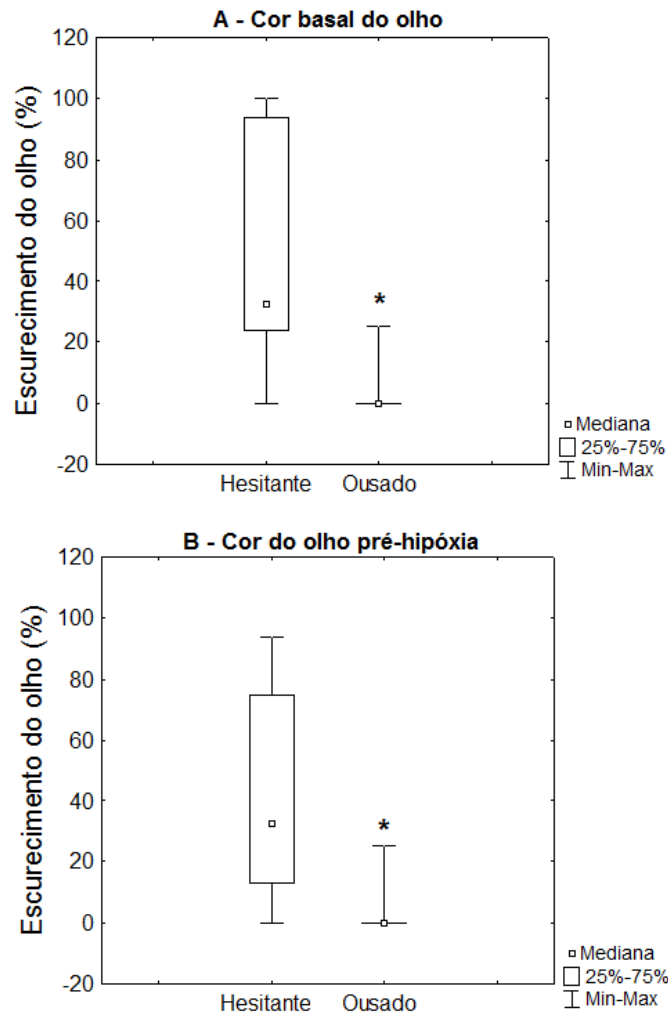


Figura 4. Box plot da porcentagem de escurecimento do olho. As extremidades superiores e inferiores das caixas representam os percentis 75% e 25%. As barras representam a amplitude dos dados. A linha central representa a mediana. * Indica diferença (Mann-Whitney $U = 23,0$; $Z = 2,99$; $p = 0,003$ e $U = 17,5$; $Z = 3,3$; $p = 0,001$, respectivamente).

Após a hipóxia, todos os peixes escureceram o olho em igual proporção (Mann-Whitney, $U = 65,0$; $Z = 0,40$; $p = 0,68$, Figura 5A). Em função disso, avaliamos a variação da cor do olho entre os momentos pré e pós-hipóxia para os dois perfis e detectamos que os animais ousados tiveram um maior aumento dessa frequência em

relação aos hesitantes (Figura 5B). No entanto, o tempo para a cor do olho retornar à coloração pré-hipóxia demorou mais nos peixes hesitantes (Figura 6).

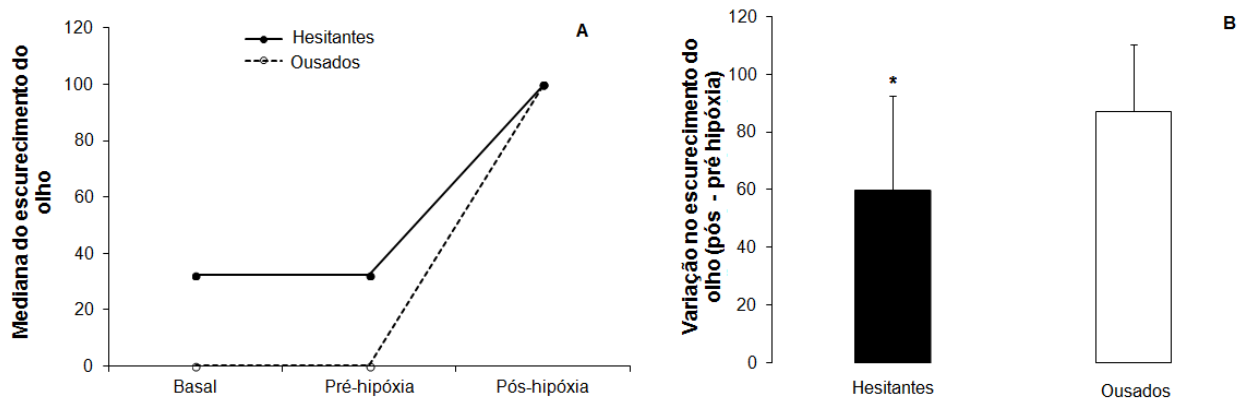


Figura 5. (A) Mediana do escurecimento do olho ao longo dos testes e (B) Variação no escurecimento do olho em cada perfil. N = 12 peixes de cada perfil. (B) Dados médios ($\pm$ dp). *Indica diferença significativa entre os perfis (Teste *t* de Student, $t = 2,73$; $p = 0,01$).

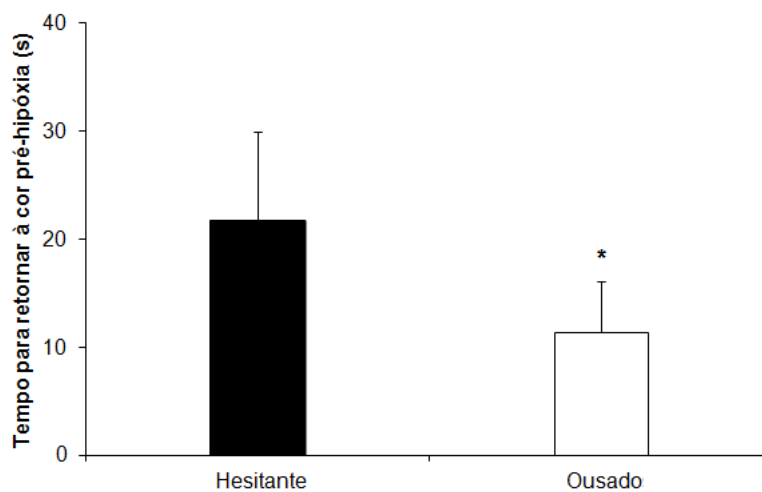


Figura 6 - Tempo (s) para o olho retornar à cor pré-hipóxia. Dados médios ($\pm$ dp), $n = 12$ peixes de cada perfil. * indica diferença significativa entre os perfis (Teste *t* de Studet, $t = 3,58$; $p = 0,01$).

Na análise inversa, separamos as respostas da cor basal do olho por meio de quartis e comparamos com os perfis de personalidade. Vimos que entre os indivíduos ousados e intermediários, a cor do olho prevaleceu clara e, comparando as três

categorias de perfil hesitação-ousadia, os hesitantes têm maior proporção de peixes com olho escuro (Figura 7).

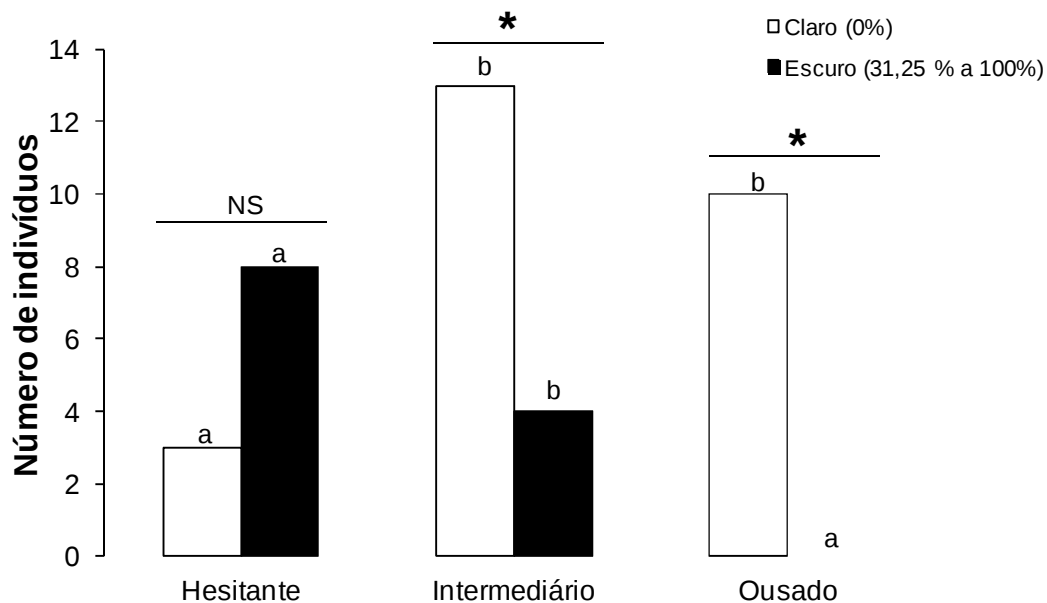


Figura 6 – Proporção de indivíduos com olho claro ou escuro em cada perfil. * indica diferença dentro dos perfis de personalidade letras diferentes indicam diferença entre os perfis (Goodman, $p < 0,05$). NS = diferença não significativa dentro do perfil.

Discussão

Aqui mostramos que há associação entre a hesitação e o escurecimento do olho na tilápia-do-Nilo, corroborando nossas observações de que os peixes com olho escuro hesitam em se aproximar ou exploraram pouco a novidade. Ao contrário, a maioria dos indivíduos ousados apresenta o olho completamente claro. Também demonstramos que, após um agente estressor (hipóxia), o reestabelecimento da cor do olho aos padrões de pré-hipóxia é mais lento nos indivíduos hesitantes, indicando que esses peixes podem ter maior dificuldade ao se ajustar a novas situações ou após situações aversivas. Além disso, nossos resultados também mostram que a relação entre o perfil de personalidade e a coloração do olho independe do sexo dos animais. Machos e fêmeas apresentaram o mesmo padrão de coloração do olho, o que pode indicar que o ajuste a novas condições esteja mais ligado a diferenças no perfil de personalidade do que ao sexo dos animais.

O escurecimento do olho em peixes tem sido ligado ao estresse social em algumas espécies (Suter & Huntingford, 2002; Volpato *et al.*, 2003; Vera Cruz & Brown, 2007; Miyai *et al.*, 2011): indivíduos subordinados escurecem o olho, enquanto que nos dominantes ele permanece claro. Além disso, a cor do olho não está ligada apenas a estresse social, mas também a estresse físico (Freitas *et al.*, *in press*). As situações aversivas a que esses animais estão sujeitos (como mudança no ambiente ou conflito social) podem induzir mudanças na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal, levando ao aumento dos níveis de cortisol plasmático (Pottinger & Pickering, 1992) e, concomitantemente, ao aumento dos níveis de α -MSH, resultando na alteração da coloração da pele (Hoglund *et al.*, 2000) e, possivelmente, afetando também a cor do olho. Como os indivíduos hesitantes apresentam ajuste mais lento a novas situações e são mais responsivos ao estresse (Koolhaas *et al.*, 1999; Øverli *et al.*, 2007), é plausível pensar que distúrbios no ambiente podem levar a uma resposta de estresse mais acentuada nesses indivíduos e, como consequência, um maior escurecimento do corpo e do olho.

Mesmo constatando que a maioria dos peixes com olho escuro é hesitante, nossos dados indicam que há exceções. Dentre os peixes testados, três indivíduos que não se aproximaram do objeto novo tinham o olho claro. De fato, o perfil hesitação-ousadia se distribui ao longo de um contínuo (Wilson *et al.*, 1993), com o perfil comportamental dos indivíduos variando de extremamente hesitante a extremamente ousado. Dentre os peixes hesitantes, há aqueles com perfil extremo e outros que, apesar de hesitantes, não estão nos extremos do contínuo, podendo ter maior plasticidade. Da mesma maneira, os indivíduos extremamente ousados são aqueles com ajuste mais rápido. Segundo Wilson *et al.* (1993), peixes que, no ambiente natural, exploraram mais rapidamente um objeto novo se aclimataram mais rapidamente a um novo ambiente (condições de laboratório), indicando melhor capacidade de ajuste nos indivíduos desse perfil.

Como existe uma associação entre a hesitação e a resposta ao estresse (Koolhaas *et al.*, 1999), esperávamos que os peixes hesitantes reagissem mais fortemente ao estressor, ficando com o olho mais escuro que os peixes ousados. No entanto, após a hipóxia fora d'água, os peixes de ambos os perfis escureceram 100% o olho em igual proporção; porém, a variação na coloração foi maior nos peixes ousados. A menor variação nos peixes hesitantes se deve ao fato de que o escurecimento já estava alto na fase pré-hipóxia. Com isso, é possível que o estressor usado tenha sido forte o suficiente para encobrir possíveis modulações da resposta de coloração feitas por traços hesitação-

ousadia. Apesar disso, o retorno do olho à cor pré-hipóxia demorou mais nos peixes hesitantes, indicando que o efeito do estressor é mais forte nos indivíduos desse perfil.

O protocolo que adotamos para mensurar o retorno do olho à cor pré-hipóxia foi baseado no registro do tempo de clareamento após o retorno do peixe ao aquário (pós hipóxia). Esse retorno era relativamente rápido (segundos), porém não quantificamos como a cor se mantinha ao longo das horas. Ao contrário, Freitas *et al.* (*in press*) avaliaram o retorno à cor pré-hipóxia na tilápia-do-Nilo (sem considerarem os perfis de personalidade), encontrando que machos reestabeleceram o padrão pré-hipóxia 15 min após o estressor, enquanto as fêmeas demoram 3 h. Nesse estudo, os autores fizeram registros pontuais em vários momentos após o estressor, mas não registraram o que acontece imediatamente após ele. O que percebemos é que o olho dos peixes clareia logo que retornam ao aquário, mas algum tempo depois podem ficar escuros novamente. Nesse sentido, estudos adicionais seriam necessários para o total entendimento desse fenômeno.

Diante do exposto, concluímos que o escurecimento do olho está associado à hesitação na tilápia-do-Nilo. A modulação do escurecimento do olho em peixes pode ser consequência do estresse imposto por contextos aversivos ou sociais. No entanto, mais estudos são necessários para confirmação dos mecanismos fisiológicos (cortisol e α -MSH) envolvidos nesse escurecimento. Mesmo que todos os indivíduos hesitantes não apresentem o olho escuro, a cor do olho pode auxiliar na separação e escolha do perfil de personalidade hesitante antes da experimentação.

Referências

- Barreto, R. E., & Volpato, G. L. 2006. Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Brazilian journal of medical and biological research*, **39(12)**, 1605-1612.
- Barreto, R. E. & Volpato, G. L. 2007. Evaluating feeding as unconditioned stimulus for conditioning of an endocrine effect in Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, **92**, 867-872.
- Brown, C., Jones, F. & Braithwite, V. 2007. In situ examination of boldness-shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyrhaphis episcopa*. *Animal Behavior*, **70**, 1003-1009.
- Budaev, S. V. & Zworykin, D. D. 2002. Individuality in fish behavior: Ecology and comparative psychology. *Journal of Ichthyology*, **42**, 189-195.
- Castanheira, M. F., Herrera, M. Benjamin, C., Conceição, L. E. C. & Martins, C. I. M. 2013. Can We Predict Personality in Fish? Searching for consistency over time and across contexts. *Plos one*, **8(4)**, e62037.
- Cote, J., Fogarty, S., Weinersmith, K., Brodin, T. & Sih, A. 2010. Personality traits and dispersal tendency in the invasive mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Proceedings of the Royal Society of London B*, **277**, 1571-1579.
- Freitas, R. H. A., Negrão, C. A., Felício, A. K. & Volpato, G. L. 2014. Eye darkening as a reliable, easy and inexpensive indicator of stress in fish. *Zoology*, 3 (no prelo).
- Galhardo, L., Vitorino, A. & Oliveira, R. F. 2012. Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. *Biology Letters*, **8(6)**, 936-938.
- Hoglund, E., Balm, P. H. M. & Winberg, S. 2000. Skin darkening, a potential social signal in subordinate Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. *Journal of Experimental Biology*, **203**, 1711-1721.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., *et al.* 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **23**, 925-935.
- Miyai, C. A., Sanches, F. H., Costa, T. M., Colpo, K. D., Volpato, G. L. & Barreto, R. E. 2011. The correlation between subordinate fish eye colour and received attacks: a negative social feedback mechanism for the reduction of aggression during the formation of dominance hierarchies. *Zoology*, **114(6)**, 335-339.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K. G. T., Pottinger, T.G., Korzan, W., *et al.* 2007. Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, **31**, 396-412.

- Pottinger, T. G. & Pickering, A. D. 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology*, **41**, 435-447.
- Réale, D., Gallant, B. Y., Leblanc, M. & Festa Bianchet, M. 2000. Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behaviour and history. *Animal Behaviour*, **60**, 589-597.
- Smith, B. R. & Blumstein, D. T. 2008. Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, **19**, 448-455.
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A. & Gentle, M. J. 2003. Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. *Journal of Pain*, **4**, 431-440.
- Suter, H. C. & Huntingford, F. A. 2002. Eye color in juvenile Atlantic salmon: effects of social status, aggression and foraging success. *Journal of Fish Biology*, **61**, 606-614.
- Vera Cruz, E. M. & Brown, C. L. 2007. The influence of social status on 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.
- Volpato, G. L., Luchiari, A. C., Duarte, C. R. A., Barreto, R. E. & Ramanzini, 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.
- 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, A. D. M. & Stevens, E. D. 2005. Consistency in context-specific measures of shyness and boldness in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ethology*, **111**(9), 849-862.

Estudo II
Preferência das fêmeas baseado em
sinais olfativos de machos hesitantes e
ousados de tilápia-do-Nilo.

Preferência das fêmeas baseado em sinais olfativos de machos hesitantes e ousados de tilápia-do-Nilo.

Resumo

Investigamos se o perfil hesitante e ousado de fêmeas de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, influencia sua escolha pelo perfil do macho e, se sinais visuais e olfativos modulam essa escolha. Para acessar o perfil de personalidade (hesitação/ousadia) aplicamos o teste do objeto novo, avaliando a resposta de cada peixe em dois testes consecutivos. Do conjunto de respostas selecionamos os peixes hesitantes (evitam a novidade) e ousados (são atraídos pela novidade) que foram consistentes nos dois testes. Então, avaliamos a escolha das fêmeas em dois experimentos. No primeiro, as fêmeas apenas visualizam os machos. No segundo, elas recebiam odor (sinal químico) do macho liberado na água, sem visualizá-los. Quando o tempo de permanência em um dos compartimentos era significativamente maior, nos indicava a preferência por ele. No experimento I (sinais visuais), não houve preferência por nenhum perfil. Já no experimento II (sinais químicos), as fêmeas ousadas preferiram machos do mesmo perfil, enquanto fêmeas hesitantes não tiveram preferência. Concluimos que na tilápia-do-Nilo, as fêmeas de perfil ousado identificam e preferem machos ousados. Essa comunicação é feita por via química, sem grande participação da via visual.

Palavras-chave: síndrome comportamental, exploração, ciclídeo, seleção sexual

Introdução

Animais de diversos taxa exibem alguns comportamentos consistentes ao longo do tempo e/ou situações que, dessa maneira, se constituem em padrões de personalidade. Em peixes, uma das dimensões de personalidade é a hesitação e ousadia, que é a tendência para explorar, tanto novos ambientes, itens alimentares ou novos objetos (Wilson *et al.*, 1994; Wilson & Stevens, 2005). Os indivíduos ousados são atraídos pela novidade e destemidos frente a situações potencialmente perigosas, enquanto indivíduos hesitantes evitam essas situações (Wilson *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2007), possivelmente por medo ou ansiedade.

Indivíduos ousados, ao explorarem mais, podem obter vantagens na captação de recursos (como abrigo e alimentação). Fraser *et al.* (2001) mostraram que indivíduos ousados de “killifish”, *Rivulus hartii*, dispersam mais, crescem mais rápido e têm maior sucesso adaptativo, comparados aos hesitantes. Além disso, há correlação positiva entre a ousadia e a massa corpórea (Brown *et al.*, 2007). Se o perfil comportamental de um indivíduo pode afetar seu sucesso adaptativo (Godin & Dugatkin, 1996; Budaev *et al.*, 1997), é plausível pensar que a formação de pares entre indivíduos de determinados perfis possa ser mais vantajosa. Dessa forma, por exemplo, as fêmeas poderiam obter mais benefícios em copular com machos ousados, pois eles têm melhor perfil competitivo na aquisição de recursos.

Com base nisso, nosso objetivo foi testar se o perfil hesitante ou ousado de fêmeas influencia sua escolha pelo perfil do macho. Tais testes foram feitos no peixe tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, onde os perfis hesitante e ousado foram claramente mostrados (Valença-Silva, 2010). Num primeiro experimento vimos que a visualização dos machos pelas fêmeas não foi estímulo suficiente para que as fêmeas escolhessem por machos de algum perfil. Porém, antes que descartássemos por completo essa hipótese, investigamos se outra modalidade sensorial não poderia ser mais relevante nesse caso. Note que a tilápia-do-Nilo não apresenta um dimorfismo sexual de coloração evidente, ao contrário do que ocorre em outras espécies que usam sinais visuais para escolha de parceiros (Endler, 1983; Hounde & Endler, 1990; Godin & Dugatkin, 1996). Como alguns estudos têm mostrado grande participação da comunicação química intraespecífica nessa espécie (Giaquinto & Volpato, 1997; Giaquinto *et al.*, 2010; Barcellos *et al.*, 2011), testamos também essa via sensorial no reconhecimento e escolha de perfis de personalidade pela fêmea.

Material e Métodos

Sujeitos e condições de manutenção

Exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), provenientes de piscicultura comercial durante a fase de juvenis foram mantidos em biotério por cerca 7 meses, onde permaneceram em tanques de 1000 L (1 peixe/5 L), com aeração constante, filtro biológico, temperatura ~ 26°C, amônia < 0,04 ppm, e fotoperíodo das 06:00 h às 18:00 h, fornecido por luz fluorescente (~ 350 lux). Alimentamos os peixes uma vez ao dia (3 % da biomassa) com ração extrusada para peixes tropicais (36 % proteína bruta). Desse lote foram selecionados os machos usados no estudo. As fêmeas foram trazidas já adultas, pré-selecionadas pelo sexo, da Mini-Estação de Piscicultura do IBILCE, CAUNESP, São José do Rio Preto-SP e mantidas separadas dos machos, mas nas mesmas condições de armazenamento. 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).

Todos os procedimentos foram feitos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA. Ambos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu-SP, protocolo número 557.

Delineamento Geral

Para testar se o perfil hesitante ou ousado de fêmeas de tilápia-do-Nilo influencia sua escolha pelo perfil do macho e se sinais visuais e olfativos modulam essa escolha, realizamos dois experimentos (grupos independentes). Em ambos os experimentos, identificamos o perfil hesitante/ousado de machos e fêmeas por meio do teste do objeto novo, onde avaliamos individualmente cada peixe em relação ao tempo despendido na exploração do objeto. Para atribuir um determinado perfil, é necessário que ele se repita ao longo do tempo ou em diferentes contextos (Réale *et al.*, 2007). Assim, selecionamos os perfis consistentes, avaliando o comportamento de cada peixe em dois testes consecutivos (intervalo de 24 h). Usamos objetos diferentes em cada um desses testes para evitar possíveis efeitos de aprendizagem. Ao final, cada peixe classificado como hesitante ou ousado permanecia no aquário por 24 h, quando era transferido para outro aquário para ser testado quanto à escolha de parceiro (visual ou químico, dependendo do experimento).

No primeiro experimento, avaliamos se o perfil de personalidade das fêmeas interfere em suas escolhas, por meio de sinais visuais, pelo perfil do macho. Os tamanhos e as diferenças percentuais médias desses animais são mostrados na Tabela 1. O sistema de teste e o delineamento experimental são apresentados na Figura 1.

No segundo experimento, testamos a mesma ideia, porém especificamente pela comunicação química entre machos e fêmeas. Os peixes empregados neste experimento não foram os utilizados no experimento 1. O tamanho dos animais, bem como as diferenças percentuais médias das réplicas é apresentado na Tabela 1. O esquema de teste e o detalhamento do delineamento são mostrados na Figura 2.

Para cada fêmea testada utilizamos duplas diferentes de machos hesitantes e ousados e, em cada teste, invertemos a posição dos machos para evitar influencia da lateralidade.

Tabela 1 – Pesos (g) dos indivíduos em cada experimento e diferenças percentuais médias em relação ao macho doador.

Experimentos	Diferenças com o macho doador				
	Sexo	Perfil	Peso (g) $\pm$ dp	Hesitante	Ousado
I	Fêmea	Hesitante	35,3 $\pm$ 0,4	9,6 %	10,2 %
		Ousado	35,5 $\pm$ 0,5	11,5 %	12,4 %
	Macho	Hesitante	38,8 $\pm$ 2,7	-	2,3 %
		Ousado	39,5 $\pm$ 1,3	1,5 %	-
II	Fêmea	Hesitante	37,5 $\pm$ 2,2	9,0 %	8,4 %
		Ousado	37,7 $\pm$ 1,9	8,8 %	8,4 %
	Macho	Hesitante	39,0 $\pm$ 2,2	-	1,8 %
		Ousado	38,7 $\pm$ 2,3	1,0 %	-

Todos os animais testados tinham pesos similares (Teste *t* de Student, $p > 0,05$). As duas últimas colunas se referem à diferença percentual dos machos doadores (visual ou químico) em relação ao peso das fêmeas e dos machos de cada dupla. N = 12 fêmeas e 24 machos de cada perfil (experimento I) e 20 fêmeas e 40 machos de cada perfil (experimento II).

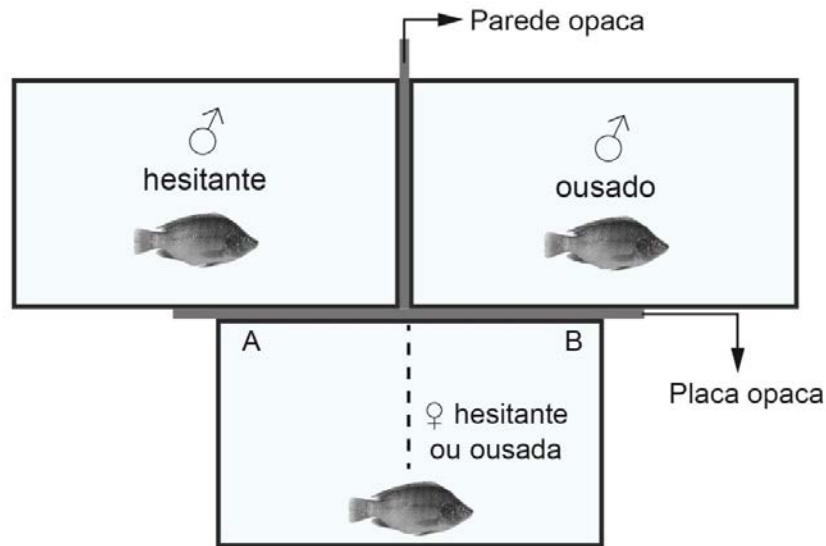


Figura 1. Experimento 1 – Vista superior dos aquários de testes. Medidas: 40 cm x 20 cm de base e 25 cm de altura. Os machos não possuíam contato entre si. Inseríamos a fêmea por 1 h antes dos testes para ajustes, sem possibilidade de visualizar os machos. Em seguida, com um cilindro transparente ($\varnothing = 15$ cm, aberto nos dois lados) aprisionávamos as fêmeas no centro do aquário por 1 min; após a retirada do cilindro, registrávamos o tempo despendido pela fêmea em cada lado desse aquário (A ou B). Novamente aprisionávamos a fêmea no cilindro, retirando-se agora a placa opaca. Decorrido 1 min, liberávamos a fêmea e registrávamos, por 20 min, o tempo despendido por ela nas regiões A ou B. Realizamos o procedimento duas vezes para cada fêmea (manhã e tarde). Ao final, aferíamos novamente o sexo dos animais. N = 12 fêmeas de cada perfil.

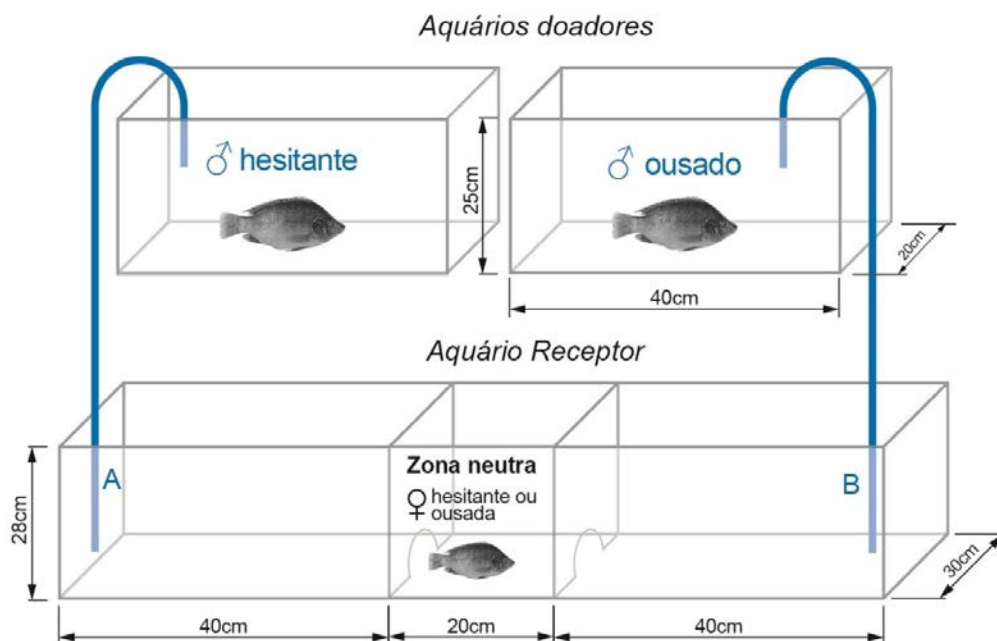


Figura 2. Experimento 2 – Esquema Geral do aquário de testes. O aquário receptor foi dividido em 3 compartimentos: dois laterais (que receberiam água de machos) e um central (zona neutra), com portas que permitiam o acesso aos compartimentos laterais. Conectamos os compartimentos laterais aos aquários doadores, dispostos acima do aquário receptor, por meio de tubos de silicone ($\varnothing = 2,5$ cm). Inseríamos os machos hesitantes e ousados nos aquários doadores por 3 h antes da transferência de água. As fêmeas eram inseridas no compartimento central, com as portas de acesso fechadas por placas opacas, por 1h. Em seguida, retirávamos as placas e registrávamos o tempo despendido pela fêmea em cada compartimento por 5 min. Após, deslocávamos as fêmeas para a zona neutra e, depois de 1 min, iniciávamos a transferência de água (fluxo de 3 ml/min), registrando: (a) latência para visitar o primeiro compartimento, (b) posição da fêmea a cada 15 segundos e (c) tempo total despendido em cada compartimento durante 20 min. Um teste realizado com corante mostrou que a água leva 10 minutos para se misturar com os três compartimentos. Ao final, aferíamos novamente o sexo dos animais. N = 20 fêmeas de cada perfil.

Procedimentos específicos

Seleção dos animais – Teste do objeto novo (experimentos 1 e 2)

Para identificar peixes hesitantes e ousados, usamos o teste do objeto novo. Trata-se de um teste amplamente usado para avaliar hesitação e ousadia em humanos e outros animais, incluindo peixes (Wilson *et al.*, 1994; Sneddon *et al.*, 2003; Galhardo *et al.*, 2012). Assim, individualizamos os peixes em aquário de vidro (40 cm x 20 cm de base x 25 cm de altura, veja figura 3 do estudo 1 desta tese) por 3 dias para aclimação.

Nesse tempo, alimentamos os peixes uma vez ao dia, no período da manhã (3 % do peso corporal). Decorrido o período de aclimação, aplicamos o primeiro teste do objeto novo (cilindro de PVC vermelho, de Ø = 8 cm) e 24 h depois, o segundo teste (retângulo plástico amarelo de 10 cm x 4 cm). Quando os peixes estavam em uma das extremidades (região até L1), introduzíamos subitamente o objeto no lado oposto e registrávamos por 5 min, o tempo despendido na exploração objeto.

Em cada amostragem, ordenamos os tempos de exploração do objeto novo do menor ao maior valor e, então, separamos os valores em quartis. O primeiro quartil (menores tempos de exploração) representou os peixes hesitantes e o terceiro quartil (maiores tempos de exploração), os ousados. Nos dois experimentos, utilizamos apenas os peixes que apresentaram o mesmo perfil nos dois testes consecutivos. Mostramos na tabela 2 os valores médios obtidos para cada perfil, reforçando a validade dessa separação.

Tabela 2 - Tempo (s) despendido na exploração do objeto novo

Sexo	Perfil	Experimento 1		Experimento 2	
		Teste I	Teste II	Teste I	Teste II
Fêmea	Hesitante	2,2±4,4	1,3±1,7	0,5±1,6	0,0
	Ousado	134,0± 46,0*	124,0±41,0*	151,0±49,0*	150,0±57,0*
Macho	Hesitante	1,6±5,6	1,0±0,4	0,5±1,4	0,4±1,2
	Ousado	190,0±50,0*	156,0±36,0*	154±62*	147,0±54,0*

Comparamos os valores médios ($\pm$ dp) dos quartis entre os perfis hesitante e ousado para fêmeas e machos nos dois experimentos. * Análise de Mann-Whitney indicou diferença entre hesitantes e ousados em todos os testes ($p < 0,0001$). N = 12 fêmeas e 24 machos de cada perfil (experimento I) e 20 fêmeas e 40 machos de cada perfil (experimento II).

Análise de Dados

Utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene's para avaliar a normalidade e a homocedasticidade, respectivamente. No experimento I, compararmos o tempo despendido pelas fêmeas em cada compartimento dos machos, utilizamos teste *t* de Student para amostras pareadas. No experimento II, a latência para escolha do primeiro lado do aquário apresentou distribuição heterocedástica, então, utilizamos $\log_x$ para homogeneizar os dados e assim aplicamos teste *t* de Student para comparação. Avaliamos o tempo despendido pelas fêmeas em cada um dos três compartimentos por ANOVA de medidas repetidas. O nível crítico considerado foi de $\alpha = 0,05$.

Resultados

Experimento I - Escolha por via visual

O perfil dos machos não interferiu no tempo que as fêmeas despenderam em cada compartimento (macho hesitante ou ousado) (Figura 3). Além disso, não houve diferença na proporção de fêmeas para cada tipo de resposta (teste de Goodman, $p > 0,05$), como segue. Das 12 fêmeas hesitantes testadas, 4 escolheram pelos machos hesitantes; 3 pelos machos ousados; 2 fêmeas variaram a escolha do perfil entre o 1º e o 2º teste; e 3 despenderam o mesmo tempo no compartimento do macho de cada perfil. Dentre as fêmeas ousadas, 5 escolheram machos hesitantes e 5 optaram pelos machos ousados, 2 fêmeas também variaram a escolha do perfil entre o 1º e o 2º teste; e 1 fêmea gastou o mesmo tempo em ambos os compartimentos dos machos.

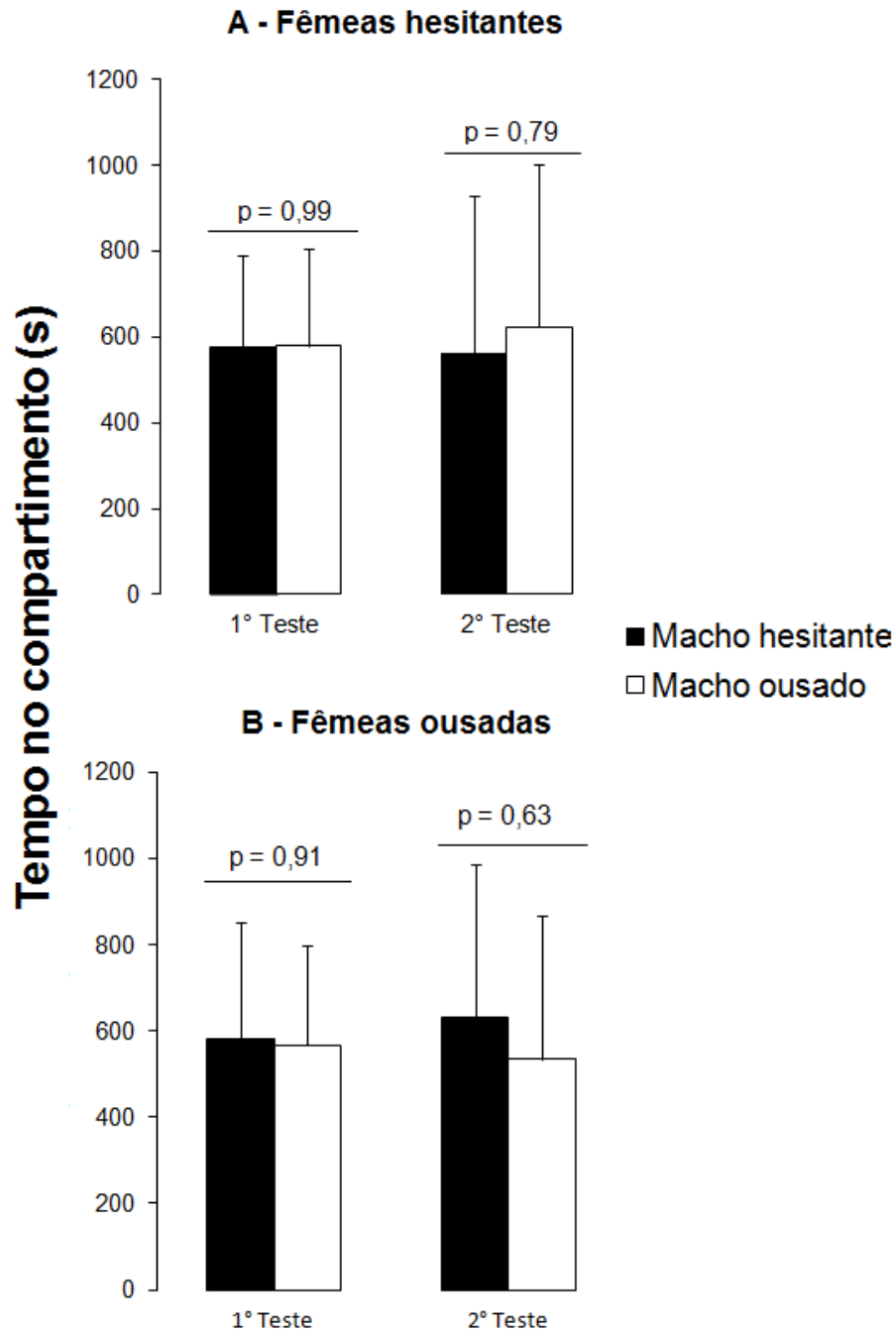


Figura 3. Tempo despendido pelas fêmeas em cada compartimento. (A) Fêmeas hesitantes e (B) Fêmeas ousadas. Dados médios ($\pm$ dp) de 12 fêmeas de cada perfil. O perfil hesitante ou ousado dos machos não interferiu no tempo que as fêmeas despenderam em cada compartimento (Teste *t* de Student).

Experimento II – Escolha por via química

Antes da liberação do estímulo químico para as fêmeas, 17 fêmeas hesitantes (85%) e 19 ousadas (95 %) visitaram os dois compartimentos. A latência para sair da zona neutra (compartimento central) em direção a um dos lados do aquário foi igual entre elas. Já na fase de estímulo, as fêmeas ousadas saíram mais rápido da zona neutra (Figura 4).

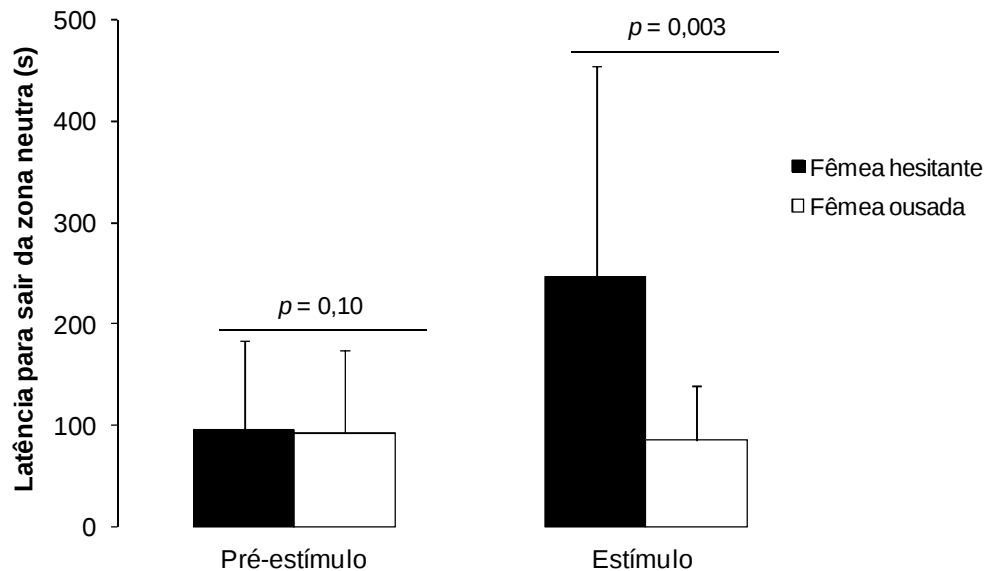


Figura 4. Latência para sair da zona neutra. Dados médios ($\pm$ dp) de 20 fêmeas de cada perfil. Não houve diferença na latência entre os perfis na fase pré-estímulo (5 min antes do início da transferência de água), mas na fase estímulo (após o início da transferência de água dos machos) as fêmeas ousadas saíram mais rápido da zona neutra (Teste *t* de Student).

A escolha das fêmeas hesitantes não foi afetada pelo perfil de personalidade dos machos. Já as fêmeas ousadas, permaneceram mais tempo no compartimento dos machos ousados (Figura 5) e a maioria delas preferiu os machos ousados (Tabela 3). Ao longo das observações (a cada 15 s), o perfil de visitação das fêmeas ao compartimento dos machos escolhidos foi consistente, mesmo que em alguns momentos elas pudessem visitar também o outro compartimento. Porém, todos os animais tiveram acesso a todos os compartimentos do aquário de teste.

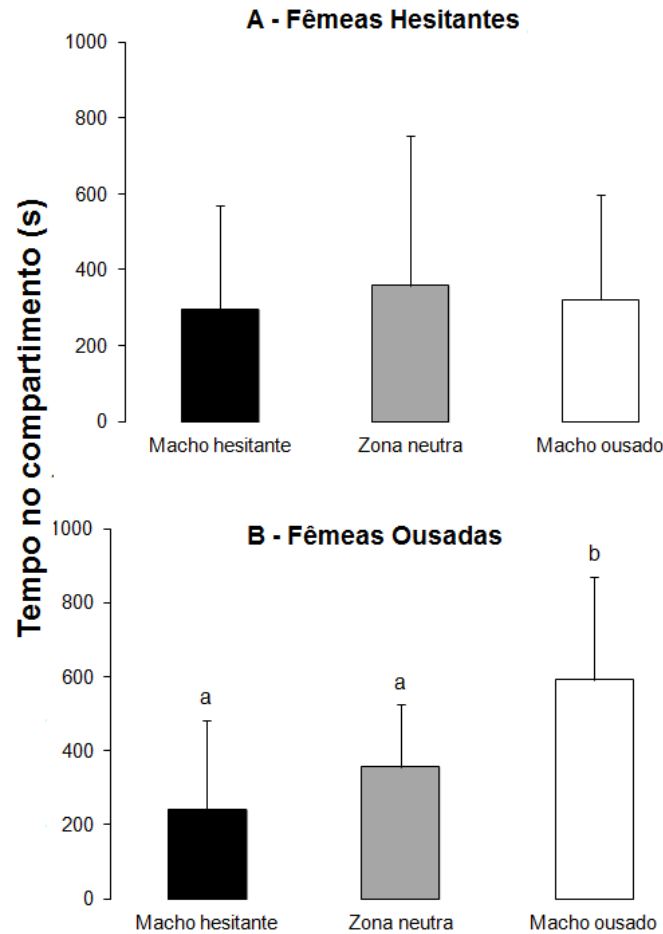


Figura 5. Tempo despendido pelas fêmeas em cada compartimento do aquário. Dados médios ($\pm$ dp) de 20 fêmeas de cada perfil. (A) A escolha das fêmeas hesitantes não foi afetada pelo perfil de personalidade dos machos (ANOVA de medidas repetidas, $F_{(2,28)} = 0,56$, $p = 0,57$). (B) Letras diferentes indicam diferença (Anova de medidas repetidas, $F_{(2,38)} = 7,4$, $p = 0,002$).

Tabela 3 – Proporção de fêmeas que escolheram machos hesitantes ou ousados.

Fêmeas	Compartimentos			
	Macho hesitante	Zona neutra	Macho ousado	Sem escolha
Hesitante	4	3	3	10
Ousada	4	2	13*	1

N = 20 fêmeas de cada perfil. * indica diferença na proporção de escolha (Teste de Goodman, $p < 0,05$).

Discussão

Aqui mostramos que na tilápia-do-Nilo as fêmeas de perfil ousado identificam e preferem machos ousados. Mais ainda, este é o primeiro relato de que essa comunicação é feita por via química, sem grande participação da via visual. Esse comportamento parece ter algum valor adaptativo às fêmeas ousadas (e.g., maiores chances de produzirem gerações de filhotes ousados).

Nossos dados mostram que sinais visuais não foram suficientes para permitir a escolha das fêmeas por machos hesitantes ou ousados. Porém, por via química tal comunicação foi efetiva. De fato, durante a escolha por parceiros, as fêmeas de peixes avaliam alguns sinais apresentados pelos machos, tais como o tamanho do corpo (Reynolds & Gross, 1992; Karino & Matsunaga, 2002), o tamanho da nadadeira caudal (Bischoff *et al.*, 1985), a condição nutricional (Giaquinto *et al.*, 2010) e a coloração externa (Houde & Endler, 1990) e preferem copular com machos maiores, bem nutridos e mais vistosos. Em algumas espécies, a ousadia correlaciona-se positivamente com a massa corporal (Brown *et al.*, 2007) e com o padrão de coloração dos machos (Goding & Dugatkin, 1996), assim, fêmeas poderiam copular com machos ousados a partir de escolhas de machos maiores e mais coloridos. No nosso caso, os machos não tinham coloração acentuada e os peixes eram de tamanhos bem próximos entre si, de forma que, na ausência de participação da comunicação química, apenas os sinais visuais não foram suficientes para permitir a escolha das fêmeas por machos hesitantes ou ousados.

Ao contrário da comunicação visual, a participação da modalidade sensorial química na escolha das fêmeas ousadas pelo perfil de machos ousados foi bem evidente. A preferência pelo compartimento do macho ousado não pôde ser atribuída a alguma tendência prévia das fêmeas no sistema de teste, visto que no experimento II, antes da liberação da comunicação da água entre os compartimentos, não houve diferença na latência para a fêmea sair do compartimento central. Com a comunicação química, no entanto, a ida das fêmeas ao compartimento dos machos ousados foi rápida, confirmando seu perfil explorador tanto quanto indicando sua preferência pelo cheiro de machos ousados.

Mecanismos olfativos de reconhecimento parecem ser bem generalizados entre os animais. A maioria dos vertebrados usa sinais químicos em interações coespecíficas (Sorensen & Stacey, 1999). Alguns estudos têm mostrado a comunicação química sobre

certas condições dos peixes, tais como, condições nutricionais (Fisher & Rosenthal, 2006; Giaquinto *et al.*, 2010a), tamanho (MacLaren *et al.*, 2004; Giaquinto & Volpato, 2005) e também informações sobre o estresse dos indivíduos (Barcellos *et al.*, 2011). Nossos resultados, no entanto, mostram que na tilápia-do-Nilo tais pistas químicas indicam o perfil comportamental dos indivíduos, o que pode transmitir para as fêmeas informações acerca da qualidade do macho. Além disso, as fêmeas podem usar essas informações para otimizar a escolha por parceiros. Entretanto, estudos adicionais seriam necessários para saber a interação entre pistas químicas e visuais nessa comunicação, bem como os possíveis sinais químicos (feromônios) envolvidos na detecção do perfil de personalidade.

Apesar desses relatos, nosso estudo é o primeiro a mostrar que as fêmeas discriminam o perfil comportamental (hesitante e ousado) dos machos por meio de sinais químicos e que essa discriminação depende do perfil de ousadia da fêmea. Nossa constatação é ainda reforçada pelo fato de que durante o período de aclimação, todos os machos foram alimentados com a mesma dieta, descartando qualquer possibilidade de que os peixes ousados estariam melhores alimentados que os peixes hesitantes, uma vez que a qualidade nutricional do macho pode afetar a escolha da fêmea (Giaquinto *et al.*, 2010). Traços de personalidade também podem estar associados a padrões fisiológicos (*coping styles*). Animais ousados são menos responsivos ao estresse enquanto os hesitantes podem apresentar maior nível de cortisol plasmático. (Koolhaas *et al.*, 1999). Uma alta associação entre condições de saúde e traços de personalidade (ousado e hesitante) podem servir como critério de seleção de parceiros, significando um importante critério adaptativo. Schuett *et al.* (2011) encontraram que no pássaro mandarim, *Taeniopygia guttata*, as fêmeas mais exploradoras preferem os machos mais exploradores. Em peixes, as fêmeas de lebistes, *Poecilia reticulata*, preferem machos ousados (Godin & Dugatkin, 1996), sugerindo que eles sejam mais viáveis e possam oferecer benefícios diretos em termos de produção de descendentes mais viáveis. Nesse sentido, as fêmeas ousadas teriam prioridade de acesso, sendo mais vantajoso copular com machos do mesmo perfil, o que lhe garantiria uma prole com características de melhores exploradores, mais corajosos e menos suscetíveis a doenças causadas por estresse.

Mas porque as fêmeas hesitantes não apresentaram preferência por um dos perfis de exploração (ousadia ou hesitação)? Uma possibilidade é que as fêmeas ousadas teriam prioridade de acesso aos parceiros e as hesitantes ficam sujeitas a copular com

quem restasse, indiferente do perfil. Ainda nesse aspecto, a existência de comportamento oportunista na reprodução da tilápia-do-Nilo (Gonçalves-de-Freitas, 1998), pode revelar que as fêmeas hesitantes possam ainda se valer de outros recursos para garantirem sua maior participação na descendência da população.

No entanto, deve haver um equilíbrio entre os custos e benefícios dos perfis dentro da população: 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). Como os dois perfis persistem na natureza, ambas as estratégias parecem ser bem sucedidas (Wilson *et al.*, 1993, 1994).

Referências

- Barcellos, L. J. G., Volpato, G. L., Barreto, R. E., Coldebella, I. & Ferreira, D. 2011. Chemical communication of handling stress in fish. *Physiology & Behavior*, **103**, 372-375.
- Bischoff, R. J., Gould, J. L. & Rubenstein, D. I. 1985. Tail size and female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **17**, 253-255.
- Brown, C., Jones, F. & Braithwaite, V. 2007. Correlation between boldness and body mass in natural populations of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopa*. *Journal of Fish Biology*, **71**, 1590-1601.
- 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.
- Endler, J. A. 1983. Natural and sexual selection on color patterns in poeciliid fishes. *Environmental Biology of fisheries*, **9**, 173-190.
- Fisher, H. & Rosenthal, G. 2006. Female swordtail fish use chemical cues to select well-fed mates. *Animal Behavior*, **72**, 721-725.
- Fraser, D. F., Gilliam, J., Daley, M. J., Le, A. N. & Skalski, G. T. 2001. Explaining leptokurtic movement distributions: intrapopulation variation in boldness and exploration. *The American Naturalist*, **158**, 124-135.
- Galhardo, L., Vitorino, A. & Oliveira, R. F. 2012. Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. *Biology Letters*, **8**(6), 936-938.
- Giaquinto, P. C. & Volpato, G. L. 1997. Chemical communication, aggression and conspecific recognition in the fish Nile Tilapia. *Physiology & Behavior*, **62**, 1333-1338.
- Giaquinto, P. C. & Volpato, G. L. 2005. Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma coruscans*. *Acta Ethologica*, **8**, 65-69.
- Giaquinto, P. C., Berbert, C. M. S. & Delicio, H. C. 2010. Female preferences based on male nutritional chemical traits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **64**, 1029-1035.
- Giaquinto, P. C. 2010. Female pintado catfish choose well-fed males. *Behaviour*, **147**, 319-332.
- 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.

- Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. 1998. Sneaking behavior of the Nile tilapia. *Boletim Técnico do CEPTA*, **11**, 71-79.
- Houde, A. E. & Endler, J. A. 1990. Correlated evolution of female mating preferences and male color pattern in the guppy *Poecilia reticulata*, *Science*, **248**, 1405-1408.
- Karino, K. & Matsunaga, J. 2002. Female mate preference is for male total length, not tail length in feral guppies. *Behaviour*, **139**, 1491-1508.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., *et al.* 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **23**, 925-935.
- MacLaren, R. D., Rowland, W. J. & Morgan, N. 2004. Female preference for sailfin and body size in the sailfin molly, *Poecilia latipinna*. *Ethology*, **110**, 363-379.
- Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. 2008. Nesting deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei: Cichlidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **25**(3), 413-418.
- Réale, 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.
- Reynolds, J. D. & Gross, M. R. 1992. Female mate preference enhances offspring growth and reproduction in a fish, *Poecilia reticulata*. *Proceeding of Royal Society B*, **250**, 57-62.
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A. & Gentle, M. J. 2003. Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. *Journal of Pain*, **4**, 431-440.
- Sorensen, P. W., Stacey, N. E. 1999. Evolution and specialization of fish hormonal pheromones. In: Johnston, R. E., Müller-Schwarze, D., Sorensen, P. W. (eds) *Advances in chemical signals in vertebrates*. Kluwer, New York, pp 15-47.
- Schuett, W., Godin, J. G. J. & Dall, S. R. X. 2011. Do female zebra finches, *Taeniopygia guttata*, choose their mates based on their 'personality'? *Ethology*, **117**, 908-917.
- Valença-Silva G. 2010. Caracterização de indivíduos hesitantes e ousados na tilápia-do-Nilo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 34p.
- 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, A. D. M. & Stevens, E. D. 2005. Consistency in Context-specific Measures of Shyness and Boldness in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ethology*, **111**(9), 849-862.

Estudo III
Papel dos peixes hesitantes e ousados na
estabilidade de grupos de juvenis de
tilápia-do-Nilo.

Papel dos peixes hesitantes e ousados na estabilidade de grupos de juvenis de tilápia-do-Nilo.

Resumo

Avaliamos se os perfis comportamentais hesitantes e ousados afetam a agressividade, o crescimento e a mortalidade em grupos de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para acessar a hesitação e a ousadia aplicamos o teste do objeto novo, avaliando a resposta de cada peixe em dois testes consecutivos, selecionando os peixes com perfil consistentes nos dois testes. Após, formamos quartetos de peixes de acordo com o perfil apresentado em três condições experimentais: a) apenas hesitantes; b) apenas ousados e; c) mistos (2 peixes de cada perfil). Mantivemos os agrupamentos por 28 dias. Um dia após o agrupamento e a cada 7 dias, durante 28 dias, registrávamos o número de confrontos no grupo, o peso e o comprimento dos animais. Além disso, registrávamos diariamente a ocorrência de mortes. Os peixes ousados brigaram mais no início do experimento (até 14º dia). Até o 7º dia, a ocorrência de mortes foi menor entre os hesitantes, não tendo diferença nas semanas posteriores (até o final do experimento). Além disso, a composição dos grupos não afetou a biomassa final dos indivíduos. Concluímos que o perfil comportamental influencia nas interações agonísticas do grupo, podendo afetar a ocorrência de mortes, mas não afetando a biomassa dos peixes.

Palavras-chave: temperamento, síndrome comportamental, agressão, sobrevivência, crescimento

Introdução

Dentro de uma população, os indivíduos podem diferir consistentemente em seus comportamentos (Wilson *et al.*, 1994; Sih *et al.*, 2004; Réale *et al.*, 2007). Essa heterogeneidade pode influenciar no risco de predação, na dieta e, consequentemente, no crescimento e sucesso adaptativo dos indivíduos (Wilson *et al.*, 1993), tendo grandes implicações dentro da população. Uma das dimensões da personalidade é o contínuo hesitação-ousadia, que reflete a propensão para correr risco especialmente em uma nova situação (Wilson *et al.*, 1993). A posição do indivíduo nesse contínuo é determinada por experiências durante a ontogenia somadas a componentes herdáveis (van Oers *et al.*, 2004; Sinn *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007). Além disso, esse perfil parece sofrer forte pressão seletiva de acordo com a variabilidade de risco no habitat em que está inserido (Huntinford, 1976; Brown *et al.*, 2005). Por exemplo, em populações de peixes que vivem em área de alto risco de predação, os indivíduos tendem a ser mais ousados/corajosos (*bold*) comparados a indivíduos de regiões com menor quantidade de predadores (Brown *et al.*, 2005).

A frequência do perfil hesitante-ousado numa população tende a concentrar poucos indivíduos fortemente hesitantes, ou fortemente ousados, e uma maioria de indivíduos em estágios intermediários. No entanto, ainda não está claro como essas diferentes proporções de traços de personalidade podem afetar a dinâmica de um grupo. Sabemos que os indivíduos ousados são mais agressivos em relações intraespecíficas do que peixes hesitantes (Bell & Sih, 2007; Bell *et al.*, 2010). Assim, podemos pensar que um número elevado de animais ousados em um grupo não seja vantajoso, pois pode acentuar o número de confrontos levando a um aumento nos níveis de estresse e na taxa de mortalidade. Por outro lado, indivíduos ousados podem apresentar maior massa corporal comparado aos hesitantes (Brown *et al.*, 2007). Em geral, dentro de uma população, é razoável que exista equilíbrio entre os custos e benefícios dos perfis de personalidade. Os indivíduos que se arriscam (e.g., se alimentam em áreas com presença de predadores) têm maior chance de sucesso reprodutivo, mas também maior chance de serem predados. Ao contrário, aqueles que são aversivos ao risco (hesitantes), têm menores chances de encontrar parceiro reprodutivo, mas seu risco de predação é menor (Wolf *et al.*, 2007; Smith & Blumstein, 2008). Ou seja, tanto os perfis hesitantes quanto os ousados representam diferentes estratégias adaptativas numa população que pode ser vantajosas para ambos.

Com o objetivo de entender o que os perfis comportamentais representam na população, avaliamos a agressividade, a mortalidade e a biomassa produzida em grupos de peixes hesitantes, mistos ou ousados de juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Material e Métodos

Sujeitos e condições de manutenção

Os juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) utilizados nesse estudo, nasceram em nosso biotério de peixes, onde permaneceram por 4 meses em caixas de 500 L (1 peixe/4 L), com aeração constante, filtro biológico, temperatura ~ 26°C, amônia < 0,04 ppm, e fotoperíodo das 06:00 h às 18:00 h, fornecido por luz fluorescente (~ 350 lux). Alimentamos os peixes uma vez ao dia (3 % da biomassa) com ração extrusada para peixes tropicais (36 % proteína bruta).

Os procedimentos foram feitos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu-SP, protocolo número 558.

Delineamento Geral

A estratégia consistiu em agrupar os indivíduos de acordo com seu perfil de personalidade e avaliar agressividade, a mortalidade e a biomassa do grupo durante 28 dias de agrupamento. Para isso, identificamos o perfil hesitante e ousado dos juvenis por meio do teste do objeto novo, como descrito na parte II desta tese. Após, mantivemos esses peixes em caixas separadas (500 L) durante 15 dias, nas mesmas condições de manutenção descritas acima. Decorrido esse tempo, formamos quartetos de peixes em três condições experimentais: a) apenas hesitantes; b) apenas ousados; e c) mistos (2 peixes de cada perfil).

Para a formação dos grupos, realizamos a biometria (peso e comprimento) e a marcação dos animais. Inicialmente, anestesiávamos os peixes com benzocaína (80 mg/L) e enquanto estavam sob efeito do anestésico, pesamos e aferimos o comprimento padrão de cada indivíduo. Para identificação dos peixes do grupo misto, fizemos um corte na região inferior da nadadeira caudal dos peixes hesitantes e na região superior da nadadeira caudal dos peixes ousados. A fim de evitar interferência do corte nas demais

respostas comportamentais, realizamos o mesmo procedimento para os grupos compostos apenas de peixes hesitantes e ousados (de forma aleatória, 2 peixes receberam um corte na região superior e, 2 peixes um corte na região inferior). Em seguida, agrupamos quartetos de tamanhos similares em aquários de vidro (40 cm x 20 cm de base x 25 cm de altura) de acordo com a condição experimental ($n = 6$ réplicas). O tamanho dos animais é mostrado na Tabela 1. Todos os aquários possuíam substrato no fundo (1 cm), filtro biológico e aeração constante.

Tabela 1 – Biometria de juvenis de tilápia-do-Nilo nas três condições experimentais

Perfil do grupo	Peso (g)	Comprimento (cm)
Hesitante	5,3 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,2
Misto	5,0 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 0,3
Ousado	4,9 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,3

Não houve diferença nos pesos (ANOVA, $F = 1,92$, $p = 0,15$) e comprimentos (ANOVA, $F = 0,46$, $p = 0,63$) entre as diferentes condições experimentais.

No 1º dia após serem inseridos no aquário e a cada intervalo de 7 dias até o 28º dia de experimentação, aferíamos o peso e o comprimento padrão de todos os peixes, e filmávamos as interações agonísticas em cada grupo por 20 min, sempre no período da manhã (para evitar possíveis influências do ritmo circadiano). Além disso, registrávamos diariamente a eventual ocorrência de mortes entre os indivíduos. Alimentamos os peixes todos os dias por volta as 9:00 h com ração para peixes tropicais (3% da biomassa do grupo). Excepcionalmente, nos dias de coleta de dados, alimentávamos os peixes após a filmagem e biometria. Uma vez por semana realizamos a troca de metade da água dos aquários para auxiliar na manutenção dos níveis de pH ($\sim 7,3$), amônia total ($\sim 0,25$ ppm). No caso do nitrito, os valores ficaram iguais entre os tratamentos, mas após do 21º dia de experimentação os valores ficaram elevados (0,5 ppm) em relação aos padrões (menor que 0,5 ppm; Lewis Jr. & Morris, 1986). Porém, a falta de medidas de outros elementos (e.g., dureza e alcalinidade da água e oxigênio dissolvido) não nos permitiu avaliar exatamente o efeito da maior concentração de nitrito para os peixes. No entanto, não observamos nada que mostrasse alteração comportamental em função desse parâmetro e, além disso, peixes pequenos (~ 5 g),

como utilizado aqui, são mais tolerantes ao nitrito comparado a peixes maiores (Atwood *et al.*, 2001).

Agressividade

Para avaliar agressividade em cada condição experimental, no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dia de experimentação, registramos os confrontos entre os indivíduos. Para isso, filmávamos cada grupo por 20 min e, a partir das filmagens, quantificamos: a) latência para o primeiro confronto e b) total de confrontos (mordidas, brigas laterais, brigas de boca e perseguições). Como houve mortes ao longo das semanas de experimentação, a cada registro, dividíamos o total de confrontos pelo número de indivíduos, o que nos deu a taxa de confrontos por grupo.

Biomassa produzida

O objetivo inicial era comparar o crescimento dos indivíduos de cada condição experimental. No entanto, a mortalidade ocorrida em alguns grupos dificultou essa análise, visto que, a redução do número de indivíduos pode reduzir o número de confronto, além de aumentar o espaço disponível no aquário. Assim, avaliamos a biomassa produzida em cada condição experimental, calculada pela somatória dos pesos dos indivíduos de cada réplica.

Análise de dados

Utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene's para avaliar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Assim, utilizamos ANOVA de uma via para compararmos a taxa de confrontos, a latência para iniciar esses confrontos e a biomassa produzida em cada condição experimental. Aplicamos o teste de Goodman, para comparação da proporção de ocorrência de mortes entre os tratamentos. O nível crítico considerado foi de $\alpha = 0,05$.

Resultados

No 1º dia após o agrupamento, os peixes ousados brigaram mais que os grupos mistos e os hesitantes (Figura 1A). No 7º dia, eles novamente brigaram mais que os hesitantes, mas em igual proporção ao grupo misto (Figura 1B). Já no 14º os peixes ousados novamente brigaram mais que os outros dois grupos (Figura 1C). No entanto,

não houve diferença na latência para iniciar os confrontos (ANOVA, 1º dia: $F = 1,23$, $p = 0,32$; 7º dia: $F = 0,98$, $p = 0,4$ e 14º dia: $F = 2,6$, $p = 0,11$). A partir do 21º dia de experimentação a mortalidade deixou o número de animais desbalanceado, impossibilitando a comparação entre as condições experimentais.

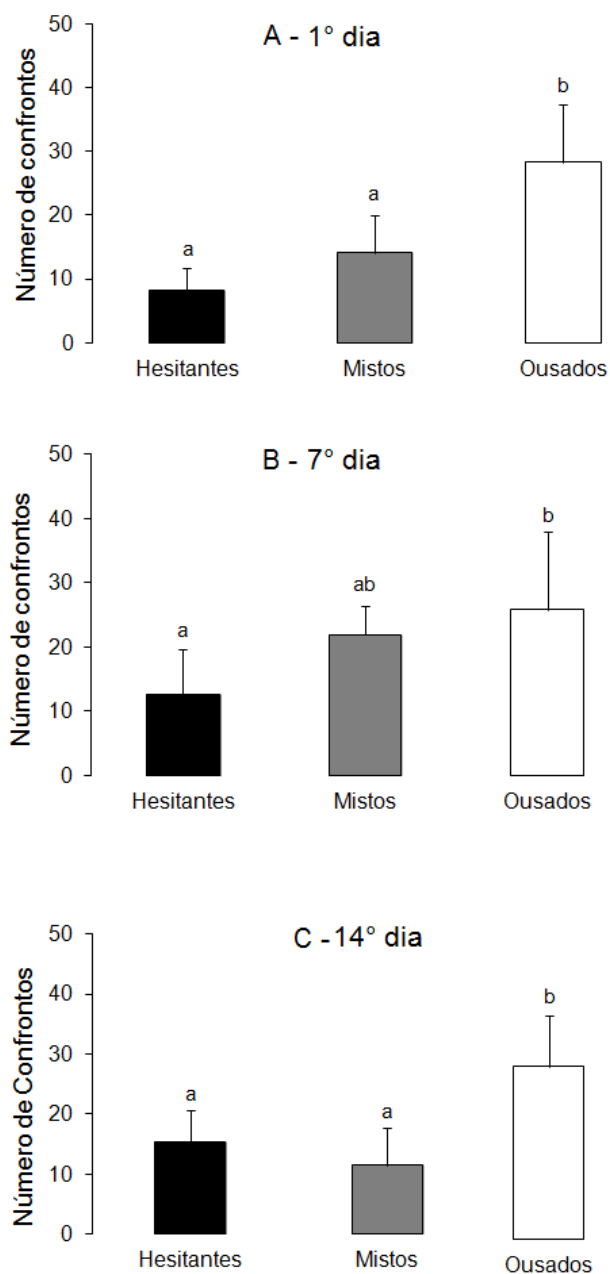


Figura 1 – Número de Confrontos no 1º, 7º e 14º dia do experimento. Dados médios ($\pm dp$). $N = 6$ réplicas por tratamento. Letras diferentes indicam diferença ANOVA, (A): $F = 8,42$, $p = 0,003$; (B): $F = 3,88$, $p = 0,04$; e (C): $F = 6,7$, $p = 0,009$.

Até o 7º dia de experimento, nenhum peixe hesitante morreu. A ocorrência de mortes entre os peixes ousados foi igual a dos peixes do grupo misto, mas maior comparado aos hesitantes (Figura 2). Nas semanas posteriores e até o final do experimento, não houve diferença na proporção de mortes entre os tratamentos. Ao final do experimento, em 4 réplicas do grupo misto restou apenas um peixe, todos de perfil ousado.

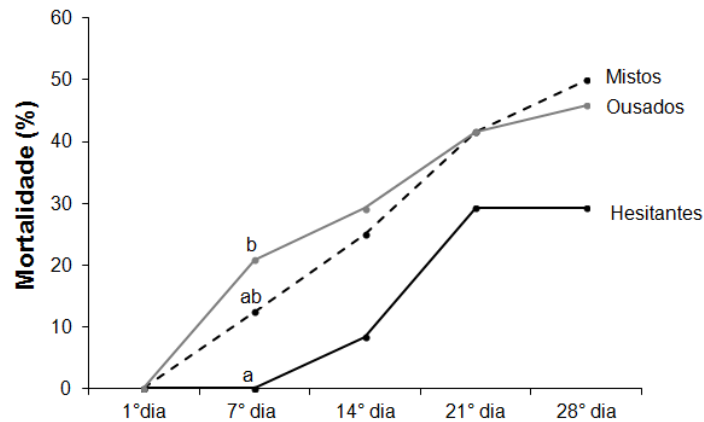


Figura 2. Mortalidade em cada perfil de personalidade ao longo de 28 dias de experimento. N = 6 réplicas de 4 indivíduos em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença (Teste de Goodman, $p < 0,05$).

Devido a alta ocorrência de mortalidade, não pudemos comparar o ganho de peso entre os animais, assim comparamos a biomassa produzida que, ao final do experimento foi igual entre os tratamentos (Figura 3).

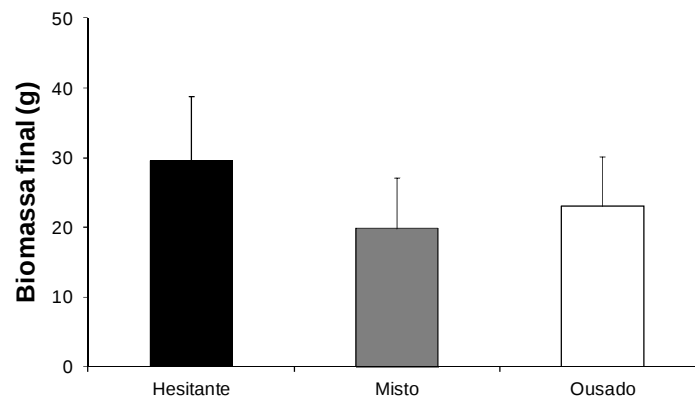


Figura 3 – Personalidade e biomassa produzida. Dados médios ($\pm dp$). Não houve diferença entre grupos (ANOVA, $F = 2,27$, $p = 0,14$).

Discussão

Aqui, vimos que, num panorama geral, os peixes ousados são mais agressivos que os hesitantes e grupos mistos. Também mostramos que não há diferença na taxa de mortalidade entre os grupos, mas que os peixes ousados começam a morrer primeiro. Além disso, concluímos que a composição dos grupos não afeta a biomassa final dos indivíduos.

Quando indivíduos com perfil ousado são agrupados, espera-se aumento da competição por acesso a recursos, como comida, espaço ou posições sociais, elevando assim o número de confrontos agressivos no grupo. Animais ousados se arriscam mais e apresentam maior potencial para luta (Chang *et al.*, 2012), ou seja, maior nível de agressividade (Ruiz-Gomes & Hutingford, 2012) que lhes garante enfrentar possíveis problemas de exposição a predadores ou competidores. De maneira diferente, o menor número de confrontos entre os hesitantes e dentro dos grupos mistos pode ser, de fato, decorrência do menor perfil agressivo dos hesitantes. Nesse sentido, a manutenção de apenas peixes ousados ou de uma alta proporção desse perfil em agrupamentos (criação, experimentação) pode elevar o número de interações agonísticas e, como consequência, elevar os níveis de estresse e até mesmo aumentar a mortalidade entre os indivíduos do grupo.

Apesar da mortalidade ao final dos 28 dias ser igual entre os três perfis testados, os peixes ousados morreram mais que os hesitantes durante a primeira semana de agrupamento e também começaram a morrer primeiro. Tais fatos podem ser associados à maior agressividade dentro do grupo durante esse período (~ 30 confrontos/indivíduo). Esse fato também é reforçado pela constatação de que em 4 réplicas do grupo misto, 3 dos 4 indivíduos morreram, restando apenas 1 peixe ousado. Se essas mortes foram exclusivamente resultado da interação entre os peixes, isso reforça o maior potencial agressivo dos peixes ousados.

Em populações naturais de *Brachyrhaphis episcopi* Brown *et al.* (2007) mostraram correlação positiva entre a ousadia e a massa corporal. No nosso caso, ao final dos 28 dias não pudemos comparar crescimento dos indivíduos, pois a ocorrência de mortes foi elevada. Assim, avaliamos a biomassa produzida em cada grupo, constatando que o perfil dos indivíduos não afetou a biomassa. Nossos resultados podem ser consequência da alimentação controlada (proporcionalmente, cada peixe recebeu a mesma quantidade de alimento) ou da ausência de predadores que, sob

condições naturais, poderiam dificultar a aquisição de alimento, especialmente nos indivíduos hesitantes.

Com isso, mostramos que as proporções dos perfis comportamentais hesitante e ousado afetam a dinâmica dentro do grupo. O fato da agressividade ser maior entre os indivíduos ousados, e desses indivíduos morrerem primeiro quando agrupados com peixes de igual perfil, nos indicam que a manutenção da variabilidade dos perfis dentro do grupo pode ser vantajosa. Os diferentes fenótipos que ocorrem dentro de uma população devem ser adaptativos e possivelmente decorrem da seleção dependente da frequência (Wilson *et al.* 1994). 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. Nosso estudo, no entanto, embora aponte o papel da composição do grupo em termos de personalidade hesitante ou ousada, reforça a necessidade de maior aprofundamento levando-se em conta as proporções desses perfis em populações naturais, bem como um melhor controle dos efeitos da redução do número de peixes no crescimento desses animais.

Referências

- Atwood, H. L., Fontenot, Q. C., Tomasso, J. R. & Isely, J. J. 2001. Toxicity of Nitrite to Nile Tilapia: Effect of Fish Size and Environmental Chloride. *North American Journal of Aquaculture*, **63**(1), 49-51.
- Brown, C., Jones, F. & Braithwhite, V. 2005. In situ examination of boldness–shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyrhaphis episcopa*. *Animal Behavior*, **70**, 1003-1009
- Brown, C., Jones, F. & Braithwhite, V. 2007. Correlation between boldness and body mass in natural populations of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopa*. *Journal of Fish Biology*, **71**, 1590-1601.
- Chang, C., Li, C. Y., Earley R. L. & Hsu, Y. 2012. Aggression and Related Behavioral Traits: The Impact of Winning and Losing and the Role of Hormones. *Integrative and Comparative Biology*, **52**(6), 801-813.
- Huntingford, F. A. 1976. The relationship between anti-predator behaviour and aggression among conspecifics in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour*, **24**, 245-260.
- Lewis Jr., W. M. & Morris, D. Toxicity of nitrite to fish: A review. 1986. *Transaction of the American fisheries society*, **115**, 183-195.
- Réale, 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.
- Ruiz-Gomes, M. L. & Huntingford, F. A. 2012. Boldness and aggressiveness in early and late hatched three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology*, **81**, 966-976.
- Sih, A., Bell, A. M., Johnson, J. C. & Ziemba, R. E. 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 372-378.
- Sinn, D. L., Apiolaza, L. A. & Moltschaniwskyj, N. A. 2006. Heritability and fitness-related consequences of squid personality traits. *Journal of Evolutionary Biology*, **19**, 1437-1447.
- Smith, B. R. & Blumstein, D. T. 2008. Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behavioral Ecology*, **19**, 448-455.
- van Oers, K., Drent, P. J., de Goede, P. & van Noordwijk, A. J. 2004. Realized heritability and repeatability of risk-taking behaviour in relation to avian personalities. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**, 65-73.

- 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.
- Wolf, M., van Doorn, G. S., Leimar, O. & Weissing, F. J. 2007. Life-history trade-offs favour the evolution of animal personalities. *Nature*, **447**, 881–884.