

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TÁCTIL DE LONGO
PRAZO SOBRE O BEM-ESTAR DA
TILÁPIA-DO-NILO**

Ana Carolina dos Santos Gauy

Jaboticabal, São Paulo

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TÁCTIL DE LONGO
PRAZO SOBRE O BEM-ESTAR DA
TILÁPIA-DO-NILO**

Ana Carolina dos Santos Gauy

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo

2021

G277e Gauy, Ana Carolina dos Santos
 Efeito da estimulação táctil de longo prazo sobre o bem-estar da
 tilápia-do-nilo / Ana Carolina dos Santos Gauy. – – Jaboticabal, 2021
 93 p. : il. ; 29 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
 Aquicultura, 2021

 Orientadora: Eliane Gonçalves de Freitas

 Banca examinadora: Angélica da Silva Vasconcellos, João Luis
 Saraiva, Selene Siqueira da Cunha Nogueira, Mônica Serra

 Bibliografia

 1. Agressividade. 2. Densidade de estocagem. 3. Desempenho
 produtivo. 4. Estresse social. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de
 Aquicultura.

CDU 636.3.05



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EFEITO DA ESTIMULAÇÃO TÁCTIL DE LONGO PRAZO SOBRE O BEM-ESTAR DA
TILÁPIA-DO-NILO

AUTORA: ANA CAROLINA DOS SANTOS GAUY

ORIENTADORA: ELIANE GONÇALVES DE FREITAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em
AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANE GONÇALVES DE FREITAS (Participação Virtual)

Departamento de Zoologia e Botânica / UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. ANGÉLICA DA SILVA VASCONCELLOS (Participação Virtual)

Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados / Pontifícia Universidade Católica de
Minas Gerais

Prof. Dr. JOÃO LUÍS SARAIVA (Participação Virtual)

Centro de Ciencias do Mar, CCMar / Universidade do Algarve, Campus da Gambela, Portugal

Profa. Dra. SELENE SIQUEIRA DA CUNHA NOGUEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus-BA

Profa. Dra. MÔNICA SERRA (Participação Virtual)

Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador-BA

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2021.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	1
Agradecimentos	2
Apoio financeiro.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	6
Introdução Geral	8
Capítulo 1: Estimulação táctil de longo prazo diminui agressividade e aumenta desempenho produtivo em grupos de tilápia-do-nilo.....	12
1. Introdução.....	14
2. Material e Métodos	16
3. Resultados.....	24
4. Discussão	38
5. Referências.....	49
Capítulo 2: Estimulação táctil de longo prazo diminui efeitos negativos da alta densidade de estocagem e aumenta desempenho produtivo na tilápia-do-nilo	63
1. Introdução.....	65
2. Material e Métodos	67
3. Resultados.....	74
4. Discussão	78
5. Referências.....	83
Referências Complementares.....	90

DEDICATÓRIA

À Ana Rosa dos Santos Gauy, que mesmo não estando mais presente fisicamente, sempre será meu exemplo de força, amor e apoio incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Rosa dos Santos Gauy e João Carlos Miranda Gauy, pelo amor incondicional, apoio e dedicação. Por serem minha base e sempre me incentivarem a alcançar caminhos cada vez mais distantes. Sou eternamente grata a vocês.

À minha família e amigos por todo o incentivo e amor, além da compreensão de minha ausência ao longo dessa jornada.

À professora Dra. Eliane Gonçalves de Freitas pela oportunidade, orientação e dedicação desde o primeiro dia que entrei no laboratório. Além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis. Obrigada pelo carinho em suas palavras e ricos ensinamentos pessoais e profissionais ao longo da minha jornada. Um exemplo a ser seguido!

Aos amigos do Laboratório de Comportamento Animal, Ana Marina T. A. Fernandes, André Vitor S. Pereira, Camila N. Boscolo, Estela D. Soares, Felipe D. Guimarães, Guilherme D. Martins, Izabela G. da Cruz, Jéssica M. S. Pelegrini, Kawan C. Martins, Lethicia Vian, Ludmilla N. Falsarella, Manuela L. Brandão e Marcela C. Bolognesi, pelo companheirismo, discussões e ajuda, os quais foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho e para meu desenvolvimento profissional. Em especial ao Felipe, Manuela e Marcela pela ajuda nos experimentos.

À Roselene S. C. Ferreira e ao Carlos Eduardo de Sousa pelo suporte técnico e ajuda na manutenção dos animais no laboratório.

Aos meus grandes parceiros, Manuela L. Brandão e Felipe D. Guimarães, que me ajudaram e estiveram comigo em todos os momentos de alegrias e de angústias, de experimentos e de unidades e fizeram todos eles mais leves e melhores.

Aos meus parceiros diários, Felipe S. R. do Amaral e Gabriela Faria, por me incentivarem todos os dias e estarem ao meu lado, mesmo nos dias de desespero. Obrigada pela paciência, boas risadas, refeições maravilhosas e todo amor. “Bom dia, família!”

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo doutorado. Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

A todos que, direta ou indiretamente, me possibilitaram chegar até aqui, meus sinceros agradecimentos!

APOIO FINANCEIRO

CNPq, Bolsa de Doutorado – Número do processo: 154975/2016-8.

RESUMO

Na piscicultura, estressores como alta densidade de estocagem e elevadas interações agressivas entre os indivíduos podem aumentar o estresse e diminuir o bem-estar de peixes. No entanto, pesquisas direcionadas à redução desses efeitos ainda são escassas. Alguns estudos mostram que a estimulação tátil, semelhante à massagem corporal, tem efeitos positivos na diminuição do estresse e aumento do bem-estar, principalmente em mamíferos. Em peixes, a estimulação tátil de curto prazo (10 dias ou menos) reduz o estresse em um peixe de recife de coral e diminui a agressividade em indivíduos isolados de tilápia-do-nilo. Alguns estudos sugerem que a massagem a longo prazo tenha efeito cumulativo em mamíferos, porém, efeitos prolongados precisam ser investigados em outros vertebrados para testar se esse procedimento seria adequado para melhorar o bem-estar. Assim, testamos o efeito da estimulação tátil de longo prazo no bem-estar de grupos de tilápia-do-nilo, terceira espécie mais produzida na piscicultura mundial. Essa espécie é um ciclídeo e, portanto, apresenta comportamento territorial e de hierarquia de dominância, os quais são definidos por meio de interações agressivas. Foi defendida a tese de que a estimulação tátil de longo prazo traz efeitos positivos aos parâmetros ligados ao bem-estar e a produtividade em espécies agressivas. Assim, foram realizados dois estudos para testar o efeito da estimulação tátil sobre a interação social agressiva e o estresse e também, sobre o estresse e os parâmetros produtivos em diferentes densidades de estocagem. Em ambos os estudos, um aparato formado por uma moldura retangular de PVC, com hastes plásticas posicionadas na vertical e contendo cerdas de silicone nas laterais, foi introduzido do centro do aquário. Os peixes passavam por entre as cerdas, recebendo estimulação tátil corporal. Um aparato semelhante, mas sem as cerdas de silicone, funcionou como controle. No primeiro estudo, foi testado o efeito da estimulação tátil de longo prazo sobre a agressividade, o estresse e os parâmetros produtivos em grupos de tilápia-do-nilo. Quatro machos adultos foram agrupados e mantidos por 21 dias sem acesso (7 réplicas – controle) ou com acesso (10 réplicas) à estimulação tátil. A cada 3 dias foram quantificadas as interações agressivas e número de atravessamentos dos animais pelo aparato. Os animais foram medidos e pesados nos dias 1, 7 e 21 e o

sangue foi coletado nos dias 7 e 21. Foi observado diminuição do estresse e menor número de interações agressivas no tratamento com estimulação tátil a partir do dia 10. Essa diminuição foi mais acentuada a longo prazo (dias 19 e 21). Além disso, o nível de testosterona (T) aumentou ao longo do tempo nos animais mais dominantes do tratamento com estimulação tátil e não houve diferença no nível de 11-cetotestosterona (11-KT). Foi observado, também, maior taxa de crescimento, eficiência alimentar, sobrevivência e fator de condição dos animais no tratamento com estimulação tátil. Tanto a diminuição da agressividade, quanto o aumento no crescimento foram mais evidenciados no peixe alfa. No segundo estudo, foi testado se a estimulação tátil de longo prazo reduz os efeitos negativos da alta densidade de estocagem. Foram realizados 4 tratamentos, com 10 réplicas cada: 1) Sem estimulação tátil e alta densidade (1 peixe / 0,014 m³); 2) Sem estimulação tátil e baixa densidade (1 peixe / 0,028 m³); 3) Com estimulação tátil e alta densidade (1 peixe / 0,014 m³); 4) Com estimulação tátil e baixa densidade (1 peixe / 0,028 m³). Dez animais foram agrupados e mantidos, também, por 21 dias. Os animais passaram por biometrias nos dias 1, 10 e 21 e por coleta de sangue no dia 21. Não houve diminuição no nível de cortisol, mas a taxa de crescimento, ganho de peso, ganho de comprimento e eficiência alimentar foram maiores no tratamento com estimulação tátil, mesmo quando em alta densidade. Essas variáveis foram ainda maiores no tratamento com baixa densidade e estimulação tátil. Além disso, o fator de condição aumentou no final dos 21 dias somente no tratamento com estimulação e baixa densidade. Com isso, podemos concluir que a estimulação tátil de longo prazo apresenta efeitos positivos sobre a agressividade e os parâmetros de desempenho produtivo na tilápia-do-nylo. Desse modo, pode ser usada como ferramenta para melhorar a produção e aumentar o bem-estar dos peixes.

Palavras-chave: agressividade, crescimento, densidade de estocagem, eficiência alimentar, estresse social, fator de condição, *rank* social.

ABSTRACT

In fish farming, stressors such as high stocking density and high aggressive interactions between individuals can increase stress and decrease fish welfare. However, research that aim reducing these effects are still scarce. Some studies show that tactile stimulation, similar to body massage, has positive effects in reducing stress and increasing welfare, especially in mammals. In fish, short-term tactile stimulation (10 days or less) reduces stress in a coral reef fish and decreases aggression in isolated individuals of Nile tilapia. Some studies suggest that long-term massage has a cumulative effect in mammals, however, prolonged effects need to be investigated in other vertebrates to test whether this procedure would be adequate to improve welfare. Thus, we tested the effect of long-term tactile stimulation on the welfare of groups of Nile tilapia, the third most raised species in fish farming worldwide. This species is a cichlid and, therefore, exhibits territorial and hierarchical dominance behavior, which is defined through aggressive interactions. The thesis defended was that long-term tactile stimulation has positive effects on parameters related to welfare and productivity in aggressive species. Hence, two studies were carried out to test the effect of tactile stimulation on aggressive social interaction and stress and also on stress and productive parameters at different stocking densities. In both studies, an apparatus formed by a rectangular PVC frame, with plastic rods positioned vertically and containing silicone bristles on the sides, was introduced in the center of the aquarium. The fish passed through the bristles, receiving tactile stimulation on its body. A similar apparatus, but without the silicone bristles, worked as a control. In the first study, the effect of long-term tactile stimulation on aggression, stress and parameters of productive performance in groups of Nile tilapia was tested. Four adult males were grouped and maintained for 21 days without access (7 replicates - control) or with access (10 replicates) to tactile stimulation. Every 3 days, aggressive interactions and the number of animals that crossed the apparatus were quantified. The animals were measured and weighed on days 1, 7 and 21 and blood was collected on days 7 and 21. A decrease in stress levels and fewer aggressive interactions were observed in the treatment with tactile stimulation from the 10th day on. This decrease was more accentuated in the long-term treatment (days 19 and

21). In addition, the testosterone (T) level increased over time in the most dominant animals on the tactile stimulation treatment and there was no difference in the level of 11-ketotestosterone (11-KT). It was also observed a higher growth rate, feed efficiency, survival and condition factor of the animals in the treatment with tactile stimulation. Both the decrease in aggressiveness and the increase in growth were more evident in alpha fish. In the second study, it was tested whether long-term tactile stimulation reduces the negative effects of high stocking density. Four treatments were carried out, with 10 replicates each: 1) Without tactile stimulation and high density (1 fish / 0.014 m³); 2) Without tactile stimulation and low density (1 fish / 0.028 m³); 3) With tactile stimulation and high density (1 fish / 0.014 m³); 4) With tactile stimulation and low density (1 fish / 0.028 m³). Ten animals were grouped and kept, too, for 21 days. The animals underwent biometrics on days 1, 10 and 21 and blood collection took place on day 21. There was no decrease in the level of cortisol, but the growth rate, weight gain, length gain and feeding efficiency were higher in the treatment with tactile stimulation, even when in high density. These variables were even greater in the treatment with low density and tactile stimulation. In addition, the condition factor increased at the end of the 21 days, but only in the treatment with stimulation and low density. By this means, we can conclude that the long-term tactile stimulation has positive effects on the aggressiveness and in the parameters of productive performance of Nile tilapia. Therefore, it can be used as a tool to improve production and increase fish welfare.

Keywords: aggressiveness, condition factor, food efficiency, growth, social rank, social stress, stocking density.

Introdução Geral

O bem-estar animal vem sendo cada vez mais estudado em razão do interesse e preocupação da sociedade em estabelecer a influência dos seres humanos sobre as demais espécies (VOLPATO et al., 2009), uma vez que os animais estão cada vez mais presentes na produção de alimentos e como animais de estimação (WEBSTER, 2016). Assim como em outros animais, o bem-estar dos peixes pode ser definido sob diferentes abordagens, as quais são agrupadas em três por Huntingford, Kadri e Jobling (2012). A abordagem baseada em função, a qual considera se as funções biológicas do animal são expressas de forma adequada, levando em consideração a saúde e se o animal é capaz de se ajustar ao ambiente artificial. A abordagem baseada em sentimento, a qual considera que os peixes são animais sencientes e pressupõe que os animais estão com bom bem-estar se estiverem livres de experiências negativas, como sofrimento, dor, medo e fome. E a abordagem baseada na natureza, a qual considera que os animais estão com bom bem-estar se podem expressar seu repertório comportamental como expressariam na natureza.

O bem-estar em peixes é avaliado, principalmente, por respostas fisiológicas, como a variação do nível de cortisol plasmático no organismo devido à elevação do estresse social (ELLIS et al., 2012; HUNTINGFORD et al., 2006; MARTINS et al., 2012); e por respostas comportamentais, como comportamentos anormais (HUNTINGFORD et al., 2006; MARTINS et al., 2012), estereotipados (ALMAZÁN-RUEDA; SCHRAMA; VERRETH, 2004) e alterações no comportamento agressivo (BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011; GAUY; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018; MARTINS et al., 2012). O comportamento agressivo, por exemplo, faz parte do repertório natural de várias espécies. No entanto, o aumento da agressividade leva ao aumento de injúrias físicas, podendo acarretar em morte (GREAVES; TUENE, 2001; JOHNSON et al., 2006); e aumenta o gasto energético, o que pode interferir no crescimento, reprodução e outras atividades do animal (FERNANDES; VOLPATO, 1993). Assim, os níveis de agressividade também são utilizados como indicadores de bem-estar.

Além das respostas comportamentais e fisiológicas, alguns parâmetros de desempenho produtivo também podem ser considerados indicadores de bem-estar. O crescimento, por exemplo, pode ser influenciado por estressores e pode ser reduzido pela diminuição do comportamento alimentar como resposta imediata ao estresse (WENDELAAR BONGA, 1997) ou como resposta ao estresse crônico, implicando em aumento do gasto de energia e consequente diminuição do crescimento (ELLIS et al., 2012; WENDELAAR BONGA, 1997). A eficiência alimentar é outro fator que pode sofrer impacto negativo do estresse nos animais (ELLIS et al., 2012), uma vez que ela reflete a relação entre alimento consumido e ganho de peso do animal (DE VERDAL et al., 2017). Sendo assim, animais cronicamente estressados podem ingerir alimento, porém, sem convertê-lo em crescimento. Portanto, uma boa eficiência alimentar pode indicar bons níveis de bem-estar. O fator de condição também pode indicar um bom bem-estar, já que está relacionado a boas condições de nutrição e saúde dos peixes (ANANI; NUNOO, 2016; FROESE, 2006). No geral, esses parâmetros são indicadores de gasto energético, saúde e bem-estar, porém, somente um desses indicadores pode não ser suficiente para distinguir os diferentes níveis de bem-estar do animal (HUNTINGFORD; KADRI, 2014; SOPINKA et al., 2016).

Grande parte do aumento dos trabalhos em bem-estar animal voltado aos peixes ocorreu devido à expansão da aquicultura no mundo, gerando maior interesse público e científico na área (ASHLEY, 2007; MARTINS et al., 2012). Nesses ambientes de criação, existem alguns estressores para os animais, como por exemplo, as interações agressivas entre os peixes (HUNTINGFORD et al., 2006), as quais vão causar injúrias e estresse social nos indivíduos (JOHNSSON et al., 2006); e a alta densidade de estocagem, a qual vai influenciar a qualidade da água e as interações sociais entre os animais (ELLIS et al., 2002). O contato contínuo com esses estressores pode causar prejuízos ao bem-estar dos peixes, uma vez que são difíceis de serem evitados nessa prática. Portanto, alternativas que reduzam esses efeitos negativos, tornam-se necessárias para melhorar o bem-estar na piscicultura (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2019).

A estimulação tátil, em forma de massagem ou toques, é uma alternativa que vem sendo usada para melhorar o bem-estar dos animais e vem se mostrando eficiente. Em mamíferos, por exemplo, diminui o estresse (FIELD et al., 2005; IM; KIM, 2009; PROBST et al., 2012) e a agressividade (WEI et al., 2013) e aumenta os níveis de serotonina (FIELD et al., 2005) e o peso corporal (WEI et al., 2013). Em peixes, Soares et al. (2011) demonstraram que a estimulação tátil diminui o estresse em peixes recifais, onde um peixe cliente (*Ctenochaetus striatus*) tem seus ectoparasitas removidos por outra espécie de peixe (*Labroides dimidiatus*), que fornece a estimulação tátil com as nadadeiras sobre o corpo do cliente, ao mesmo tempo que remove os parasitos. Essa resposta positiva encontrada para essa espécie de peixe pode estar associada ao repertório natural desses animais, os quais possuem a interação cliente-limpador como comportamento natural (GRUTTER, 1995). Da mesma forma que os mamíferos, que possuem contato físico positivo nas interações mãe-filhote e em situações de limpeza corporal (DUNBAR, 2010). Porém, algumas estimulações tácteis podem ser danosas para os animais, por exemplo, as provenientes de lutas (que podem causar lesões e dor). Nesse caso, pode ser que a estimulação tátil positiva tenha um significado diferente para as espécies que possuem lutas como parte do seu comportamento natural. Um exemplo é a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), que é uma espécie de ciclídeo muito importante para a aquicultura mundial e apresenta organização em um sistema social hierárquico, definindo a posição na hierarquia de dominância por meio de confrontos agressivos (ALVARENGA; VOLPATO, 1995; CARVALHO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2008). Foi demonstrado por Bolognesi, Gauy e Gonçalves-de-Freitas (2019) que a estimulação tátil diminui o número de comportamentos agressivos em machos isolados dessa espécie territorial, mas não diminui os níveis de cortisol.

Esses efeitos positivos relatados na literatura com peixes são provenientes de estimulação tátil de curto prazo (até 10 dias) e nada se sabe em prazos mais prolongados. Porém, existem alguns estudos mostrando que a estimulação tátil de longo prazo melhora o sistema imune (CHARNETSKI; RIGGERS; BRENNAN, 2004; FIELD, 1995), diminui o medo (SILVA et al., 2017) e a agressividade (VON KNORRING et al., 2008) em mamíferos. Assim, o tempo em contato com a

estimulação tátil, utilizado por Bolognesi, Gauy e Gonçalves-de-Freitas (2019), pode não ter sido suficiente para observar diminuição do cortisol na tilápia-do-nilo. Dessa forma, é importante saber se os efeitos da estimulação tátil encontrados para essa espécie se mantêm e/ou se potencializam a longo prazo e em animais agrupados, uma vez que esses animais são criados, na produção de corte, em altas densidades e por períodos mais prolongados. Com isso, o objetivo desta tese foi testar o efeito da estimulação tátil de longo prazo sobre o bem-estar da tilápia-do-nilo. Levantamos a hipótese de que os animais em contato com a estimulação tátil de longo prazo apresentam respostas positivas em indicadores de bem-estar (diminuição do estresse e agressividade e aumento no crescimento, eficiência alimentar e fator de condição), mesmo em condições estressantes, como a alta densidade populacional. Para testar nossa hipótese, desenvolvemos dois estudos:

1. “Estimulação tátil de longo prazo diminui agressividade e aumenta desempenho produtivo em grupos de tilápia-do-nilo”, cujo objetivo foi testar se a estimulação tátil de longo prazo melhora o bem-estar, reduzindo a agressividade e os níveis de cortisol associados ao estresse social em grupos de machos de tilápia-do-nilo. Se a estimulação tátil de longo prazo reduzir a agressividade, esperamos encontrar associação desse efeito com indicadores de bem-estar e, portanto, redução do cortisol e aumento dos parâmetros de desempenho produtivo. Além disso, as interações agressivas em peixes são seguidas por variações nos níveis de andrógenos (OLIVEIRA et al., 2002). Os níveis de testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) tendem a aumentar quando as interações agressivas aumentam ou quando a hierarquia de dominância é instável (WINGFIELD et al., 1990; ALMEIDA et al., 2014). Assim esperamos, também, uma variação nos níveis de andrógenos de acordo com a interação agressiva.

2. “Estimulação tátil de longo prazo diminui efeitos negativos da alta densidade de estocagem e aumenta desempenho produtivo na tilápia-do-nilo”, cujo objetivo foi testar se a estimulação tátil de longo prazo reduz os efeitos negativos da alta densidade de estocagem. Esperamos redução do estresse associado ao aumento dos parâmetros de desempenho produtivo (crescimento, eficiência alimentar e fator de condição) nos tratamentos com estimulação tátil corporal.

Estimulação táctil de longo prazo diminui agressividade e aumenta desempenho produtivo em grupos de tilápia-do-nylo

Ana Carolina dos Santos Gauy^{1,2}; Eliane Gonçalves-de-Freitas^{1,2}

¹Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²Centro de Aquicultura da UNESP, SP, Brasil.

RESUMO

A estimulação táctil corporal, semelhante à massagem, promove efeitos positivos no bem-estar dos animais, principalmente em mamíferos. Em peixes, esse estímulo, em curto prazo, diminui níveis de estresse em peixes recifais e reduz a agressividade em machos isolados de tilápia-do-nylo. Embora alguns estudos demonstrem que massagem em longo prazo tenha efeitos cumulativo em humanos, pouco se conhece sobre os efeitos de longo prazo da estimulação táctil em outros vertebrados. Portanto, testamos o efeito da estimulação táctil de longo prazo em grupos de machos adultos de tilápia-do-nylo sobre indicadores de bem-estar - a agressividade, o estresse e os parâmetros de desempenho produtivo. Quatro animais foram agrupados em aquários por 21 dias. Foram realizados dois tratamentos, sem estimulação táctil (N = 7, controle) e com estimulação táctil (N = 10). No tratamento com estimulação táctil, um aparato feito com hastes plásticas verticais com cerdas de silicone nas laterais foi posicionado no centro do aquário, assim quando os peixes atravessavam por ele recebiam a estimulação táctil. Um aparato similar, mas sem as cerdas de silicone foi usado no grupo controle. Os atravessamentos pelo aparato e as interações agressivas entre os indivíduos foram quantificados a cada 3 dias (10 min / dia). A biometria foi realizada nos dias 1 e 21 e a coleta de sangue para análise de cortisol, testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT) nos dias 7 e 21. Foram calculados o ganho de comprimento e peso, a taxa de crescimento específica, a taxa

de eficiência alimentar e o fator de condição em cada tratamento. Foi observado que os animais do tratamento com estimulação tátil atravessam espontaneamente pelo aparato. Esses animais apresentaram diminuição dos ataques e aumento das ameaças em relação ao controle e essa diminuição começa a partir do dia 10, sendo ainda mais acentuada a longo prazo. Esse efeito foi observado no peixe dominante do grupo. Além disso, o estresse do grupo foi diminuído mais rapidamente e os andrógenos parecem influenciar a agressividade e o crescimento dos animais nesse tratamento. Esses animais também apresentaram melhores desempenhos no crescimento, eficiência alimentar, sobrevivência e fator de condição. Desse modo, a estimulação tátil de longo prazo pode ser usada como uma ferramenta para melhorar o produto final da produção e aumentar o bem-estar dos peixes.

Palavras-chave: andrógenos, bem-estar, enriquecimento ambiental, estresse social, hierarquia social, taxa de crescimento.

ABSTRACT

Tactile body stimulation, like massage, promotes positive effects on animal welfare, especially in mammals. In fish, this stimulus, in a short period of time, decreases stress levels in reef fish and reduces aggressiveness in isolated males of Nile tilapia. Although some studies have shown that long-term massage has cumulative effects in humans, little is known about the long-term effects of tactile stimulation in other vertebrates. Therefore, we tested the effect of long-term tactile stimulation in groups of adult male Nile tilapia on welfare indicators - aggressiveness, stress and parameters of productive performance. Four animals were grouped in aquariums for 21 days. Two treatments were carried out, one without tactile stimulation (N = 7, control) and one with tactile stimulation (N = 10). In the latter, an apparatus made with vertical plastic rods with silicone bristles on the sides was positioned in the center of the aquarium, so when the fish passed through it, they received tactile stimulation. A similar apparatus, but without the silicone bristles, was used in the control group. Crossings through the apparatus and aggressive interactions between individuals

were quantified every 3 days (10 min / day). Biometrics were performed on days 1 and 21 and blood collection for analysis of cortisol, testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) was done on days 7 and 21. Length and weight gain, specific growth rate, feed efficiency rate and the condition factor were calculated in each treatment. It was observed that the animals of the treatment with tactile stimulation passed spontaneously through the apparatus. These animals showed a decrease in attacks and an increase in threats when compared to the control group and this decrease started from the 10th day, being even more accentuated in the long run (as days went by). This effect was observed in the dominant fish of the group. In addition, the group's stress was reduced more quickly and androgens seem to influence the aggressiveness and growth of the animals in this treatment. These animals also showed better performance in growth, feeding efficiency, survival and condition factor. Therefore, long-term tactile stimulation can be used as a tool to improve the final product of production and increase fish welfare.

Keywords: androgens, environmental enrichment, growth rate, social hierarchy, social stress, welfare.

1. Introdução

Em peixes, o estudo do bem-estar vem crescendo e está sendo tratado com a mesma importância de estudos com mamíferos (SARAIVA; ARECHAVALA-LOPEZ, 2019), uma vez que são animais sencientes (BROWN, 2015; DEAKIN et al., 2019; VOLPATO; GONÇALVES-DE-FREITAS; FERNANDES-DE-CASTILHO, 2007), ou seja, sentem dor, medo e estresse. Por isso, em ambientes de criação, diversas fontes estressoras prejudicam o bem-estar desses animais, como o confinamento (POTTINGER; PRUNET; PICKERING, 1992), capturas com rede (ELLIS et al., 2007), transporte (HASTEIN; SCARFE; LUND, 2005), interações agressivas (HUNTINGFORD et al., 2006) e estresse social decorrente das lutas (BARRETO; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015). Apesar de sabermos que o estresse é uma resposta adaptativa dos animais frente a desafios do ambiente (POTTINGER,

2008; WENDELAAR BONGA, 1997), o constante contato com esses estressores pode causar prejuízos sobre a saúde e bem-estar dos peixes (SCHRECK, 2000). A persistência desses estressores pode levar o animal ao distresse (estresse crônico ou prolongado), caracterizado pela redução da taxa de crescimento (FERNANDES; VOLPATO, 1993), redução da capacidade reprodutiva (HUNTINGFORD et al., 2006), destruição de neurônios (MCEWEN; SAPOLSKY, 1995), depressão do sistema imune (POTTINGER, 2008) e até a morte do animal (SCHRECK; TORT, 2016). Desta forma, o desenvolvimento de práticas que reduzam o estresse e os efeitos negativos das interações sociais é necessário para melhorar a aquicultura e o bem-estar dos peixes (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2019).

Uma das alternativas para melhorar o bem-estar de animais cativos que tem sido recentemente avaliada em diferentes espécies é a estimulação tátil. Muitos estudos foram realizados mostrando os aspectos positivos desse tipo de “massagem” nos animais, principalmente em mamíferos. Por exemplo, diminuição do estresse e elevação dos níveis de serotonina em seres humanos (FIELD et al., 2005); redução dos níveis de estresse em recém-nascidos prematuros humanos (IM; KIM, 2009) e gado de corte (PROBST et al., 2012, 2013); redução da taxa de batimentos cardíacos em leitões (TALLET et al., 2014), cordeiros (COULON et al., 2015) e vacas leiteiras (SCHMIED et al., 2010); redução dos níveis de cortisol plasmático em cães (REHN et al., 2014); prevenção de comportamentos depressivos e diminuição do estresse em ratos neonatais (FREITAS et al., 2015); aumento do peso corporal e diminuição da agressividade em roedores isolados (WEI et al., 2013). Em peixes, Soares et al. (2011) demonstraram que a estimulação tátil diminui o estresse em peixes recifais. Além disso, Bolognesi, Gauy e Gonçalves-de-Freitas (2019) demonstraram que a estimulação tátil diminui a agressividade de machos isolados da tilápia-do-nilo, mas não diminui o cortisol. Esses estudos com peixes, no entanto, foram realizados com animais isolados e em curtos períodos (ex. 10 dias ou menos) e nada se conhece sobre os efeitos a longo prazo. Uma das possíveis alterações no comportamento do grupo a longo prazo é associada à instabilidade social, que é a alteração da posição de dominante e submisso no grupo, ao longo do tempo, podendo elevar o estresse social, interações agressivas e injúrias (e.g.

BARRETO; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015), o que é prejudicial para os animais. Alguns estudos sugerem que massagem a longo prazo tenha efeito cumulativo em humanos (RAPAPORT; SCHETTLEE; BRESEE, 2012; VON KNORRING et al., 2008). Em bezerros, Silva et al. (2017) demonstraram diminuição do medo e melhora na interação com humanos dos animais submetidos a escovação a longo prazo. Além disso, estimulação tátil durante a infância melhora a resposta imune em humanos (FIELD, 1995) e cães (CHARNETSKI et al., 2004). Desse modo, pensando na aplicação da estimulação tátil para melhorar o bem-estar em peixes em condições de criação, é preciso conhecer os seus efeitos em prazos mais prolongados. Além disso, faz-se necessário conhecer o efeito da estimulação tátil em animais mantidos em grupos, uma vez que a tilápia-do-nylo é criada em altas densidades e é um animal social (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2019), podendo ter seu comportamento alterado pelo isolamento (e.g. GALHARDO; OLIVEIRA, 2014; GÓMEZ-LAPLAZA; MORGAN, 2003; GONÇALVES-DE-FREITAS; MARIGUELA, 2006). Portanto, o objetivo deste estudo foi testar se a estimulação tátil de longo prazo tem efeito positivo sobre o bem-estar em grupos sociais de tilápia-do-nylo, reduzindo a agressividade e os níveis de estresse social e melhorando os parâmetros de desempenho produtivo.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção dos peixes

Machos revertidos de tilápia-do-nylo linhagem GIFT (*Oreochromis niloticus*) provenientes de um fornecedor comercial (Piscicultura Projeto Peixe – Sales Oliveira, SP) foram aclimatados por 20 dias em caixas d'água de polietileno (ca. 500L, 1 peixe / 10L). A temperatura da água foi mantida em 27°C, por meio de aquecedores com termostatos e a qualidade da água foi mantida por meio de filtros biológicos Canister (filtragem de 400 L / h) e aeração constante. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz (07:00h às 19:00h). Os tanques foram sifonados semanalmente para remover as sobras de alimentos e fezes, com renovação de no máximo 25% da água, para que houvesse o mínimo de prejuízo para os animais (e.g. GAUY; BOSCOLO;

GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00h e 15:00h) com ração comercial para peixes (AGROMIX®, 32% PB), à saciedade aparente.

2.2. Aparato utilizado

O estimulador tátil é um aparato formado por uma estrutura retangular de PVC e por hastes plásticas verticais com cerdas de silicone nas laterais. Ele foi introduzido no centro do aquário e serviu para promover a estimulação tátil nos peixes (Figura 1A). Optamos pelas cerdas de silicone, pois são macias, não retiram o muco que reveste o corpo dos peixes e não provocam ferimentos (e.g. BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019). Foi utilizado, também, um aparato semelhante, porém sem as cerdas de silicone, o qual funcionou como controle, não promovendo a estimulação tátil (Figura 1B). Ambos os aparatos, cada um em seu respectivo tratamento, foram introduzidos no centro do aquário (Figura 1C), de forma que ao passarem pelo centro do aquário, os peixes do tratamento com estimulação tátil tinham contato com as cerdas de silicone (Figura 1D).

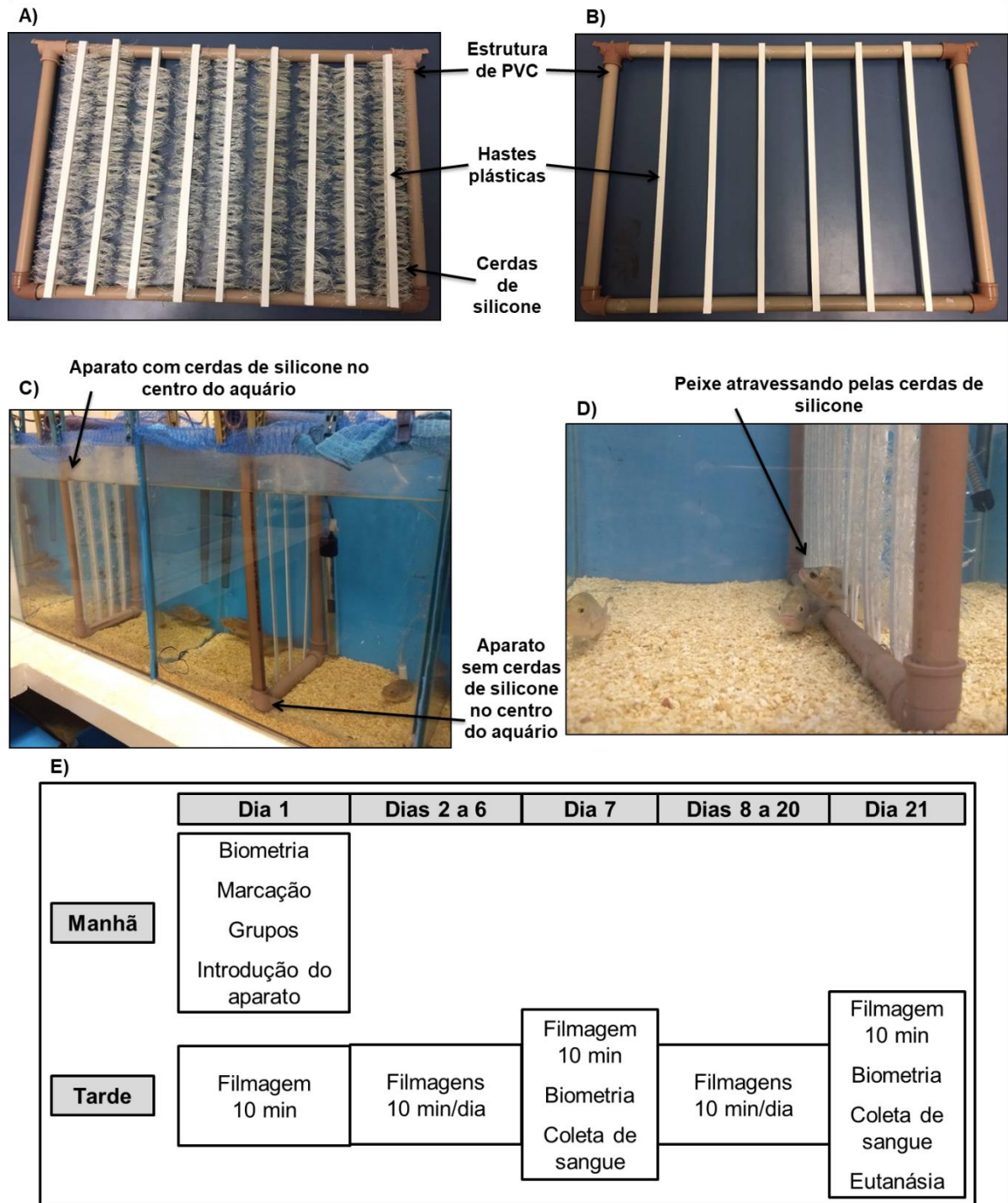


Figura 1. Estimulador tátil composto por uma estrutura retangular de PVC e hastes plásticas, (A) com cerdas de silicone que promovem a estimulação tátil e (B) sem as cerdas de silicone para controle. (C) Aparatos posicionados no centro do aquário. (D) Peixe atravessando pelas cerdas de silicone. (E) Cronograma das atividades dentro do delineamento experimental.

2.3. Delineamento experimental

Foi testado o efeito da estimulação tátil de longo prazo sobre o bem-estar em grupos de 4 machos de tilápia-do-nilo. Para isso, 108 animais foram submetidos a dois tratamentos: 1) Sem estimulação tátil (controle): (n = 14 grupos; 56 indivíduos) no qual foi introduzido um aparato sem as cerdas de silicone no centro do aquário, de modo que os animais não tinham acesso à estimulação tátil; 2) Com estimulação tátil: (n = 13 grupos; 52 indivíduos) no qual foi introduzido um aparato com cerdas de silicone no centro do aquário, de modo que os animais tinham acesso à estimulação tátil ao atravessarem pelo aparato. Porém, houve mortalidade de animais em alguns aquários (1 peixe morto por aquário), assim as réplicas com mortes foram excluídas das análises, pois a dinâmica das interações sociais pode ser alterada com número diferente de indivíduos no grupo (e.g. FALSARELLA; BRANDÃO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2017). Assim, foram analisadas 7 réplicas no controle e 10 réplicas no tratamento com estimulação tátil. Os aparatos foram posicionados nos aquários no primeiro dia de experimento. Os peixes foram anestesiados (Benzocaína, 0,03 g/L) e posteriormente medidos, pesados, marcados com elastômero colorido, agrupados e destinados a um dos tratamentos. Os grupos foram mantidos nos aquários por 21 dias. Durante esse período, os animais foram filmados todos os dias (10 min / dia). A cada 3 dias (dias 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 21) foi realizada a quantificação das interações agressivas e do número de atravessamentos dos animais pelo aparato durante esses 10 min de observação. Houve coleta de sangue dos animais, após anestesia (benzocaína, 0,09 g/L), nos dias 7 e 21 para análises de cortisol, testosterona (T) e 11-cetotestosterona (11-KT). O cortisol foi dosado, pois é um indicador fisiológico de estresse em peixes (ELLIS et al., 2012; HUNTINGFORD et al., 2006; MARTINS et al., 2012); a T e a 11-KT, pois são os principais andrógenos associados ao comportamento agressivo nesses animais (OLIVEIRA; GONÇALVES, 2008; TAVES et al., 2009). Nesses dias os animais também passaram por biometria, sendo a do dia 7 para ajuste da proporção da ração oferecida (4% da biomassa/dia, divididas em duas refeições por dia, 09:00h e 15:00h) e a do dia 21 para avaliação do crescimento dos animais. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados, por imersão em anestesia

(Benzocaína, 0,18 g/L), para inspeção das gônadas (Esquema do delineamento experimental - Figura 1E).

2.4. Interação agressiva

As interações agressivas foram quantificadas com base no etograma descrito para a tilápia-do-nilo em Carvalho e Gonçalves-de-Freitas (2008). Essas interações, nomeadas como confrontos totais, foram divididas em ataques e ameaças, pois os ataques envolvem maior gasto energético do que as ameaças (ALVARENGA; VOLPATO, 1995; GAUY; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018; HALLER; WITTEMBERGER, 1988) e podem variar de acordo com as condições sociais dos indivíduos. Ataques são as unidades agressivas que envolvem contato físico direto, e que geralmente são seguidos por um elevado gasto de energia (ROS; BECKER; OLIVEIRA, 2006). Foram quantificados os seguintes ataques: luta lateral, luta de boca, ondulação, mordida e perseguição. Já as ameaças são as unidades agressivas que não envolvem contato físico e que geralmente são seguidos por um reduzido gasto de energia (ROS; BECKER; OLIVEIRA, 2006). Foram considerados como ameaças: ameaça lateral, ameaça perpendicular e circulação.

2.5. Rank social

O *rank* dos indivíduos do grupo foi calculado por meio do índice de dominância ($ID = \text{frequência de comportamentos agressivos emitidos pelo indivíduo} / \text{frequência total de comportamentos agressivos no grupo}$) como utilizado por Boscolo, Morais e Gonçalves-de-Freitas (2011) e Gonçalves-de-Freitas et al. (2008) para tilápia-do-nilo. O ID varia de 0,0 a 1,0, sendo que o ID maior caracteriza o peixe dominante e o ID menor o peixe submisso. O ID tende a ser similar entre indivíduos antes do estabelecimento da posição social, aumentando para o dominante e reduzindo para o submisso (BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011; GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008).

2.6. Parâmetros de desempenho produtivo

Foram avaliados os seguintes parâmetros de cada indivíduo e do grupo (média do grupo):

- Ganho de comprimento = Comprimento padrão final – Comprimento padrão inicial;
- Ganho de peso = Peso final – Peso inicial;
- Coeficiente de variação do tamanho no grupo = (Desvio padrão/Média).100;
- Taxa de crescimento específica (SGR) = $(\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial} / \text{Tempo}) \cdot 100$.

Além disso, foram avaliados dois parâmetros (média do grupo) importantes na produção e bem-estar dos peixes:

- Eficiência alimentar, a qual reflete a relação entre alimento consumido e ganho de peso (DE VERDAL et al., 2017), aqui calculada pela taxa de eficiência alimentar (FER).

$$\text{FER} = \text{Ganho de peso} / \text{Quantidade de ração fornecida}.$$

Sendo que podemos assumir que a eficiência alimentar é melhorada quando a FER é aumentada (DE VERDAL et al., 2017);

- Fator de condição (K), o qual reflete o estado fisiológico do peixe em relação ao seu bem-estar (IGHWELA; AHMED; ABOL-MUNAFI, 2011), e foi calculado de acordo com (FROESE, 2006; FULTON, 1904):

$$K = (\text{Peso} / \text{Comprimento}^3) \cdot 100.$$

2.7. Coleta de sangue e dosagem hormonal

Os animais foram anestesiados (Benzocaína, 0,09 g/L), o sangue foi coletado por punção da veia caudal utilizando agulhas hipodérmicas e seringas heparinizadas. O manejo foi realizado em menos de 2 minutos para evitar interferência nos resultados dos níveis hormonais (POTTINGER, 2008). O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, o plasma foi separado e congelado a -20°C para posteriores dosagens hormonais. As dosagens hormonais foram realizadas pelo método ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay, utilizando kits comerciais (Cortisol: IBL - Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Alemanha; T e 11-KT:

Cayman Chemical, Michigan, EUA), já validado para a tilápia-do-nilo (e.g. BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019; BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011). Os três hormônios foram analisados, em duplicatas, em todos os peixes do experimento em ambos os dias (7 e 21). As amostras não foram diluídas para as análises de cortisol e foi utilizada diluição de 1:4 para as análises de T e 11-KT. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram, respectivamente: Cortisol - 6,3% e 11,2%; T – 9,6% e 9,5%; 11-KT – 7,3% e 11,7%.

2.8. Detalhes experimentais

Os peixes foram marcados com VIE - Elastômero Fluorescente de Implante Visível (e.g. BRANDÃO; BRAITHWAITE; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015; GAUY; BOLOGNESI; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019). Nesse procedimento, os animais foram mantidos sobre panos úmidos, para evitar atrito e preservar o muco natural do corpo dos indivíduos. O elastômero foi aplicado abaixo de 3 escamas de cada lado do peixe, não sendo necessário a aplicação subcutânea, evitando danos e estresse aos indivíduos. O período de 21 dias foi escolhido como longo prazo, pois ele corresponde ao triplo do tempo utilizado por Bolognesi, Gauy e Gonçalves-de-Freitas (2019) para fornecer à estimulação tátil a tilápia-do-nilo. Os animais foram agrupados em aquários de 60 x 60 x 40 cm; ca. 140L (1 peixe / 35L). Todos os aquários foram revestidos por plástico azul opaco nas laterais e parte posterior para evitar contato visual com animais de aquários vizinhos, ficando apenas a parte frontal livre para as observações e filmagens. O azul foi utilizado porque previne o estresse na tilápia-do-nilo (MAIA; VOLPATO, 2013). As filmagens foram realizadas por câmeras posicionadas em frente aos aquários. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz (07:00h às 19:00h). Os parâmetros da água foram monitorados nos dias 1, 7 e 21, as médias $\pm$ erro padrão dos dias nos tratamentos sem estimulação e com estimulação foram, respectivamente: Temperatura - $27,27 \pm 0,17^{\circ}\text{C}$ e $27,39 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$; pH – $7,0 \pm 0,04$ e $7,0 \pm 0,04$ (ambos medidos por aparelho eletrônico - Hanna HI98127); oxigênio dissolvido $8,86 \pm 0,10$ ppm e $8,58 \pm 0,08$ ppm (medido por aparelho eletrônico - Hanna HI9146); nível de amônia - $0,17 \pm 0,04$ ppm e $0,11 \pm 0,03$ ppm;

nível de nitrito - $0,12 \pm 0,04$ ppm e $0,11 \pm 0,02$ ppm (ambos medidos por kits comerciais - LabconTest). Os animais foram alimentados nos mesmos horários e com a mesma ração fornecida durante o período de aclimação, porém com a quantidade de 4% da biomassa do grupo. A quantidade de ração fornecida durante todo o experimento foi igual entre os tratamentos (média $\pm$ EP de ração oferecida (g) - tratamento sem estimulação: $63,95 \pm 2,67$; tratamento com estimulação: $54,01 \pm 4,30$; teste t independente, $t_{(15)} = 1,76$, $p = 0,10$).

2.9. Análise de dados

Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (HA; HA, 2012; LEHNER, 1996) e a homocedasticidade por Fmax (ZAR, 1999). Quando necessário, os dados foram transformados por raiz ($x + 0,5$) para ajustar a homocedasticidade (ZAR, 1999). Foi utilizado ANOVA para modelos mistos para comparar o número de atravessamentos do grupo pelo aparato ao longo das observações (variáveis dependentes) entre os tratamentos (variáveis categóricas); o número de ataques e ameaças do grupo e do peixe alfa ao longo das observações (variáveis dependentes) entre os tratamentos (variáveis categóricas); fator de condição inicial e final (variáveis dependentes) entre os tratamentos (variáveis categóricas); nível dos hormônios (cortisol, T e 11-KT) e metabolização dos andrógenos (11KT/T) nos dias 7 e 21 (variáveis dependentes) entre os tratamentos e *ranks* (variáveis categóricas). ANOVA fatorial foi usada para comparar a soma do número de atravessamentos em todas as observações (variável dependente) entre os tratamentos e *ranks* (variáveis categóricas); a soma do número de ataques e ameaças em todas as observações (variáveis dependentes) entre os tratamentos e *ranks* (variáveis categóricas); ganho de comprimento, ganho de peso e SGR (variáveis dependentes) entre os tratamentos e *ranks* (variáveis categóricas). Teste de Tukey para amostras desiguais foi utilizado como teste post-hoc. Quando necessário, uma vez que as análises envolvem muitas variáveis, *Planned comparisons* foi utilizado para contrastar entre tratamentos. Teste t independente foi usado para comparar a soma do número de confrontos totais, ataques e ameaças de todas as observações, os comprimentos padrão e os pesos iniciais e finais, os

coeficientes de variação do grupo, o ganho de comprimento, o ganho de peso, o SGR e a taxa de eficiência alimentar entre os tratamentos. Binomial de Goodman foi usado para comparar o número de réplicas com mortalidade em cada tratamento. Correlações entre o número de atravessamentos, o número ataques, o número de ameaças, o crescimento e os níveis hormonais no dia 21 foram feitas por teste de Spearman. Foi considerado $P \leq 0,05$ para significância estatística.

2.10. Nota ética

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto, SP (CEUA-IBILCE/UNESP), protocolo nº 213/2019.

3. Resultados

3.1. Atravessamentos

Houve diferença significativa no número de atravessamentos do grupo na interação entre observação e tratamento (ANOVA para modelos mistos, $F_{(7,105)} = 3,89$, $p = 0,0008$; Figura 2A). O número de atravessamentos do grupo foi maior no controle do que no tratamento com estimulação tátil em todas as observações ($p < 0,004$; Tabela 1). Além disso, não houve diferença na soma do número de atravessamentos em todas as observações por *rank* na interação entre tratamento e *rank* (ANOVA fatorial, $F_{(3,60)} = 1,13$, $p = 0,34$). No entanto, houve diferença entre os tratamentos ($F_{(1,60)} = 120,02$, $p < 0,0001$) e entre os *ranks* ($F_{(3,60)} = 5,30$, $p = 0,003$; Figura 2B). O número de atravessamentos de todos os *ranks* foi maior no controle do que no tratamento com estimulação tátil ($p < 0,003$). Porém, todos os *ranks* tiveram número semelhante de atravessamentos dentro dos dois tratamentos ($p > 0,06$).

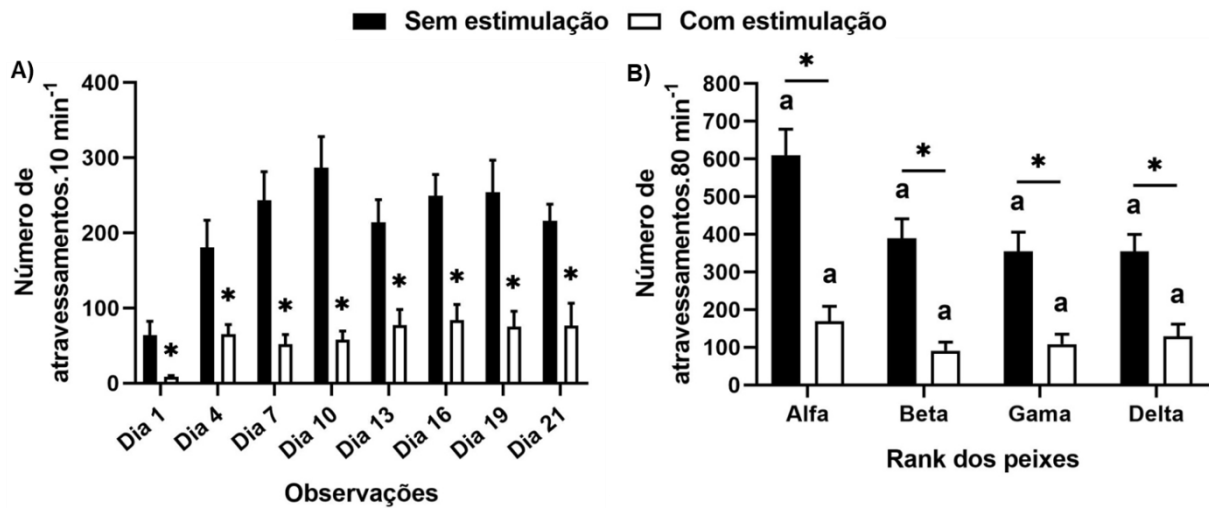


Figura 2: (A) Média $\pm$ EP do número de atravessamentos do grupo pelo centro do aquário em cada observação. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos usando *Planned Comparisons*. (B) Média $\pm$ EP do número total de atravessamentos em todas as observações por *rank*. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos. Letras comparam os *ranks* dentro de cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística. ANOVA fatorial seguida de Tukey para amostras desiguais.

Tabela 1: Comparação por *Planned Comparisons* do número de atravessamentos do grupo, agressividade do grupo e agressividade do peixe alfa entre os tratamentos em cada observação.

Atravessamentos do grupo				
Observação	Valor de F _(1,15)	p		
Dia 1	13,69	0,002		
Dia 4	11,61	0,004		
Dia 7	29,50	0,00007		
Dia 10	38,26	0,00002		
Dia 13	14,77	0,001		
Dia 16	22,65	0,0002		
Dia 19	17,18	0,0009		
Dia 21	12,24	0,003		
Agressividade do grupo				
Ataques			Ameaças	
Observação	Valor de F _(1,15)	p	Valor de F _(1,15)	p
Dia 1	1,86	0,19	2,79	0,11
Dia 4	0,13	0,72	3,39	0,08
Dia 7	1,86	0,19	10,51	0,005
Dia 10	7,30	0,02	8,91	0,009
Dia 13	3,43	0,08	11,99	0,003
Dia 16	12,46	0,003	1,38	0,26
Dia 19	93,25	< 0,0001	12,93	0,003
Dia 21	116,40	< 0,0001	0,06	0,80
Agressividade do peixe alfa				
Ataques			Ameaças	
Observação	Valor de F _(1,15)	p	Valor de F _(1,15)	p
Dia 1	0,19	0,67	5,62	0,03
Dia 4	0,22	0,64	0,13	0,73
Dia 7	2,92	0,11	5,83	0,03
Dia 10	5,67	0,03	6,27	0,02
Dia 13	2,23	0,15	12,87	0,003
Dia 16	12,28	0,003	6,08	0,03
Dia 19	54,99	< 0,0001	19,86	0,0005
Dia 21	177,20	< 0,0001	1,76	0,20

Valores significativamente diferentes estão destacados em cinza e negrito.

3.2. Agressividade por grupo

A soma do número de confrontos totais (ataques + ameaças) do grupo em todas as observações foi maior no controle do que no tratamento com estimulação

táctil (teste t independente, $t_{(15)} = 3,26$, $p = 0,005$; Figura 3A), assim como a soma do número de ataques (teste t independente, $t_{(15)} = 4,43$, $p = 0,0005$; Figura 3B). Por outro lado, a soma do número de ameaças foi menor no controle do que no tratamento com estimulação táctil (teste t independente, $t_{(15)} = -2,88$, $p = 0,01$; Figura 3C). Além disso, houve diferença significativa no número de ataques do grupo na interação entre observação e tratamento (ANOVA para modelos mistos, $F_{(7,105)} = 3,80$, $p = 0,001$; Figura 3D). O número de ataques do grupo foi maior no controle do que no tratamento com estimulação táctil a partir do dia 10 ($p < 0,02$), exceto no dia 13 que foi igual ($p = 0,08$; Tabela 1). Além disso, o número de ataques no tratamento com estimulação foi menor nos dias 19 e 21 comparado com o dia 16 (*Planned Comparisons*, dia 16 e 19 - $F_{(1,15)} = 17,01$, $p = 0,0009$; dia 16 e 21 - $F_{(1,15)} = 19,72$, $p = 0,0005$). Também houve diferença significativa no número de ameaças do grupo na interação entre observação e tratamento (ANOVA para modelos mistos, $F_{(7,105)} = 4,00$, $p = 0,0006$; Figura 3E). O número de ameaças do grupo foi menor no controle do que no tratamento com estimulação táctil a partir do dia 7 ($p < 0,009$), exceto nos dias 16 e 21 que foi igual ($p > 0,26$; Tabela 1).

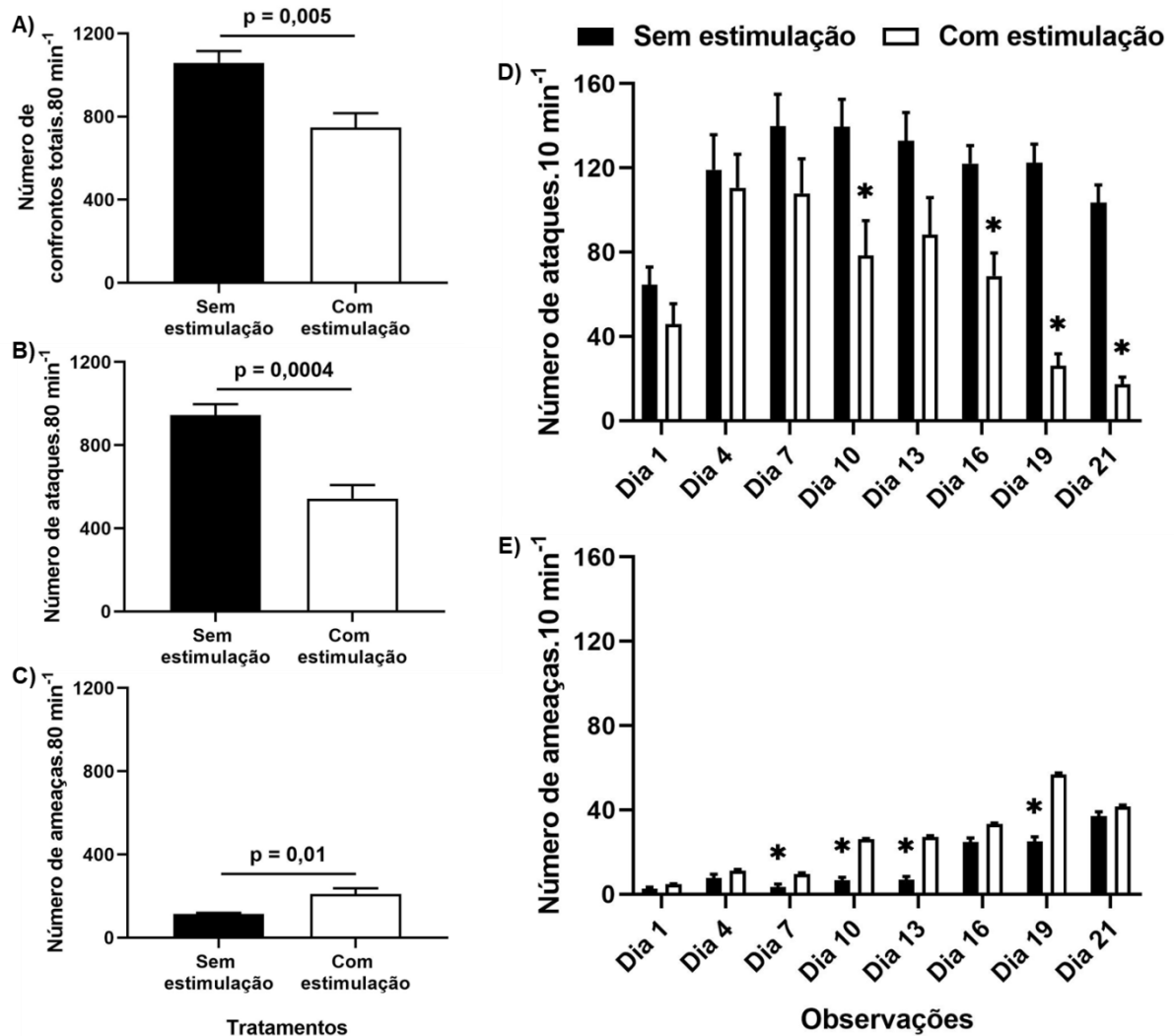


Figura 3: Média $\pm$ EP da soma do número de (A) confrontos totais, (B) ataques e (C) ameaças do grupo em todas as observações. Comparação entre os tratamentos por teste t independente. Média $\pm$ EP do número de (D) ataques e (E) ameaças do grupo em cada observação. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos usando *Planned Comparisons*.

3.3. Agressividade por rank

Houve diferença na soma do número de ataques em todas as observações por rank na interação entre tratamento e rank (ANOVA fatorial, $F_{(3,60)} = 5,40$, $p = 0,002$; Figura 4A). O número de ataques do peixe alfa foi maior no controle do que no tratamento com estimulação tátil ($p = 0,0001$) e foi igual entre os tratamentos para

os peixe beta, gama e delta ($p > 0,21$). Além disso, dentro dos dois tratamentos, todos os *ranks* tiveram número de ataques diferente, sendo o do peixe alfa maior e o do peixe delta menor ($p < 0,04$). Do mesmo modo, houve diferença na soma do número de ameaças em todas as observações por *rank* na interação entre tratamento e *rank* (ANOVA fatorial, $F_{(3,60)} = 8,47$, $p = 0,00008$; Figura 4B). O número de ameaças do peixe alfa foi menor no controle do que no tratamento com estimulação tátil ($p = 0,0003$) e foi igual entre os tratamentos para os peixe beta, gama e delta ($p > 0,47$). Dentro do controle, os peixes alfa, beta e gama tiveram número semelhante de ameaças ($p > 0,36$), sendo menor para o peixe delta ($p < 0,007$). Dentro do tratamento com estimulação tátil, todos os *ranks* tiveram número de ameaças diferente, sendo o do peixe alfa maior e o do peixe delta menor ($p < 0,02$).

Além disso, analisando a agressividade do peixe alfa, houve diferença significativa no número de ataques na interação entre observação e tratamento (ANOVA para modelos mistos, $F_{(7,105)} = 4,59$, $p = 0,0002$; Figura 4C). O número de ataques do peixe alfa foi maior no controle do que no tratamento com estimulação tátil a partir do dia 10 ($p < 0,03$), exceto no dia 13 que foi igual ($p = 0,15$; Tabela 1). Além disso, o número de ataques no tratamento com estimulação tátil foi menor nos dias 19 e 21 comparado com o dia 16 (*Planned Comparisons*, dia 16 e 19 - $F_{(1,15)} = 6,78$, $p = 0,02$; dia 16 e 21 - $F_{(1,15)} = 15,82$, $p = 0,001$). Também houve diferença significativa no número de ameaças do peixe alfa na interação entre observação e tratamento (ANOVA para modelos mistos, $F_{(7,105)} = 4,90$, $p = 0,00008$; Figura 4D). O número de ameaças do peixe alfa foi menor no controle do que no tratamento com estimulação tátil em todos os dias ($p < 0,03$), exceto nos dias 4 e 21 que foi igual ($p > 0,20$; Tabela 1).

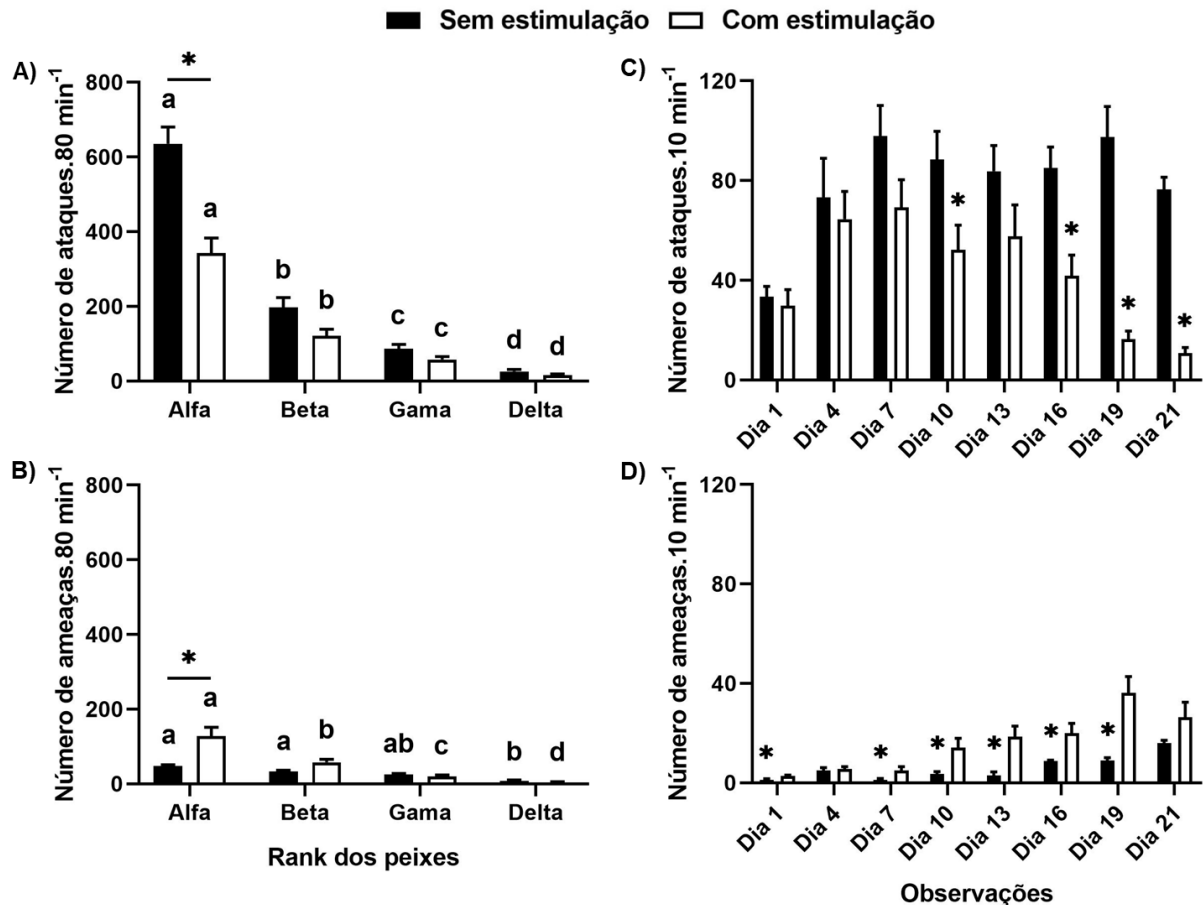


Figura 4: Média $\pm$ EP da soma do número de (A) ataques e (B) ameaças em todas as observações por *rank*. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos. Letras comparam os *ranks* dentro de cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença estatística. ANOVA fatorial seguida de Tukey para amostras desiguais. Média $\pm$ EP do número de (C) ataques e (D) ameaças do peixe alfa em cada observação. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos usando *Planned Comparisons*.

3.4. Hormônios

Houve diferença no nível de cortisol entre os dias 7 e 21 (ANOVA para modelos mistos, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 1,68$, $p = 0,20$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 0,07$, $p = 0,98$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 1,48$, $p = 0,23$; entre dias de observação: $F_{(1,60)} = 7,06$, $p = 0,01$; com interação marginalmente significativa entre dias de observação e tratamento: $F_{(1,60)} = 3,78$, $p = 0,056$; sem interação entre dias

de observação e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,97$, $p = 0,41$; sem interação entre dias de observação, tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,76$, $p = 0,52$). Houve diminuição do nível de cortisol do grupo no controle entre os dias 7 e 21 ($p = 0,02$; Figura 5A), o que não aconteceu no tratamento com estimulação tátil ($p = 0,94$). Além disso, não houve diferença do nível de cortisol do grupo entre os tratamentos no dia 7 ($p = 0,16$) nem no dia 21 ($p = 0,99$). *Planned Comparisons* mostrou que não houve diferença no nível de cortisol entre os dias 7 e 21 em nenhum *rank* em ambos os tratamentos ($p > 0,19$; Figura 5E), exceto o peixe gama do controle que teve o nível de cortisol diminuído ($p = 0,004$).

Houve diferença no nível de T entre os dias 7 e 21 (ANOVA para modelos mistos, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 4,53$, $p = 0,03$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 1,56$, $p = 0,21$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,09$, $p = 0,96$; entre dias de observação: $F_{(1,60)} = 9,26$, $p = 0,003$; sem interação entre dias de observação e tratamento: $F_{(1,60)} = 2,34$, $p = 0,13$; sem interação entre dias de observação e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,08$, $p = 0,97$; sem interação entre dias de observação, tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,42$, $p = 0,74$). Não houve diferença do nível de T do grupo no controle entre os dias 7 e 21 ($p = 0,75$; Figura 5B), porém houve aumento no tratamento com estimulação tátil ($p = 0,004$). Além disso, não houve diferença do nível de T do grupo entre os tratamentos no dia 7 ($p = 0,08$) nem no dia 21 ($p = 0,95$). *Planned Comparisons* mostrou que houve aumento do nível de T entre os dias 7 e 21 nos peixes alfa e beta do tratamento com estimulação tátil ($p < 0,05$; Figura 5F). Porém não houve diferença nos peixes gama e delta e em nenhum *rank* do controle ($p > 0,11$).

Não houve diferença no nível de 11-KT entre os dias 7 e 21 (ANOVA para modelos mistos, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 6,73$, $p = 0,01$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 3,23$, $p = 0,03$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,09$, $p = 0,97$; entre dias de observação: $F_{(1,60)} = 0,81$, $p = 0,37$; sem interação entre dias de observação e tratamento: $F_{(1,60)} = 0,02$, $p = 0,89$; sem interação entre dias de observação e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,78$, $p = 0,51$; sem interação entre dias de observação, tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 1,13$, $p = 0,34$). Não houve diferença do nível de 11-KT do grupo entre os dias 7 e 21 em nenhum dos tratamentos ($p > 0,90$; Figura 5C). Além disso, não

houve diferença do nível de 11-KT do grupo entre os tratamentos no dia 7 ($p = 0,25$) nem no dia 21 ($p = 0,19$). *Planned Comparisons* mostrou que não houve diferença no nível de 11-KT entre os dias 7 e 21 em nenhum *rank* em ambos os tratamentos ($p > 0,08$; Figura 5G),

Houve diferença na metabolização dos andrógenos (11-KT/T) entre os dias 7 e 21 (ANOVA para modelos mistos, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 2,32$, $p = 0,13$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 0,51$, $p = 0,68$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,05$, $p = 0,98$; entre dias de observação: $F_{(1,60)} = 1,74$, $p = 0,19$; com interação entre dias de observação e tratamento: $F_{(1,60)} = 4,45$, $p = 0,04$; sem interação entre dias de observação e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,36$, $p = 0,78$; sem interação entre dias de observação, tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,07$, $p = 0,98$). Não houve diferença de 11KT/T do grupo no controle entre os dias 7 e 21 ($p = 0,95$; Figura 5D), porém houve diminuição no tratamento com estimulação tátil ($p = 0,04$). Além disso, não houve diferença de 11-KT/T do grupo entre os tratamentos no dia 7 ($p = 0,08$) nem no dia 21 ($p = 0,96$). *Planned Comparisons* mostrou que não houve diferença de 11-KT/T entre os dias 7 e 21 em nenhum *rank* em ambos os tratamentos ($p > 0,07$; Figura 5H),

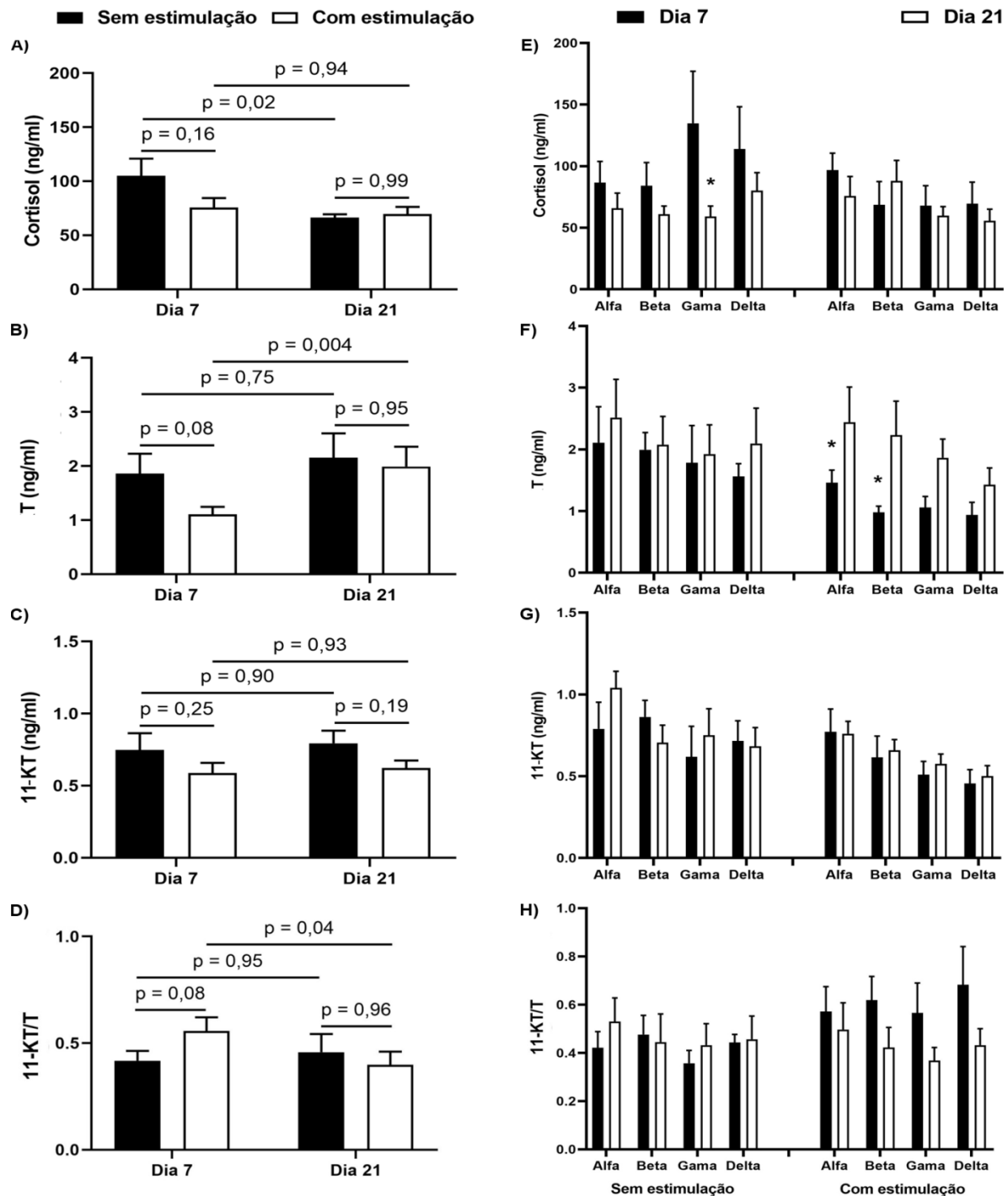


Figura 5: Média $\pm$ EP do nível de (A) cortisol, (B) T, (C) 11-KT e (D) 11-KT/T do grupo nos dias 7 e 21. ANOVA para modelos mistos seguida de Tukey para amostras desiguais. Média $\pm$ EP do nível de (E) cortisol, (F) T, (G) 11-KT e (H) 11-KT/T por *rank* nos dias 7 e 21. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os dias 7 e 21 em cada *rank* usando *Planned Comparisons*.

3.5. Desempenho produtivo

Não houve diferença entre o peso e comprimento padrão iniciais nem finais entre os tratamentos, assim como nos respectivos coeficientes de variação do grupo (Tabela 2). Não houve diferença no ganho de comprimento do grupo entre os tratamentos (teste t independente, $t_{(15)} = -1,39$, $p = 0,18$; Figura 6A). Porém, o ganho de peso do grupo foi menor no controle do que no tratamento com estimulação tátil (teste t independente, $t_{(15)} = -2,30$, $p = 0,03$; Figura 6B), assim como a taxa de crescimento específica (teste t independente, $t_{(15)} = -2,38$, $p = 0,03$; Figura 6C). Além disso, não houve diferença no ganho de comprimento em nenhum *rank* entre os tratamentos (ANOVA fatorial, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 3,20$, $p = 0,08$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 8,11$, $p = 0,0001$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 1,21$, $p = 0,31$; Figura 6D). Porém, houve diferença no ganho de peso dos *ranks* entre os tratamentos (ANOVA fatorial, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 8,73$, $p = 0,004$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 11,32$, $p < 0,0001$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,91$, $p = 0,44$; Figura 6E). *Planned Comparisons* mostrou que os peixes alfa ($F_{(1,60)} = 6,37$, $p = 0,01$) e beta ($F_{(1,60)} = 4,20$, $p = 0,04$) tiveram menor ganho de peso no controle do que no tratamento com estimulação tátil e os peixes gama ($F_{(1,60)} = 0,46$, $p = 0,50$) e delta ($F_{(1,60)} = 0,43$, $p = 0,51$) ganho de peso igual entre os tratamentos. Do mesmo modo, a taxa de crescimento específica dos *ranks* foi diferente entre os tratamentos (ANOVA fatorial, entre tratamentos: $F_{(1,60)} = 12,89$, $p = 0,0006$; entre *ranks*: $F_{(3,60)} = 3,60$, $p = 0,02$; sem interação entre tratamento e *rank*: $F_{(3,60)} = 0,31$, $p = 0,81$; Figura 6F). *Planned Comparisons* mostrou que os peixes alfa ($F_{(1,60)} = 5,03$, $p = 0,03$) e beta ($F_{(1,60)} = 5,36$, $p = 0,02$) tiveram menor taxa de crescimento específico no controle do que no tratamento com estimulação tátil e os peixes gama ($F_{(1,60)} = 1,87$, $p = 0,18$) e delta ($F_{(1,60)} = 1,57$, $p = 0,21$) taxa de crescimento específico igual entre os tratamentos.

Tabela 2 Média $\pm$ EP do comprimento padrão e peso do grupo no início e no final do experimento, e seus respectivos coeficientes de variação, nos dois tratamentos.

Variável	Sem estimulação (n = 7)	Com estimulação (n = 10)	Valor de $t_{(15)}$	p
CP inicial	8,59 $\pm$ 0,17	8,10 $\pm$ 0,22	1,64	0,12
CV do grupo	6,94 $\pm$ 0,95	5,86 $\pm$ 0,81	0,86	0,40
P inicial	21,67 $\pm$ 1,17	18,51 $\pm$ 1,62	1,45	0,17
CV do grupo	21,94 $\pm$ 3,84	20,24 $\pm$ 2,87	0,36	0,72
CP final	9,17 $\pm$ 0,12	8,81 $\pm$ 0,25	1,14	0,27
CV do grupo	7,65 $\pm$ 1,11	8,14 $\pm$ 1,23	- 0,28	0,78
P final	24,83 $\pm$ 0,89	23,87 $\pm$ 1,69	0,44	0,66
CV do grupo	27,06 $\pm$ 3,94	26,85 $\pm$ 3,91	0,04	0,97

Teste t independente entre os tratamentos. CP: Comprimento padrão (cm); CV: Coeficiente de variação (%); P: Peso (g).

A taxa de eficiência alimentar foi menor no controle do que no tratamento com estimulação tátil (teste t independente, $t_{(15)} = -2,55$, $p = 0,02$; Figura 6G). Além disso, houve uma interação marginalmente significativa entre tratamento e fator de condição (ANOVA para modelos mistos, $F_{(1,15)} = 4,40$, $p = 0,05$; Figura 6H). *Planned Comparisons* mostrou que não teve diferença no fator de condição inicial entre os tratamentos ($F_{(1,15)} = 0,005$, $p = 0,94$), porém houve diferença no fator de condição final ($F_{(1,15)} = 12,54$, $p = 0,003$). No controle houve diminuição comparando o fator de condição do início e do final do período ($F_{(1,15)} = 5,22$, $p = 0,03$), o que não ocorreu no tratamento com estimulação tátil, onde o fator de condição se manteve igual ($F_{(1,15)} = 0,29$, $p = 0,60$). A mortalidade dos animais foi maior no controle, onde 7 de 14 réplicas foram perdidas por morte de 1 peixe (50% de mortalidade, Binomial de Goodman, $p > 0,05$), do que no tratamento com estimulação tátil, onde 3 de 13 réplicas foram perdidas (23,07% de mortalidade, Binomial de Goodman, $p < 0,05$).

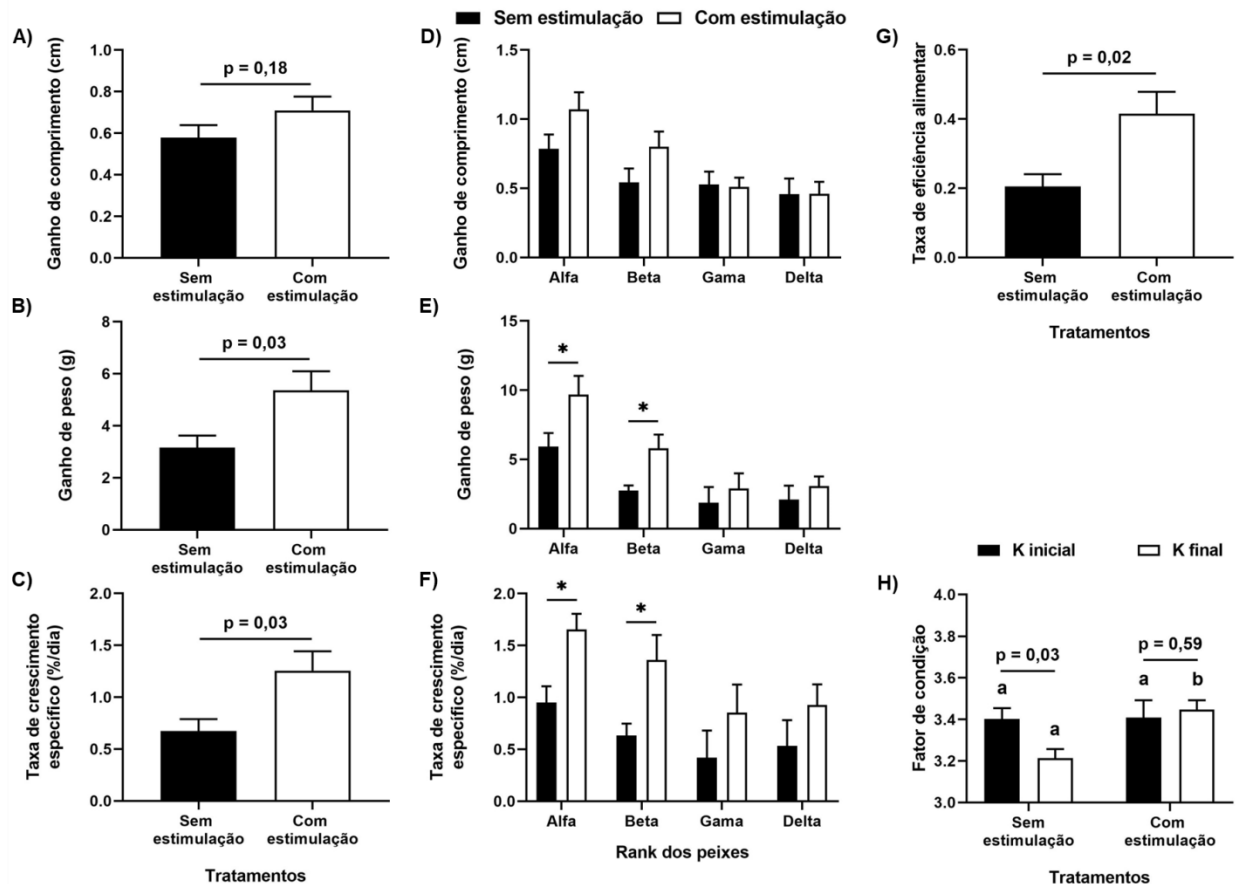


Figura 6: Média $\pm$ EP do (A) ganho de comprimento, (B) ganho de peso e (C) taxa de crescimento específico do grupo. Comparação entre os tratamentos por teste t independente. Média $\pm$ EP do (D) ganho de comprimento, (E) ganho de peso e (F) taxa de crescimento específico por *rank*. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos usando *Planned Comparisons*. (G) Média $\pm$ EP da taxa de eficiência alimentar do grupo em cada tratamento. Comparação entre os tratamentos por teste t independente. (H) Média $\pm$ EP do fator de condição no início e final do período experimental. Valores de p indicam diferenças significativas dentro de cada tratamento. Letras comparam os fatores de condição inicial e final entre os tratamentos. Letras diferentes indicam diferença estatística. *Planned Comparisons*.

3.6. Correlações

Foram encontradas algumas correlações entre as variáveis analisadas, nos dois tratamentos, tanto para o grupo, quanto para o peixe alfa (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação entre número de atravessamentos, número ataques, número de ameaças, crescimento e níveis hormonais no dia 21, do grupo e do peixe alfa, nos tratamentos sem (N = 7) e com (N = 10) estimulação táctil.

	GRUPO		PEIXE ALFA	
	Sem estimulação	Com estimulação	Sem estimulação	Com estimulação
Atravessamentos				
Ataques	r = 0,75 p = 0,052	r = 0,39 p = 0,26	r = 0,79 p = 0,03	r = 0,39 p = 0,26
Ameaças	r = - 0,04 p = 0,94	r = 0,33 p = 0,35	r = 0,04 p = 0,94	r = 0,52 p = 0,12
Cortisol				
Atravessamentos	r = 0,39 p = 0,38	r = 0,05 p = 0,88	r = 0,53 p = 0,21	r = 0,09 p = 0,80
Ataques	r = 0,46 p = 0,29	r = - 0,30 p = 0,40	r = 0,75 p = 0,052	r = 0,43 p = 0,21
Ameaças	r = - 0,74 p = 0,056	r = - 0,68 p = 0,03	r = 0,42 p = 0,35	r = 0,27 p = 0,45
Ganho de peso	r = -0,53 p = 0,21	r = 0,42 p = 0,23	r = - 0,14 p = 0,76	r = - 0,53 p = 0,12
Ganho de comprimento	r = - 0,54 p = 0,22	r = 0,18 p = 0,63	r = - 0,13 p = 0,79	r = - 0,49 p = 0,15
SGR	r = - 0,64 p = 0,12	r = 0,62 p = 0,053	r = - 0,25 p = 0,59	r = - 0,10 p = 0,78
T	r = - 0,57 p = 0,18	r = 0,44 p = 0,20	r = - 0,78 p = 0,03	r = 0,36 p = 0,31
11-KT	r = - 0,36 p = 0,43	r = - 0,17 p = 0,63	r = 0,36 p = 0,43	r = 0,17 p = 0,63
11-KT/T	r = 0,43 p = 0,34	r = - 0,47 p = 0,17	r = 0,75 p = 0,052	r = - 0,33 p = 0,35
T				
Atravessamentos	r = - 0,03 p = 0,94	r = - 0,15 p = 0,68	r = - 0,75 p = 0,052	r = 0,07 p = 0,85
Ataques	r = 0,07 p = 0,88	r = - 0,22 p = 0,53	r = - 0,78 p = 0,04	r = - 0,18 p = 0,62
Ameaças	r = 0,48 p = 0,27	r = - 0,61 p = 0,059	r = 0,11 p = 0,81	r = - 0,27 p = 0,45
Ganho de peso	r = 0,64 p = 0,12	r = - 0,10 p = 0,78	r = 0,53 p = 0,21	r = - 0,83 p = 0,003
Ganho de comprimento	r = 0,75 p = 0,052	r = - 0,22 p = 0,53	r = 0,29 p = 0,53	r = - 0,65 p = 0,04

Continua

SGR	r = 0,71 p = 0,07	r = 0,28 p = 0,42	r = 0,75 p = 0,052	r = - 0,19 p = 0,60
11-KT	r = 0,18 p = 0,70	r = 0,22 p = 0,53	r = - 0,50 p = 0,25	r = - 0,05 p = 0,88
11-KT/T	r = - 0,75 p = 0,052	r = - 0,75 p = 0,01	r = - 0,93 p = 0,002	r = - 0,98 p < 0,0001
11-KT				
Atravessamentos	r = 0,57 p = 0,18	r = 0,31 p = 0,38	r = 0,32 p = 0,48	r = 0,53 p = 0,11
Ataques	r = 0,18 p = 0,70	r = 0,04 p = 0,91	r = 0,07 p = 0,88	r = 0,64 p = 0,04
Ameaças	r = 0,52 p = 0,23	r = 0,19 p = 0,60	r = - 0,34 p = 0,45	r = 0,69 p = 0,02
Ganho de peso	r = - 0,003 p = 0,94	r = 0,02 p = 0,96	r = - 0,18 p = 0,70	r = 0,16 p = 0,65
Ganho de comprimento	r = - 0,39 p = 0,38	r = 0,15 p = 0,67	r = - 0,56 p = 0,19	r = 0,11 p = 0,75
SGR	r = 0,03 p = 0,94	r = - 0,12 p = 0,75	r = - 0,46 p = 0,29	r = - 0,30 p = 0,40
11-KT/T	r = 0,43 p = 0,34	r = 0,36 p = 0,31	r = 0,71 p = 0,07	r = 0,10 p = 0,78
11-KT/T				
Atravessamentos	r = 0,53 p = 0,21	r = 0,53 p = 0,12	r = 0,53 p = 0,21	r = - 0,04 p = 0,90
Ataques	r = 0,36 p = 0,43	r = 0,38 p = 0,27	r = 0,57 p = 0,18	r = 0,16 p = 0,65
Ameaças	r = - 0,07 p = 0,87	r = 0,78 p = 0,007	r = - 0,18 p = 0,70	r = 0,26 p = 0,46
Ganho de peso	r = - 0,57 p = 0,18	r = 0,10 p = 0,78	r = - 0,53 p = 0,21	r = 0,79 p = 0,006
Ganho de comprimento	r = - 0,93 p = 0,002	r = 0,22 p = 0,53	r = - 0,38 p = 0,40	r = 0,62 p = 0,053
SGR	r = - 0,61 p = 0,15	r = - 0,22 p = 0,53	r = - 0,75 p = 0,052	r = 0,08 p = 0,83

Correlação de Spearman. Foi considerado $P \leq 0,05$ para significância estatística. Correlações significativamente diferentes estão destacadas em cinza e negrito.

4. Discussão

Neste estudo foi observado que a estimulação tátil diminui a agressividade dos animais no grupo, tendo um efeito ainda mais significativo a longo prazo e reduz os níveis de estresse do grupo mais rapidamente. Além disso, a estimulação tátil

favorece a sobrevivência, o crescimento, a eficiência alimentar e o fator de condição dos animais. Desse modo, a estimulação tátil pode ser usada como uma ferramenta para aumentar o bem-estar dos peixes, ao mesmo tempo que melhora o desempenho produtivo.

Apesar dos animais do controle atravessarem mais pelo centro do aquário (aparato), é importante ressaltar que os animais do tratamento com estimulação tátil também atravessam espontaneamente. Podemos levantar algumas prováveis explicações do motivo desse menor número de atravessamentos:

1) O aparato com as cerdas de silicone pode dificultar a passagem dos animais, pois as cerdas podem causar alguma resistência para que o atravessamento ocorra. Sendo assim, os animais teriam maior facilidade em atravessar pelo aparato sem cerdas (controle). Porém, Bolognesi, Gauy e Gonçalves-de-Freitas (2019) observaram que indivíduos isolados de tilápia-do-nilo tiveram número semelhante de atravessamentos entre tratamento com estimulação tátil e controle. Esse fato poderia descartar essa hipótese, porém temos que levar em consideração o efeito do isolamento social nesses animais, o qual pode alterar a atividade locomotora (GÓMEZ-LAPLAZA; MORGAN, 2003) e nível de estresse (EARLEY et al., 2006; GALHARDO; OLIVEIRA, 2014) em peixes. Esse efeito do isolamento social pode ser demonstrado pelo baixo número de atravessamentos observado pelas autoras (5 vezes menor do que observado neste estudo). Desse modo, os animais isolados podem se comportar de forma diferente dos animais agrupados, o que pode ter interferido na movimentação dos animais pelo aquário, e consequentemente no número de atravessamentos.

2) O aparato com cerdas de silicone pode ter funcionado como uma barreira visual para os animais, o que faz com que eles atravessem menos para o outro lado por não enxergarem o que vão encontrar lá. Isso pode estar relacionado a uma reação de medo ou a uma menor predisposição dos animais em explorarem a parte do aquário que eles não veem, reduzindo a movimentação. Os peixes, assim como outros animais, sentem neofobia (aversão a situações novas) (ASHLEY; SNEDDON, 2008; ELVIDGE; CHUARD; BROWN, 2016; MEUTHEN et al., 2016), o que pode

diminuir a exploração (MILLER et al., 2015). Porém, existem estudos mostrando que esse efeito da neofobia pode ser diminuído quando os animais estão na presença de outros indivíduos da mesma espécie (GALHARDO; VITORINO; OLIVEIRA, 2012; WARD, 2012), o que é o caso deste estudo. Além disso, a longo prazo (21 dias), os animais se habituariam deixando de ser um ambiente novo para eles, de modo que o número de atravessamentos iria aumentar ao longo do tempo (o que não aconteceu). Portanto podemos descartar essa hipótese.

3) O aparato com cerdas de silicone poderia estar funcionando como barreira visual entre os animais, ou seja, diminuindo a visibilidade dos peixes em ver os outros indivíduos no território. Sabemos que visão tem grande importância para a comunicação social em peixes (CASTRO et al., 2009; KORZAN et al., 2008). Desse modo, a barreira visual impediria os animais de enxergarem seus coespecíficos, diminuindo o estímulo para interagir, a movimentação dos animais e, consequentemente, o número de atravessamentos. Porém, se os animais não se vissem, provavelmente não utilizariam comunicação visual para sinalizar o *rank* social (ameaças), a qual aumentou ao longo do tempo neste estudo. Além do mais, mesmo se não houvesse comunicação visual entre os animais, não existia nenhuma barreira que impedisse a comunicação química entre eles. Sabe-se que a comunicação química é muito importante para os peixes em vários contextos (KELLER-COSTA; CANÁRIO; HUBBARD, 2015), como o reconhecimento de coespecíficos (DA SILVA et al., 2021; SARAIVA et al., 2017) e para comunicação do *rank* social, diminuindo as brigas em ciclídeos (GAUY; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018), incluindo a tilápia-do-nilo (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008). Assim, a falta de visão não deixaria os animais sem pistas da existência de outros indivíduos no território. Portanto, não é provável que o aparato tenha reduzido à percepção ou comunicação dos animais.

4) Os animais do controle brigam mais, com isso é esperado que esses animais se locomovam mais pelo aquário, pois as lutas são acompanhadas por fugas e perseguições e como consequência, atravessem mais pelo aparato. Esse fato é confirmado pela correlação positiva do número de atravessamentos e número de ataques do grupo e do peixe alfa no último dia de observação neste tratamento.

Porém, essa correlação não foi observada no tratamento com estimulação tátil, mostrando que os animais atravessam pelo centro do aquário, mas não necessariamente para brigar, diferentemente dos animais do grupo controle. Portanto, a resistência causada pelas cerdas de silicone associada ao maior número de brigas dos animais do controle seriam a explicação mais provável para a diferença do número de atravessamentos pelo aparato entre os tratamentos.

Apesar do menor número de atravessamentos dos peixes pelo aparato de estimulação tátil, é importante destacar que os animais atravessam espontaneamente e com a mesma frequência do começo ao final do período de observação. Isso mostra que não são as brigas ou fugas que estão estimulando esse atravessamento, pois as brigas diminuem ao longo do tempo o que não acontece com o número de atravessamentos. Além disso, todos os *ranks* atravessaram pelo aparato em uma mesma frequência, mostrando que todos os animais estão ocupando o aquário todo e que não formaram grupos ou se “esconderam” em um dos lados para evitar as brigas. Isso indica, também, que o dominante não utilizou o aparato como referência para delimitar território, como acontece em alguns contextos com peixes (MIKHEEV; AFONINA; PAVLOV, 2010; NÄSLUND; JOHNSON, 2014). Nesse caso, o território fica diminuído e pode reduzir a probabilidade de intrusos invadirem o território do dominante, reduzindo as brigas (e.g. BARLEY; COLEMAN, 2010; TORREZANI et al., 2013). Como os animais atravessaram com frequência semelhante pelo centro do aquário, concluímos que não houve preferência pela utilização de um dos lados como território do dominante.

O número de ataques e ameaças foi semelhante no primeiro dia nos dois tratamentos, indicando que ambos partiram de uma mesma condição (*baseline*), garantindo que os resultados obtidos foram decorrentes da estimulação tátil e não de condições prévias. Os animais com estimulação tátil tiveram menor número de confrontos totais, assim como de ataques durante todo o período, além de maior número de ameaças. Podemos observar que a diminuição das brigas no tratamento com estimulação tátil aconteceu a partir do dia 10. Há a possibilidade do aparato com as cerdas de silicone ter atuado como uma barreira visual entre os peixes e com isso ter diminuído as brigas entre os animais, pois como já discutido a cima, a visão é

importante para a comunicação social da tilápia-do-nylo (CASTRO et al., 2009). Porém, caso esse fosse o motivo, o número de ataques seria menor no tratamento com estimulação tátil em todas as observações, o que não foi observado. Além disso, o fato do número de atravessamentos de todos os *ranks* ser semelhante mostra que todos os animais ocuparam o aquário todo, corroborando a ideia de que o aparato não funcionou como uma barreira visual.

Já foi demonstrado que a estimulação tátil aumenta os níveis de serotonina em humanos (FIELD et al., 2005) e que o aumento da serotonina diminui as interações agressivas em peixes (CLOTFELTER et al., 2007; DAHLBOM et al., 2012; WINBERG; THORNQVIST, 2016). O início da formação da hierarquia de dominância é estressante para os indivíduos, tanto os dominantes quanto os submissos apresentam aumento rápido do cortisol e da atividade serotoninérgica no cérebro (ØVERLI; HARRIS; WINBERG, 1999; WINBERG; NILSSON, 1993), mas apenas os submissos mantêm os níveis elevados (DAHLBOM et al., 2012; ØVERLI; HARRIS; WINBERG, 1999). De acordo com Øverli, Harris e Winberg, 1999, a serotonina influencia a liberação do cortisol em situações normais e de estresse agudo, o que não acontece em caso de estresse crônico. Com o passar do tempo, o submisso diminui a agressividade, mas o dominante não, desse modo, apenas a ativação de longo prazo da atividade serotoninérgica parece ter efeito no comportamento agressivo dos animais (WINBERG; THORNQVIST, 2016). Em concordância com isso, Winberg, Øverli e Lepage (2001) encontraram que indivíduos de truta arco-íris alimentados com dieta enriquecida por triptofano (precursor da serotonina), somente apresentaram diminuição da agressividade após 7 dias de alimentação. Com isso, podemos inferir que os peixes dominantes em contato com a estimulação tátil de longo prazo apresentaram um aumento do nível de serotonina, o que levou a diminuição da agressividade. No entanto, mais estudos são necessários para testar esse mecanismo.

Diversos estudos demonstraram que a estimulação tátil é eficiente na redução do estresse em diversos vertebrados (FIELD et al., 2005; FREITAS et al., 2015; PROBST et al., 2012; REHN et al., 2014), incluindo peixes (SOARES et al., 2011). Desse modo, a redução do estresse poderia estar associada à diminuição da

agressividade nos animais (e.g. BARRETO; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015; CORRÊA et al., 2003). Como não temos o nível de cortisol no início do experimento, não podemos afirmar que houve uma diminuição, porém, nossos dados mostram uma possível diminuição do estresse do grupo com estimulação tátil já no dia 7, o que não aconteceu no controle. Essa redução poderia estar associada à diminuição da agressividade observada nesse tratamento a partir do dia 10. Já no dia 21, ambos os tratamentos apresentaram o mesmo nível de cortisol, com uma diminuição ainda maior da agressividade no tratamento com estimulação tátil e sem diminuição no controle. Em concordância com esses dados, o nível de cortisol foi correlacionado positivamente com o número de ataques emitidos pelo peixe alfa no controle e negativamente com as ameaças do grupo em ambos os tratamentos. Esses dados mostram que a estimulação tátil parece estar associada com a diminuição do estresse e consequentemente da agressividade dos animais, com aumento das ameaças, as quais oferecem menor prejuízo e evitam lutas intensas (ROS; BECKER; OLIVEIRA, 2006).

O maior nível de cortisol do grupo no controle, observado no dia 7, se dá pelo maior nível de cortisol de um dos peixes mais submissos do grupo (gama). Isso está de acordo com alguns estudos onde os submissos mantêm os níveis de cortisol mais elevado que o dominante após a formação da hierarquia de dominância (DAHLBOM et al., 2012; ØVERLI; HARRIS; WINBERG, 1999). A diminuição do nível de cortisol observada ao longo do tempo (dia 21) pode estar relacionada à adaptação dos animais ao estresse social, o qual é causado pelo estímulo social do grupo (BARCELLOS et al., 1999). Essa diminuição não foi observada no tratamento com estimulação tátil, pois possivelmente ela ocorreu antes do sétimo dia de agrupamento. Desse modo, podemos sugerir que a estimulação tátil está associada à diminuição do estresse social na tilápia-do-nylo, a qual acontece mais rapidamente.

Muitos estudos mostram o papel dos andrógenos como reguladores do comportamento agressivo em peixes (HIRSCHENHAUSER et al., 2004; MARUSKA; FERNALD, 2010, 2011; OLIVEIRA, 2009; RAMALLO et al., 2015; TAVES et al., 2009). Porém, na maioria deles essa associação ocorre em encontros pontuais com um intruso no território (resposta hormonal rápida) ou em grupos, mas em contexto

reprodutivo. Aqui, mostramos a dinâmica dos andrógenos com o comportamento agressivo em grupos de machos de tilápia-do-nilo ao longo do tempo. Observamos que no controle, o nível de andrógenos, tanto T quanto 11-KT, se mantiveram iguais ao longo do tempo em todos os *ranks*, mesmo com alto número de brigas. De acordo com nossos dados, Saraiva et al. (2017) demonstraram que machos de tilápia mossâmbica (*Oreochromis mossambicus*) lutam intensamente contra o espelho, porém possuem níveis baixos de 11-KT, mostrando uma dissociação entre o andrógeno e agressividade. Diferente do que encontramos, muitos trabalhos mostram uma maior concentração dos andrógenos nos animais dominantes (OLIVEIRA et al., 2002; PARIKH; CLEMENT; FERNALD, 2006; RAMALLO et al., 2015; TAVES et al., 2009), porém esse aumento é causado no momento do encontro, quando o animal está sendo desafiado. O que não é o caso do nosso estudo, uma vez que os andrógenos foram medidos depois de 7 dias de agrupamento. Alonso et al. (2012) sugerem para o ciclídeo *Cichlasoma dimerus*, agrupados por duas semanas, que os níveis de andrógenos entre animais de diferentes *ranks* permanece igual até que uma oportunidade de ascensão social apareça, havendo então um aumento dos andrógenos. Isso poderia explicar o nível semelhante de andrógenos que encontramos, uma vez que durante os 21 dias não houve mudança de *rank* entre os animais nos grupos. Já no tratamento com estimulação tátil, houve um aumento do nível de T no dia 21, evidenciado pelos peixes mais dominantes (alfa e beta). Ramallo et al. (2015) encontraram que machos de *C. dimerus* de diferentes *ranks* sociais, agrupados por pelo menos duas semanas, apresentaram níveis de andrógenos diferentes e essa variação foi positivamente correlacionada com o comportamento agressivo dos indivíduos. Porém, nesse estudo, o aumento do nível de T não parece estar diretamente associado com a agressividade dos animais, uma vez que ela diminui nesse tratamento. Apesar de não observamos diferença no nível de 11-KT ao longo do tempo e entre os *ranks* sociais, encontramos correlações positivas desse andrógeno com ataques e ameaças do peixe alfa e da 11-KT/T com ameaças do grupo no tratamento com estimulação tátil, sugerindo que a metabolização da T em 11-KT está associada com o aumento das ameaças e diminuição dos ataques nesse tratamento. Esses

dados corroboram a ideia de que a 11-KT é considerada o principal andrógeno envolvido na regulação do comportamento agressivo em peixes machos (BORG, 1994; HIRSCHENHAUSER et al., 2004; RAMALLO et al., 2015). Desse modo, podemos sugerir que a metabolização da T e a 11-KT estão envolvidas na diminuição da agressividade ao longo do tempo no tratamento com estimulação tátil. Um mecanismo que pode explicar essa diminuição da agressividade é a sinalização química da posição social, a qual reduz as brigas dentro do grupo após a formação da hierarquia de dominância (GAUY; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018; GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008; KELLER-COSTA; CANÁRIO; HUBBARD, 2015). A composição dos sinais químicos liberados na água durante as interações agressivas ainda não é completamente conhecida, mas hormônios esteroides e sexuais, e seus derivados são apontados como mediadores químicos da agressividade em peixes (DA SILVA et al., 2021; STACEY; SORENSEN, 2009).

A diminuição da agressividade foi mais acentuada nos dias 19 e 21. Poucos estudos comparam os efeitos da estimulação tátil a longo prazo em vertebrados. Porém, Rapaport, Schettlee e Bresee (2012) sugerem que existe um efeito cumulativo da massagem em humanos, dependente da frequência que esta é realizada. Além disso, massagem a longo prazo (6 meses) diminuiu comportamentos agressivos em crianças (VON KNORRING et al., 2008). Nossos dados mostram um aumento do número de ameaças no tratamento com estimulação tátil ao longo do tempo, comportamento esperado em grupos que já estabeleceram a hierarquia de dominância (JOHNSSON; WINBERG; SLOMAN, 2006). Com o passar do tempo os ataques são substituídos pelas ameaças (GAUY; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018; HALLER; WITTENBERGER, 1988), assim os animais sinalizam seu *rank* social, sem a necessidade de brigas intensas que podem causar gasto de energia e injúrias (ROS; BECKER; OLIVEIRA, 2006). Portanto, podemos sugerir que ocorreu um efeito cumulativo da estimulação tátil ao longo dos 21 dias, mostrando que existe uma resposta positiva prolongada na tilápia-do-nilo.

As interações agressivas são parte do comportamento natural dos animais e são observadas na competição dos indivíduos por recursos, como alimento e

território (ANG; MANICA, 2010; DAMSGÅRD; HUNTINGFORD, 2012; JOHNSON; WINBERG; SLOMAN, 2006). O indivíduo dominante é mais agressivo e tem o acesso prioritário aos recursos do ambiente (DAMSGÅRD; HUNTINGFORD, 2012; JOHNSON; WINBERG; SLOMAN, 2006), mantendo a hierarquia de dominância, o que reduz os gastos de brigas prolongadas. Já foi demonstrado para a tilápia-do-nylo, que o peixe dominante é o mais agressivo do grupo (CARVALHO et al., 2013; GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2008) e nossos dados estão de acordo com esses estudos. Isso acontece, pois além de manter a hierarquia de dominância, a agressão entre os submissos é menor na presença de um dominante (ADAMS et al., 2000). Desse modo, as interações agressivas do dominante representam o grupo e a redução da agressividade observada no tratamento com estimulação tátil se deve ao menor número de ataques emitidos pelo peixe dominante.

As lutas, a manutenção da hierarquia de dominância e o estresse social tem um custo energético muito elevado para a tilápia-do-nylo (ALVARENGA; VOLPATO, 1995). Esse elevado gasto de energia pode prejudicar outras atividades essenciais dos animais, como o crescimento (FERNANDES; VOLPATO, 1993). A taxa de crescimento do salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*), por exemplo, é negativamente correlacionada ao nível de agressão do animal (VØLLESTAD; QUINN, 2003). Isso pode acontecer, pois o estresse social causado pelas lutas aumenta os níveis de cortisol, o qual pode causar alguns efeitos no crescimento do animal. Por exemplo, o cortisol é um hormônio catabólico, com isso atua na quebra de substrato de reserva para a liberação de energia, porém um aumento crônico desse hormônio pode levar a degradação de proteínas (WENDELAAR BONGA, 1997). Além disso, o cortisol pode influenciar na ação do hormônio de crescimento (GH) (SADOUL; VIJAYAN, 2016). Ambos os mecanismos podem inibir o crescimento dos animais, o que poderia explicar o maior crescimento observado no tratamento com estimulação tátil, onde as lutas, o estresse social e conseqüentemente, o gasto de energia foram menores. Porém, não encontramos diferença no nível de cortisol entre os animais, nem correlação desse hormônio com o crescimento. Desse modo, sugerimos que o cortisol não influencia o crescimento dos animais por esses mecanismos citados. Esse aumento do crescimento foi evidenciado somente nos

peixes mais dominantes do grupo (alfa e beta), enquanto os peixes mais submissos (gama e delta) não apresentaram diferença entre os tratamentos. Isso pode ter acontecido, pois os animais dominantes emitem mais interações agressivas dentro do grupo e com isso, sofreram o maior efeito da estimulação táctil. Além disso, os peixes submissos têm um maior custo metabólico dentro da hierarquia de dominância, apresentando menor crescimento que o dominante (FERNANDES; VOLPATO, 1993). De acordo com Volpato e Fernandes (1994), o crescimento heterogêneo entre os *ranks* é considerado uma estratégia adaptativa para a sobrevivência em espaços restritos. De fato, grupos de tilápia-do-nylo de tamanho semelhante lutam mais agressivamente e por mais tempo (BARRETO; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015; BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011).

A diminuição da metabolização da T em 11-KT e consequente aumento do nível de T observados no tratamento com estimulação táctil parecem estar associados com o crescimento dos animais. Existem estudos mostrando o papel anabólico dos andrógenos em vertebrados (ESTRADA et al., 2003; EVANS, 2004; MEINHARDT; HO, 2006). Em peixes, o tratamento com andrógenos aumenta o crescimento (SPARKS et al., 2003; YUE et al., 2017) e estimula o eixo GH-IGF, aumentando a expressão do fator de crescimento IGF-1 (LARSEN et al., 2004; NORBECK; SHERIDAN, 2011; RILEY et al., 2002). Aumenta, também, as vilosidades intestinais de fêmeas da tilápia-do-nylo (PHUMYU et al., 2012), aumentando a absorção de alimento. O aumento do nível de T observado nesse estudo foi nos peixes mais dominantes (alfa e beta) do tratamento com estimulação táctil, os quais apresentaram maior crescimento. Além disso, o ganho de peso e de comprimento do peixe alfa foram correlacionados negativamente com o nível de T e positivamente com a metabolização da T. Desse modo, a longo prazo, o aumento dos andrógenos parece estar envolvido com o crescimento dos animais no tratamento com estimulação táctil.

Outra explicação para o maior crescimento dos animais dominantes seria a ingestão desigual de alimento geralmente encontrada entre animais de diferentes *ranks*, sendo que os dominantes possuem acesso prioritário à alimentação

(DAMSGÅRD; HUNTINGFORD, 2012). Neste estudo não quantificamos a quantidade de alimento que cada animal ingeriu, mas existem estudos mostrando o maior consumo pelo peixe dominante no salmão do Atlântico (*Salmo salar* - HUNTINGFORD; METCALFE; THORPE, 1993) e na truta do Ártico (*Salvelinus alpinus* - ØVERLI et al., 1998). Porém, Carrieri e Volpato (1991) demonstraram para a tilápia-do-nilo que não há diferença na quantidade de alimento ingerido entre os *ranks* sociais em grupos de quatro indivíduos de alevinos dessa espécie. Assim, podemos sugerir que a alimentação não tenha sido o fator que promoveu diferença no crescimento entre dominantes e submissos.

Apesar de encontrarmos diferença no ganho de peso e na taxa crescimento específico (SRG), não observamos diferença no ganho de comprimento entre os tratamentos. Esse resultado é esperado, já que o comprimento aumenta linearmente, enquanto o peso, exponencialmente (CRANE; OGLE; SHOUP, 2019). Assim, o período de 21 dias não foi suficiente para observarmos incremento significativo no comprimento dos animais. Por outro lado, a eficiência alimentar foi maior no grupo com estimulação tátil do que no controle, indicando melhor aproveitamento de alimento consumido por g de peixe produzido (DE VERDAL et al., 2017). É importante ressaltar que não houve diferença na quantidade de ração oferecida entre os tratamentos, o que indica que quantidade semelhante de alimento foi convertida no dobro de peso quando a estimulação tátil estava presente.

Outro parâmetro que foi positivamente influenciado pela estimulação tátil é o fator de condição, o qual se manteve igual do começo ao final do período experimental no tratamento com estimulação tátil e mostrou uma diminuição no controle. O fator de condição está relacionado com diversas características dos animais, como crescimento, qualidade nutricional e desenvolvimento das gônadas (FROESE, 2006). Por isso, esse parâmetro normalmente é associado a boas condições de saúde, de produção e de bem-estar dos peixes (ANANI; NUNOO, 2016; IGHWELA; AHMED; ABOL-MUNAFI, 2011; LE CREN, 1951). Com isso, podemos sugerir que os peixes do tratamento com estimulação tátil tiveram um melhor desempenho já que, normalmente, maior fator de condição está relacionado com maiores taxas de crescimento e melhor eficiência alimentar (e.g. BOWYER et

al., 2020; EL-SAIDY; GABER, 2004; MOZANZADEH et al., 2015), reduzindo assim, os custos da produção de peixes (DE VERDAL et al., 2017; GARCIA et al., 2016). Além disso, a mortalidade dos animais foi menor no tratamento com estimulação tátil, o que confirma o melhor desempenho dos animais nesse tratamento, uma vez que a taxa de sobrevivência é considerada um importante indicador de bem-estar nos peixes (Ellis et al., 2012). Portanto, podemos concluir que a estimulação tátil de longo prazo tem efeito positivo para a tilápia-do-nilo, diminuindo a agressividade e o estresse dentro do grupo social e aumentando o crescimento dos animais, sendo observado maior efeito nos animais dominantes. A estimulação tátil de longo prazo também favoreceu os parâmetros de desempenho produtivo e a sobrevivência dos animais, os quais estão ligados com a saúde e bem-estar dos peixes. Desse modo, a estimulação tátil de longo prazo pode ser uma alternativa eficiente para melhorar o produto final da produção ao mesmo tempo em que promove melhor bem-estar aos peixes.

5. Referências

- ADAMS, C.; HUNTINGFORD, F.; TURNBULL, J.; ARNOTT, S.; BELL, A. Size heterogeneity can reduce aggression and promote growth in Atlantic salmon parr. **Aquaculture International**, v. 8, p. 543–549, 2000.
- ALONSO, F.; HONJI, R. M.; MOREIRA, R. G.; PANDOLFI, M. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: Anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. **Physiology & Behavior**, v. 106, p. 612-618, 2012.
- ALVARENGA, C. M. D.; VOLPATO, G. L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 75–80, 1995.
- ANANI, F. A.; NUNOO, F. K. E. Length-weight relationship and condition factor of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed farm-made and commercial tilapia diet. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 5, p. 647–650, 2016.

- ANG, T. Z.; MANICA, A. Unavoidable limits on group size in a body size-based linear hierarchy. **Behavioral Ecology**, v. 21, p. 819-825, 2010.
- ASHLEY, P. J.; SNEDDON, L. U. Pain and fear in fish. In: BRANSON, E. J. (Ed.), **Fish Welfare**. Blackwell Publishing Ltd, UK, p. 49– 77, 2008
- BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v. 30, 437-444, 1999.
- BARLEY, A. J.; COLEMAN, R. M. Habitat structure directly affects aggression in convict cichlids *Archocentrus nigrofasciatus*. **Current Zoology**, v. 56, n. 1, p. 52-56, 2010.
- BARRETO, T. N.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Homogeneously sized groups increase aggressive interaction and affect social stress in Thai strain Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 48, n. 5, p. 309–318, 2015.
- BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. S.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Tactile stimulation reduces aggressiveness but does not lower stress in a territorial fish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- BORG, B. Androgens in teleost fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 109, p. 219-245, 1994.
- BOSCOLO, C. N. P.; MORAIS, R. N.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 1–2, p. 154–159, 2011.
- BOWYER, P. H.; EL-HAROON, E. R.; SALIM, H. S.; DAVIES, S. J. Benefits of a commercial solid-state fermentation (SSF) product on growth performance, feed efficiency and gut morphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different UK lupin meal cultivars. **Aquaculture**, v. 523, 735192, 2020.
- BRANDÃO, M. L.; BRAITHWAITE, V. A.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Isolation impairs cognition in a social fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 204–210, 2015.

BROWN, C. Fish intelligence, sentience and ethics. **Animal Cognition**, v. 18, p. 1-17, 2015.

CARRIERI, M. P.; VOLPATO, G. L. Does snatching frequency really indicate food ingestion in the Nile tilapia? **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 3, p. 489–492, 1991.

CARVALHO, T. B.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 807-812, 2008.

CARVALHO, T. B.; MENDONÇA, F. Z.; COSTA-FERREIRA, R. S.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. The effect of increased light intensity on the aggressive behaviour of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei:Cichlidae). **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 125-129, 2013.

CASTRO, A. L. S.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; VOLPATO, G. L.; OLIVEIRA, C. Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 368-374, 2009.

CHARNETSKI, C. J.; RIGGERS, S.; BRENNAN, F. X. Effect of petting a dog on immune system function. **Psychological Reports**, v. 95, p. 1087–1091, 2004.

CLOTFELTER, E. D.; O'HARE, E. P.; MCNITT, M. M.; CARPENTER, R. E.; SUMMERS, C. H. Serotonin decreases aggression via 5-HT_{1A} receptors in the fighting fish *Betta splendens*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, p. 222–231, 2007.

CORRÊA, S. A.; FERNANDES, M. O.; ISEKI, K. K.; NEGRÃO, J. A. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1725–1731, 2003.

COULON, M.; NOWAK, R.; PEYRAT, J.; CHANDÈZE, H.; BOISSY, A.; BOIVIN, X. Do lambs perceive regular human stroking as pleasant? Behavior and heart rate variability analyses. **Plos One**, v. 10, n. 2, e0118617, 2015.

CRANE, D. P.; OGLE, D. H.; SHOUP, D. E. Use and misuse of a common growth metric: guidance for appropriately calculating and reporting specific growth rate. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, p. 1–6, 2019.

DA SILVA, M. C.; CANÁRIO, A. V. M. M.; HUBBARD, P. C.; GONÇALVES, D. M. F. Physiology, endocrinology and chemical communication in aggressive behaviour of fishes. **Journal of Fish Biology**, p. 1-17, 2021.

DAHLBOM, S. J.; BACKSTRÖM, T.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; WINBERG, S. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, p. 333-338, 2012.

DAMSGÅRD, B.; HUNTINGFORD, F. Fighting and aggression. In: HUNTINGFORD, F.; JOBLING, M.; KADRI, S. (Eds.), **Aquaculture and Behavior**. Blackwell Publishing Ltd, UK, p. 248–285, 2012.

DE VERDAL, H.; KOMEN, H.; QUILLET, E.; CHATAIN, B.; ALLAL, F.; BENZIE, J. A. H.; VANDEPUTTE, M. Improving feed efficiency in fish using selective breeding: A review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 833-851, 2017.

DEAKIN, A. G.; SPENCER, J. W.; COSSINS, A. R.; YOUNG, I. S.; SNEDDON, L. U. Welfare challenges influence the complexity of movement: Fractal analysis of behaviour in Zebrafish. **Fishes**, v. 4, n. 8, 2019.

EARLEY, R. L.; EDWARDS, J. T.; ASEEM, O.; FELTON, K.; BLUMER, L. S.; KAROM, M.; GROBER, M. S. Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*). **Physiology & Behavior**, v. 88, p. 353–363, 2006.

ELLIS, T.; BERRILL, I.; LINES, J.; TURNBULL, J. F.; KNOWLES, T. G. Mortality and fish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 189–199, 2012.

ELLIS, T.; JAMES, J. D.; SUNDH, H.; FRIDELL, F.; SUNDELL, K.; SCOTT, A. P. Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 272, n. 1–4, p. 698–706, 2007.

EL-SAIDY, D. M. S. D.; GABER, M. M. Use of cottonseed meal supplemented with iron for detoxification of gossypol as a total replacement of fish meal in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 859-865, 2004.

ELVIDGE, C. K.; CHUARD, P. J. C.; BROWN, G. E. Local predation risk shapes spatial and foraging neophobia patterns in Trinidadian guppies. **Current Zoology**, v. 62, n. 5, p. 457–462, 2016.

ESTRADA, M.; ESPINOSA, A.; MÜLLER, M.; JAIMOVICH, E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein- coupled receptor in skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 144, p. 3586-3597, 2003.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 2, p. 534-542, 2004.

FALSARELLA, L. N.; BRANDÃO, M. L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Fish adjust aggressive behavior to audience size with limited information on bystanders' fighting ability. **Behavioural Processes**, v. 142, p. 116-118, 2017.

FERNANDES, M. O.; VOLPATO, G. L. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 2, p. 319–323, 1993.

FIELD, T. Massage therapy for infants and children. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, v. 16, n. 2, p. 105-111, 1995.

FIELD, T.; HERNANDEZ-REIF, M.; DIEGO, M.; SCHANBERG, S.; KUHN, C. Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. **International Journal of Neuroscience**, v. 115, n. 10, p. 1397–1413, 2005.

FREITAS, D.; ANTONIAZZI, C. T. D.; SEGAT, H. J.; METZ, V. G.; VEY, L. T.; BARCELOS, R. C. S.; DUARTE, T.; DUARTE, M. M. M. F.; BURGER, M. E. Neonatal tactile stimulation decreases depression-like and anxiety-like behaviors and potentiates sertraline action in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 47, p. 192-197, 2015.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight–length relationships: History, meta-analysis and recommendations. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 4, p. 241–253, 2006.

FULTON, T. W. The rate of growth of fishes. **Twenty-second Annual Report of the Fishery Board of Scotland**, v.3, p. 141–241, 1904.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. F. The effects of social isolation on steroid hormone levels are modulated by previous social status and context in a cichlid fish. **Hormones and Behavior**, v. 65, n. 1, p. 1–5, 2014.

GALHARDO, L.; VITORINO, A.; OLIVEIRA, R. F. Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. **Biology Letters**, v. 8, n. 6, p. 936-938, 2012.

GARCIA, F.; ROMERA, D. M.; SOUSA, N. S.; PAIVA-RAMOS, I.; ONAKA, E. M. The potential of periphyton-based cage culture of Nile tilapia in a Brazilian reservoir. **Aquaculture**, v. 464, p. 229-235, 2016.

GAUY, A. C. S.; BOLOGNESI, M. C.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Unusual effect of chemical communication on social aggression in juvenile cichlid fish *Cichlasoma paranaense* (Cichliformes: Cichlidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 17, n. 2, e180159, 2019.

GAUY, A. C. S.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Less water renewal reduces effects on social aggression of the cichlid *Pterophyllum scalare*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 198, p. 121–126, 2018.

GÓMEZ-LAPLAZA, L. M.; MORGAN, E. The influence of social rank in the angelfish, *Pterophyllum scalare*, on locomotor and feeding activities in a novel environment. **Laboratory Animals**, v. 37, p. 108–120, 2003.

GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. S.; BRANDÃO, M. L.; GIAQUINTO, P. C.; FERNANDES-CASTILHO, M. Social behavior and welfare in Nile tilapia. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2019.

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

GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; TERESA, F. B.; GOMES, F. S.; GIAQUINTO, P. C. Effect of water renewal on dominance hierarchy of the Nile tilapia. **Applied Animal Behavior Science**, v. 112, p. 187-195, 2008.

HA, R. R.; HA, J. C. **Integrative Statistics for the Social and Behavioral Sciences**. SAGE Publications, Inc., California. 1 ed., 2012, p. 429.

HALLER, J.; WITTENBERGER, C. Biochemical energetics of hierarchy formation in *Betta splendens*. **Physiology & Behavior**, v. 43, p. 447–450, 1988.

HASTEIN, T.; SCARFE A. D.; LUND, V. L. Science-based assessment of welfare: Aquatic animals. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 24, n. 2, p. 529-547, 2005.

HIRSCHENHAUSER, K.; TABORSKY, M.; OLIVEIRA, T.; CANÁRIO, A. V. M.; OLIVEIRA, R. F. A test of the 'challenge hypothesis' in cichlid fish: Simulated partner and territory intruder experiments. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 741–750, 2004.

HUNTINGFORD, F. A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V. A.; KADRI, S.; POTTINGER, T. G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J. F. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, p. 332–372, 2006.

HUNTINGFORD, F. A.; METCALFE, N. B.; THORPE, J. E. Social status and feeding in Atlantic salmon *Salmo salar* parr: The effect of visual exposure to a dominant. **Ethology**, v. 94, p. 201-206, 1993.

IGHWELA, K. A.; AHMED, A. B.; ABOL-MUNAFI, A. B. Condition factor as an indicator of growth and feeding intensity of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) feed on different levels of maltose. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 11, n. 4, p. 559-563, 2011.

IM, H.; KIM, E. Effect of Yakson and Gentle Human Touch versus usual care on urine stress hormones and behaviors in preterm infants: A quasi-experimental study. **International Journal of Nursing Studies**, v. 46, p. 450-458, 2009.

JOHNSSON, J. I.; WINBERG, S.; SLOMAN, K. A. Social interactions. In: SLOMAN, K. A.; WILSON, R. W.; BALSINHE, S. (Eds.), **Behaviour and Physiology of Fish**. Elsevier Academic Press, UK, p. 151-196, 2006.

KELLER-COSTA, T.; CANÁRIO, A. V. M.; HUBBARD, P. C. Chemical communication in cichlids: A mini-review. **General and Comparative Endocrinology**, v. 221, p. 64–74, 2015.

KORZAN, W. J.; ROBISON, R. R.; ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Color change as a potential behavioral strategy. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 3, p. 463–470, 2008.

LARSEN, D. A.; SHIMIZU, M.; COOPER, K. A.; SWANSON, P.; DICKHOFF, W. W. Androgen effects on plasma GH, IGF-I, and 41-kDa IGFBP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 29–37, 2004.

LE CREN, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, n. 2, p. 201-219, 1951.

LEHNER, P. N. **Handbook of Ethological Methods**. Cambridge University Press, Cambridge. 2 ed., 1996, p. 672.

MAIA, C. M.; VOLPATO, G. L. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. **Zoology**, v. 116, n. 1, p. 64–66, 2013.

MARTINS, C. I. M.; GALHARDO, L.; NOBLE, C.; DAMSGÅRD, B.; SPEDICATO, M. T.; ZUPA, W.; BEAUCHAUD, M.; KULCZYKOWSKA, E.; MASSABUAU, J. C.; CARTER, T.; PLANELLAS, S. R.; KRISTIANSEN, T. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 17–41, 2012.

MARUSKA, K. P.; FERNALD, R. D. Behavioral and physiological plasticity: Rapid changes during social ascent in an African Cichlid fish. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 2, 230-240, 2010.

MARUSKA, K. P.; FERNALD, R. D. Social regulation of gene expression in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. **Physiology**, v. 26, n. 6, p. 412-423, 2011.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n.2, p. 205–216, 1995.

MEINHARDT, U. J.; HO, K. K. Y. Modulation of growth hormone action by sex steroids. **Clinical Endocrinology**, v. 65, p. 413-422, 2006.

MEUTHEN, D.; BALDAUF, S. A.; BAKKER, T. C.; THUNKEN, T. Predator-induced neophobia in juvenile cichlids. **Oecologia**, v. 181, p. 947– 958, 2016.

MIKHEEV, V. N.; AFONINA, M. O.; PAVLOV, D. S. Habitat heterogeneity and fish behavior: Units of heterogeneity as a resource and as a source of information. **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 5, p. 386–395, 2010.

MILLER, R.; BUGNYAR, T.; POLZL, K.; SCHWAB, C. Differences in exploration behaviour in common ravens and carrion crows during development and across social context. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 69, p. 1209-1220, 2015.

MOZANZADEH, M. T.; MARAMMAZI, J. G.; YAGHOUBI, M.; YAVARI, V.; AGH, N.; GISBERT, E. Somatic and physiological responses to cyclic fasting and re-feeding periods in sobaity sea bream (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 181–191, 2015.

NÄSLUND, J.; JOHNSON, J. I. Environmental enrichment for fish in captive environments: Effects of physical structures and substrates. **Fish and Fisheries**, v. 17, p. 1–30, 2014.

NORBECK, L. A.; SHERIDAN, M. A. An in vitro model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: Effects of 17 β -estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 173, p. 270–280, 2011.

OLIVEIRA, R. F. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. **Integrative and Comparative Biology**, v. 49, n. 4, p. 423–440, 2009.

OLIVEIRA, R. F.; GONÇALVES, D. Hormones and social behaviour of teleost fish. In: MAGNHAGEN, C.; BRAITHWAITE, V. A.; FORSGREN, E.; KAPOOR, B. G. (Eds.), **Fish Behaviour**. CRC Press, NW, p. 61-125, 2008.

OLIVEIRA, R. F.; HIRSCHENHAUSER, K.; CARNEIRO, L. A.; CANÁRIO, A. V. M. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 132, p. 203–215, 2002.

ØVERLI, Ø.; HARRIS, C. A.; WINBERG, S. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain

monoamines and cortisol in rainbow trout. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 54, p. 263-275, 1999.

ØVERLI, Ø.; WINBERG, S.; DAMSGÅRD, B.; JOBLING, M. Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): Role of brain serotonergic activity and social interactions. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 1366–1370, 1998.

PARIKH, V. N.; CLEMENT, T. S.; FERNALD, R. D. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. **Behavioural Brain Research**, v. 166, p. 291–295, 2006.

PHUMYU, N.; BOONANUNTANASARN, S.; JANGPRAI, A.; YOSHIZAKI, G.; NANAKORN, U. Pubertal effects of 17 α -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic–pituitary–liver–gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex-reversed Nile tilapia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 177, p. 278–292, 2012.

POTTINGER, T. G. The stress response in fish – Mechanisms, effects and measurement. In: BRANSON, E. J. (Ed.), **Fish Welfare**. Blackwell Publishing Ltd, UK, p. 32–48, 2008.

POTTINGER, T. G.; PRUNET, P.; PICKERING, A. D. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. **General and Comparative Endocrinology**, v. 88, n. 3, p. 454–460, 1992.

PROBST, J. K.; HILLMANN, E.; LEIBER, F.; KREUZER, M.; NEFF, A. S. Influence of gentle touching applied few weeks before slaughter on avoidance distance and slaughter stress in finishing cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 144, n. 1–2, p. 14–21, 2013.

PROBST, J. K.; NEFF, A. S.; LEIBER, F.; KREUZER, M.; HILLMANN, E. Gentle touching in early life reduces avoidance distance and slaughter stress in beef cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 139, n. 1-2, p. 42-49, 2012.

RAMALLO, M. R.; BIRBA, A.; HONJI, R. M.; MORANDINI, L.; MOREIRA, R. G.; SOMOZA, G. M.; PANDOLFI, M. A multidisciplinary study on social status and the relationship between inter-individual variation in hormone levels and agonistic

behavior in a Neotropical cichlid fish. **Hormones and Behavior**, v. 69, p. 139-151, 2015.

RAPAPORT, M. H.; SCHETTLER, P.; BRESEE, C. A preliminary study of the effects of repeated massage on hypothalamic–pituitary–adrenal and immune function in healthy individuals: A study of mechanisms of action and dosage. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18, n. 8, p. 789-797, 2012.

REHN, T.; HANDLIN, L.; UVNÄS-MOBERG, K.; KEELING, L. J. Dog's endocrine and behavioural responses at reunion are affected by how the human initiates contact. **Physiology & Behaviour**, v. 124, p. 45-53, 2014.

RILEY, L. G.; RICHMAN III, N. H.; HIRANO, T.; GRAU, E. G. Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17 α -methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, p. 285–292, 2002.

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

SADOUL, B.; VIJAYAN, M. M. Stress and growth. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.), **Biology of Stress in Fish**. Elsevier Academic Press, UK, p. 167-205, 2016.

SARAIVA, J. L.; ARECHAVALA-LOPEZ, P. Welfare of fish - no longer the elephant in the room. **Fishes**, v. 4, n. 3, p. 1–3, 2019.

SARAIVA, J. L.; KELLER-COSTA, T.; HUBBARD, P. C.; RATO, A.; CANÁRIO, A. V. M. M. Chemical diplomacy in male tilapia: Urinary signal increases sex hormone and decreases aggression. **Scientific Reports**, v. 7, 7636, 2017.

SCHMIED, C.; BOIVIN, X.; SCALA, S.; WAIBLINGER, S. Effect of previous stroking on reactions to a veterinary procedure: Behaviour and heart rate of dairy cows. **Interaction Studies**, v. 11, n. 3, p. 467-481, 2010.

SCHRECK, C. B. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Eds.), **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. CABI Publishing, UK, p. 147-158, 2000.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The concept of stress in fish. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.), **Biology of Stress in Fish**. Elsevier Academic Press, UK, p. 1-34, 2016.

SILVA, L. P.; SANT'ANNA, A. C.; SILVA, L. C. M.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Long-term effects of good handling practices during the pre-weaning period of crossbred dairy heifer calves. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 153-162, 2017.

SOARES, M. C.; OLIVEIRA, R. F.; ROS, A. F.H.; GRUTTER, A. S.; BSHARY, R. Tactile stimulation lowers stress in fish. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

SPARKS, R. T.; SHEPHERD, B. S.; RON, B.; RICHMAN III, N. H.; RILEY, L. G.; IWAMA, G. K.; HIRANO, T.; GRASU, E. G. Effects of environmental salinity and 17 α -methyltestosterone on growth and oxygen consumption in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 136, p. 657–665, 2003.

STACEY, N.; SORENSEN, P. Hormonal pheromones in fish. In: PFAFF, D. W.; ARNOLD, A. P.; ETGEN, A. M.; FAHRBACH, S. E.; RUBIN, R. T. (Eds.), **Hormones, brain and behavior**. Elsevier, San Diego, CA, p. 639–682, 2009.

TALLET, C.; SY, K.; PRUNIER, A.; NOWAK, R.; BOISSY, A.; BOIVIN, X. Behavioural and physiological reactions of piglets to gentle tactile interactions vary according to their previous experience with humans. **Livestock Science**, v. 167, p. 331–341, 2014.

TAVES, M. D.; DESJARDINS, J. K.; MISHRA, S.; BALSHINE, S. Androgens and dominance: Sex-specific patterns in a highly social fish (*Neolamprologus pulcher*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, p. 202–207, 2009.

THÜNKEN, T.; WALTSCHYK, N.; BAKKER, T. C. M.; KULLMANN, H. Olfactory self-recognition in a cichlid fish. **Animal Cognition**, v. 12, p. 717–724, 2009.

TORREZANI, C. S.; PINHO-NETO, C. F.; MIYAI, C. A.; SANCHES, F. H. C.; BARRETO, R. E. Structural enrichment reduces aggression in *Tilapia rendalli*. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 46, p. 1–8, 2013.

- VØLLESTAD, L. A.; QUINN, T. P. Trade-off between growth rate and aggression in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Animal Behaviour**, v. 66, p. 561–568, 2003.
- VOLPATO, G. L.; FERNANDES, M. O. Social control of growth in fish. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 4, p. 797-810, 1994.
- VOLPATO, G. L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; FERNANDES-DE-CASTILHO, M. Insights into the concept of fish welfare. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 75, n. 2, p. 165–171, 2007.
- VON KNORRING, A. L.; SÖDERBERG, A.; AUSTIN, L.; UVNÄS-MOBERG, K. Massage decreases aggression in preschool children: A long-term study. **Acta Paediatrica**, v. 97, n. 9, p. 1265–1269, 2008.
- WARD, A. J. W. Social facilitation of exploration in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 66, p. 223-230, 2012.
- WEI, B.; TAI, F.; LIU, X.; MA, L.; YANG, X.; JIA, R.; ZHANG, X. Neonatal tactile stimulation alleviates the negative effects of neonatal isolation on novel object recognition, sociability and neuroendocrine levels in male adult mandarin voles (*Microtus mandarinus*). **Physiology & Behavior**, v. 112, p. 14-22, 2013.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591–625, 1997.
- WINBERG, S.; NILSSON, G. E. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106C, n. 3, p. 597-614, 1993.
- WINBERG, S.; ØVERLI, Ø.; LEPAGE, O. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 3867–3876, 2001.
- WINBERG, S.; THORNQVIST, P. Role of brain serotonin in modulating fish behavior. **Current Zoology**, v. 62, n. 3, p. 317-323, 2016.

YUE, M.; ZHAO, J.; TANG, S.; ZHAO, Y. Effects of estradiol and testosterone on the expression of growth-related genes in female and male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 49, p. 216-228, 2017.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analyses**. Prentice Hall, New Jersey. 4 ed., 1999, p. 663.

Estimulação táctil de longo prazo diminui efeitos negativos da alta densidade de estocagem e aumenta desempenho produtivo na tilápia-do-nilo

Ana Carolina dos Santos Gauy^{1,2}; Eliane Gonçalves-de-Freitas^{1,2}

¹Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²Centro de Aquicultura da UNESP, SP, Brasil.

RESUMO

A produção de peixes no mundo tem aumentado a cada ano e, com ela, aumentou a preocupação com o bem-estar dos peixes, pois estressores do ambiente de criação e do manejo podem diminuir o bem-estar dos animais. A alta densidade de estocagem é um desses estressores, a qual prejudica o bem-estar e desempenho produtivo da tilápia-do-nilo. No entanto, muitas vezes não há como reduzir os estressores, tornando importante encontrar formas de mitigar os efeitos negativos da criação e do manejo. Nesse sentido, a estimulação táctil corporal (semelhante a massagens) vem sendo utilizada para promover bem-estar nos animais, principalmente em mamíferos. Em peixes, ela reduz o estresse em peixes recifais e diminui a agressividade em indivíduos isolados da tilápia-do-nilo. Além disso, a longo prazo, diminui a agressividade e aumenta os parâmetros de desempenho produtivo em grupos dessa espécie. Assim, testamos se a estimulação táctil de longo prazo tem efeito positivo sobre o bem-estar da tilápia-do-nilo, reduzindo os efeitos negativos da alta densidade de estocagem. Dez machos adultos foram agrupados e mantidos em aquários por 21 dias em 4 tratamentos, com 10 réplicas cada: 1) Sem estimulação táctil e alta densidade (1 peixe / 0,014 m³); 2) Sem estimulação táctil e baixa densidade (1 peixe / 0,028 m³); 3) Com estimulação táctil e alta densidade (1 peixe / 0,014 m³); 4) Com estimulação táctil e baixa densidade (1 peixe / 0,028 m³). Nos tratamentos com estimulação táctil, um aparato feito com hastes plásticas verticais com cerdas de silicone nas laterais foi posicionado no centro do aquário, assim quando os peixes

atravessavam por ele recebiam a estimulação tátil. Um aparato similar, mas sem as cerdas de silicone foi usado nos grupos controle. Houve biometria nos dias 1 e 21 e coleta de sangue no dia 21 para análise do cortisol. Foram calculados o ganho de comprimento e peso, a taxa de crescimento específica, a taxa de eficiência alimentar e o fator de condição em cada tratamento. O cortisol, o ganho de comprimento, ganho de peso e a eficiência alimentar foram maiores no tratamento com estimulação e baixa densidade e menores no tratamento sem estimulação e alta densidade. Além disso, o fator de condição aumentou no final dos 21 dias somente no tratamento com estimulação e baixa densidade. Portanto, podemos concluir que a estimulação de longo prazo melhora todos os parâmetros de desempenho produtivo da tilápia-do-nylo, reduzindo os efeitos negativos da alta densidade de estocagem nessa espécie.

Palavras-chave: bem-estar, eficiência alimentar, estresse, fator de condição, taxa de crescimento.

ABSTRACT

The production of fish in the world has increased every year and, alongside it, the concern for the welfare of fish, as stressors in the breeding and management environment can decrease the welfare of animals. The high stocking density is one of these stressors, which impairs the welfare and productive performance of Nile tilapia. However, there is often no way to reduce stressors, making it important to find ways to mitigate the negative effects of rearing and management. In this sense, tactile body stimulation (similar to massages) has been used to promote welfare in animals, especially in mammals. In fish, it reduces stress of reef fish and decreases aggression in isolated individuals of Nile tilapia. In addition, in the long run, it decreases aggressiveness and increase parameters of productive performance in groups of this species. Thus, we tested whether long-term tactile stimulation has a positive effect on the welfare of Nile tilapia, reducing the negative effects of high stocking density. Ten adult males were grouped and kept in aquariums for 21 days in 4 treatments, with 10 replicates each: 1) Without tactile stimulation and high density

(1 fish / 0.014 m³); 2) Without tactile stimulation and low density (1 fish / 0.028 m³); 3) With tactile stimulation and high density (1 fish / 0.014 m³); 4) With tactile stimulation and low density (1 fish / 0.028 m³). In the treatments with tactile stimulation, an apparatus made with vertical plastic rods with silicone bristles on the sides was positioned in the center of the aquarium, so when the fish passed through it they received tactile stimulation. A similar apparatus, but without the silicone bristles was used in the control groups. Biometrics were performed on days 1 and 21 and blood was collected on day 21 for analysis of cortisol. Length and weight gain, specific growth rate, feed efficiency rate and condition factor were calculated for each treatment. The cortisol, the gain in length, weight gain and the feeding efficiency were greater in the treatment with stimulation and low density and lower in the treatment without stimulation and high density. In addition, the condition factor increased at the end of the 21 days only in the treatment with stimulation and low density. Therefore, we can conclude that long-term stimulation improves all parameters of productive performance of Nile tilapia, reducing the negative effects of high stocking density in this species.

Keywords: condition factor, food efficiency, growth rate, stress, welfare.

1. Introdução

A produção de peixes na aquicultura mundial tem aumentado constantemente com o passar dos anos, sendo que a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é a terceira espécie mais produzida no mundo (FAO, 2020). Com isso, cresceu também a preocupação do impacto dessa prática aos animais, aumentando os estudos sobre o bem-estar dos peixes (ASHLEY, 2007; SARAIVA; ARECHAVALA-LOPEZ, 2019). Em ambientes de criação, existem diversos fatores que diminuem o bem-estar desses animais, como capturas com rede (ELLIS et al., 2007), interações agressivas (HUNTINGFORD et al., 2006), estresse social decorrente das lutas (BARRETO; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2015) e densidade de estocagem (ELLIS et al., 2002). A densidade de estocagem pode ser definida em qualquer momento da criação, sendo representada como a biomassa ou número de peixes pelo volume do

tanque (ELLIS et al., 2002). Esse fator pode afetar o bem-estar dos peixes na produção, principalmente em altas densidades associadas a pequenos espaços visando uma grande produtividade (ASHLEY, 2007), uma vez que altas densidades de estocagem influenciam variáveis associadas ao bem-estar, como a qualidade da água e a interação social entre os peixes (ELLIS et al., 2002). Porém, dependendo da espécie, altas e baixas densidades podem prejudicar o bem-estar dos animais (HUNTINGFORD; KADRI, 2014). Por exemplo, para espécies que vivem naturalmente em grandes cardumes, baixas densidades podem ser prejudiciais, já para espécies territoriais altas densidades podem ter efeitos negativos (ASHLEY, 2007). A alta densidade de estocagem é um estressor muito comum na produção da tilápia-do-nilo, essa espécie é um peixe territorial, que define hierarquia de dominância por meio de lutas (GONÇALVES-DE-FREITAS et al., 2019). Nessa espécie, alguns estudos que compararam diferentes densidades de estocagem encontraram que densidades mais altas estão associadas à diminuição do crescimento e da eficiência alimentar (AZAZA et al., 2013; BARCELLOS et al., 1999b; GARCIA et al., 2013; MONIRUZZAMAN et al., 2015; WU et al., 2018), diminuição do fator de condição (WU et al., 2018), aumento do estresse (BARCELLOS et al., 1999b; JUN et al., 2013), diminuição da capacidade imune (QIANG et al., 2016) e aumento da mortalidade dos animais (MONIRUZZAMAN et al., 2015; WU et al., 2018). Desse modo, o desempenho produtivo, a saúde e o bem-estar dos peixes podem ser prejudicados pela constante exposição aos estressores presentes da piscicultura. No entanto, muitas vezes não há como reduzir os estressores, tornando importante encontrar alternativas que minimizem os efeitos negativos da criação e do manejo, a fim de melhorar o bem-estar e o sistema de produção dos peixes.

A estimulação tátil vem sendo estudada como uma ferramenta para melhorar o bem-estar dos animais. Diversas pesquisas, principalmente com mamíferos, demonstram que algum tipo de toque, carícia ou “massagem” promovem efeitos positivos aos animais. Por exemplo, Field et al. (2005) demonstraram diminuição dos níveis de estresse e aumento dos níveis de serotonina em humanos. Tallet et al. (2014) demonstraram diminuição da taxa de batimentos cardíacos em leitões. Wei et

al. (2013) mostraram ganho de peso e diminuição da agressividade em roedores isolados. Em peixes, já foi demonstrado que a estimulação tátil em curto prazo (10 dias ou menos) diminui estresse em peixes recifais (SOARES et al., 2011) e diminui a agressividade em machos isolados de tilápia-do-nilo (BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019). Além disso, a longo prazo, a estimulação tátil diminui a agressividade e aumenta os parâmetros de desempenho produtivo em grupos sociais de machos de tilápia-do-nilo (CAPÍTULO 1 – dados não publicados). Como grande parte do problema da densidade de estocagem está associada às interações agressivas e ao estresse social em peixes territoriais e a estimulação tátil reduz as interações agressivas na tilápia-do-nilo, o objetivo deste estudo foi testar se a estimulação tátil de longo prazo reduz os efeitos negativos da alta densidade de estocagem sobre o bem-estar dessa espécie. Levantamos a hipótese de que os animais em contato com a estimulação tátil apresentam redução do estresse e aumento dos parâmetros de desempenho produtivo, como o crescimento, a eficiência alimentar e o fator de condição.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção dos peixes

Machos revertidos de tilápia-do-nilo linhagem GIFT (*Oreochromis niloticus*) provenientes de um fornecedor comercial (Piscicultura Projeto Peixe – Sales Oliveira, SP) foram aclimatados por 20 dias em caixas d'água de polietileno (ca. 500L, 1 peixe / 10L). A temperatura da água foi mantida em 27°C, por meio de aquecedores com termostatos e a qualidade da água foi mantida por meio de filtros biológicos Canister (filtração de 400 L / h) e aeração constante. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz (07:00h às 19:00h). Os tanques foram sifonados semanalmente para remover as sobras de alimentos e fezes, com renovação de no máximo 25% da água, para que houvesse o mínimo de prejuízo para os animais (e.g. GAUY; BOSCOLO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2018). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00h e 15:00h) com ração comercial para peixes (AGROMIX[®], 32% PB), à saciedade aparente.

2.2. Aparato utilizado

O estimulador tátil é um aparato formado por uma estrutura retangular de PVC e por hastes plásticas verticais com cerdas de silicone nas laterais. Ele foi utilizado para promover a estimulação tátil nos peixes (Figura 1A). Optamos pelas cerdas de silicone, pois são macias, não retiram o muco que reveste o corpo dos peixes e não provocam ferimentos (e.g. BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019; CAPÍTULO 1 – dados não publicados). Foi utilizado, também, um aparato semelhante, porém sem as cerdas de silicone, o qual funcionou como controle, não promovendo a estimulação tátil (Figura 1B). Ambos os aparatos, cada um em seu respectivo tratamento, foram introduzidos no centro do aquário (Figura 1C), de forma que ao passar pelo centro do aquário, os peixes do tratamento com estimulação tátil tinham contato com as cerdas de silicone (Figura 1D).

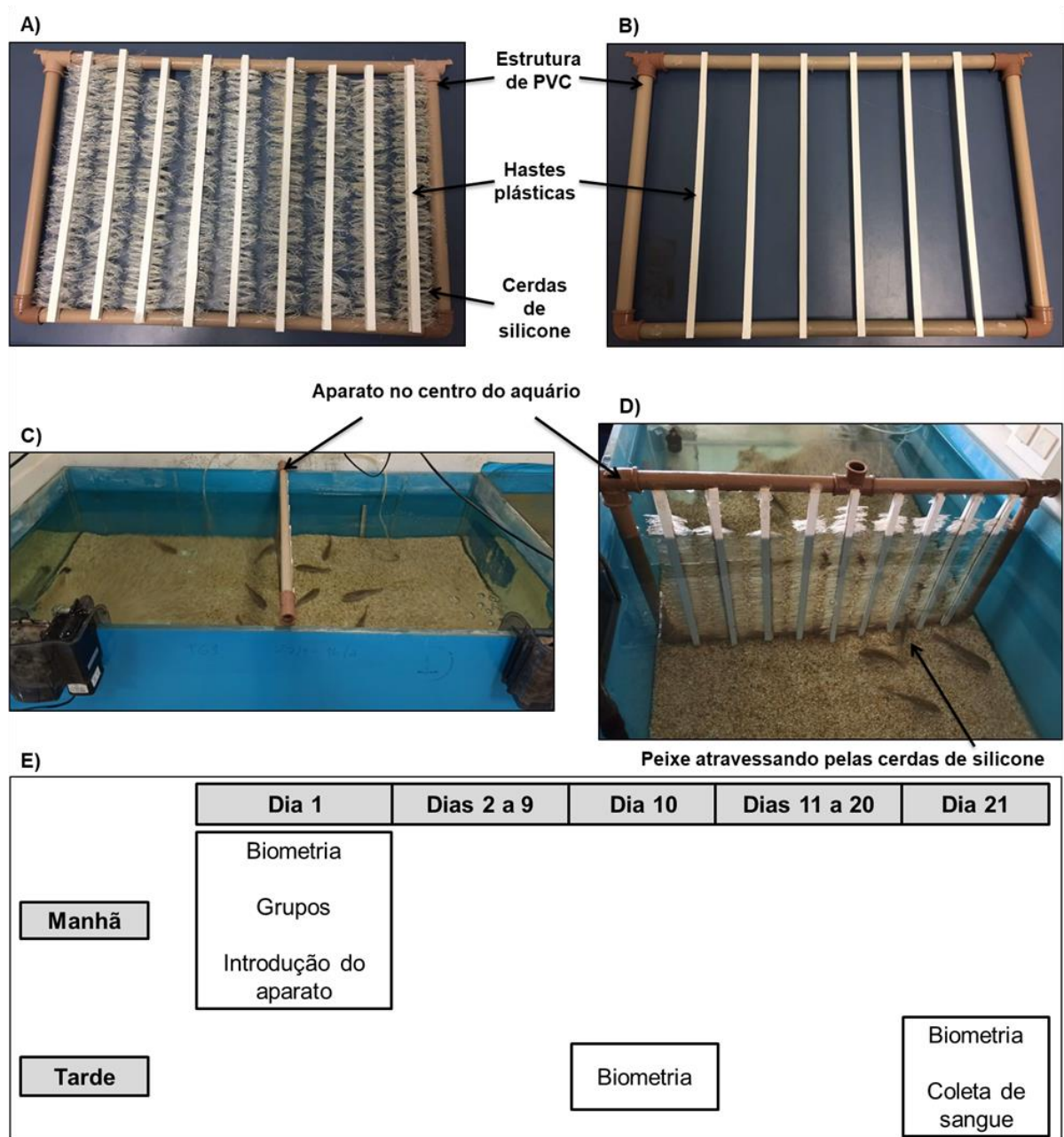


Figura 1. Estimulador tátil composto por uma estrutura retangular de PVC e hastes plásticas, (A) com cerdas de silicone que promovem a estimulação tátil e (B) sem as cerdas de silicone para controle. (C) Aparato posicionado no centro do aquário. (D) Peixe atravessando pelas cerdas de silicone. (E) Cronograma das atividades dentro do delineamento experimental.

2.3. Delineamento experimental

Foi testado o efeito da estimulação táctil de longo prazo sobre o bem-estar de machos de tilápia-do-nilo em diferentes densidades de estocagem. Para isso, os animais foram submetidos a quatro tratamentos: 1) Sem estimulação táctil e alta densidade (densidade de 10 peixes / 140L - 1 peixe / 0,014 m³); 2) Sem estimulação táctil e baixa densidade (densidade de 10 peixes / 280L - 1 peixe / 0,028 m³); 3) Com estimulação táctil e alta densidade (densidade de 10 peixes / 140L - 1 peixe / 0,014 m³); 4) Com estimulação táctil e baixa densidade (densidade de 10 peixes / 280L - 1 peixe / 0,028 m³). Foram feitas 10 réplicas por tratamento, dessa forma, foram utilizados 400 animais. Para obter as diferentes densidades de estocagem, optamos por reduzir o espaço disponível ao invés de aumentar o número de animais no mesmo espaço. Assim, padronizamos o número de animais em todos os tratamentos, uma vez que número diferente de animais no grupo poderia interferir nas interações sociais entre os animais (e.g. FALSARELLA; BRANDÃO; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2017). Nos tratamentos com estimulação táctil foi introduzido o aparato com cerdas de silicone no centro do aquário, de modo que os animais tinham acesso à estimulação táctil quando atravessassem pelo aparato. Nos tratamentos sem estimulação táctil foi introduzido o aparato sem as cerdas de silicone, de modo que os animais não tinham acesso à estimulação táctil. Os aparatos foram inseridos nos aquários no primeiro dia de experimento. Os peixes foram anestesiados (Benzocaína, 0,03 g/L), medidos, pesados, agrupados e destinados a um dos tratamentos. Os grupos de 10 animais foram mantidos em aquários por 21 dias. Todos os animais passaram por biometria no 1º, 10º e 21º dias de experimento, sendo a do dia 10 para ajuste da proporção da ração oferecida aos animais (4% da biomassa/dia, divididas em duas refeições por dia, 09:00h e 15:00h). Além disso, houve coleta de sangue de todos os animais no 21º dia de experimento para posterior análise do cortisol plasmático (Figura 1E). O cortisol foi dosado, pois é um indicador fisiológico de estresse em peixes (ELLIS et al., 2012; HUNTINGFORD et al., 2006; MARTINS et al., 2012).

2.4. Parâmetros de desempenho produtivo

Foram avaliados os seguintes parâmetros de desempenho produtivo do grupo (média dos 10 peixes do grupo):

- Ganho de comprimento = Comprimento padrão final – Comprimento padrão inicial;
- Ganho de peso = Peso final – Peso inicial;
- Coeficiente de variação do tamanho no grupo = (Desvio padrão/Média).100;
- Taxa de crescimento específica (SGR):

$$\text{SGR} = (\ln \text{Peso final} - \ln \text{Peso inicial} / \text{Tempo}).100;$$

- Eficiência alimentar, a qual reflete a relação entre alimento consumido e ganho de peso (DE VERDAL et al., 2017), aqui calculada pela taxa de eficiência alimentar (FER).

$$\text{FER} = \text{Ganho de peso} / \text{Quantidade de ração fornecida}.$$

Sendo que podemos assumir que a eficiência alimentar é melhorada quando a FER é aumentada (DE VERDAL et al., 2017);

- Fator de condição (K), o qual reflete o estado fisiológico de um peixe em relação ao seu bem-estar (IGHWELA; AHMED; ABOL-MUNAFI, 2011), e foi calculado de acordo com (FROESE, 2006; FULTON, 1904):

$$K = (\text{Peso} / \text{Comprimento}^3).100.$$

2.5. Coleta de sangue e dosagem hormonal

Os animais foram anestesiados (Benzocaína, 0,09 g/L), o sangue foi coletado por punção da veia caudal utilizando agulhas hipodérmicas e seringas heparinizadas. O manejo foi realizado em menos de 2 minutos para evitar interferência nos resultados (POTTINGER, 2008). O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, o plasma foi separado e congelado a -20°C para posterior dosagem hormonal. A dosagem do cortisol foi realizada pelo método ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay, utilizando kits comerciais (IBL - Immuno Biological Laboratories, Hamburg, Alemanha), já validado para a tilápia-do-nilo (e.g.

BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019; BOSCOLO; MORAIS; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2011). A análise foi realizada em todos os peixes do experimento, em duplicata e sem diluição das amostras. O coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram, respectivamente, 5,7% e 11,5%.

2.6. Detalhes experimentais

O período de 21 dias foi escolhido como longo prazo, pois ele corresponde ao triplo do tempo utilizado por Bolognesi, Gauy e Gonçalves-de-Freitas (2019) para fornecer à estimulação tátil a tilápia-do-nilo. Além disso, já foi demonstrado que 21 dias são suficientes para observarmos um efeito cumulativo da estimulação tátil nessa espécie (CAPÍTULO 1 – dados não publicados). Os animais foram agrupados em aquários de diferentes tamanhos, sendo aquários de 60 x 60 x 40 cm; ca. 140L para os tratamentos de alta densidade (1 peixe / 0,014m³) e aquários de 120 x 60 x 40 cm; ca. 280L para os tratamentos de baixa densidade (1 peixe / 0,028m³). Todas as laterais dos aquários foram revestidas por plástico azul opaco para evitar contato visual com animais de aquários vizinhos. O azul foi utilizado porque previne o estresse na tilápia-do-nilo (MAIA; VOLPATO, 2013). O fotoperíodo foi de 12 horas de luz (07:00h às 19:00h). Os parâmetros da água foram monitorados nos dias 1, 10 e 21, as médias $\pm$ erro padrão dos dias em cada tratamento estão na tabela 1. Os animais foram alimentados nos mesmos horários e com a mesma ração fornecida durante o período de aclimação, porém com a quantidade de 4% da biomassa do grupo. A quantidade de ração fornecida durante todo o experimento foi igual entre os tratamentos (média $\pm$ erro padrão de ração oferecida (g) - tratamento sem estimulação e alta densidade: 131,15 $\pm$ 16,95; tratamento sem estimulação e baixa densidade: 127,48 $\pm$ 11,87; tratamento com estimulação e alta densidade: 131,42 $\pm$ 15,06; tratamento com estimulação e baixa densidade: 154,72 $\pm$ 18,14; Two-way ANOVA, entre tratamentos: $F_{(1,36)} = 0,77$, $p = 0,39$; entre densidades: $F_{(1,36)} = 0,39$, $p = 0,53$; sem interação entre tratamento e densidade: $F_{(1,36)} = 0,74$, $p = 0,40$). Não foi quantificado o número de atravessamentos dos peixes pelo aparato, pois o alto número de animais por aquário dificulta essa análise. Porém, observamos atravessamentos dos animais durante o período de alimentação e fora dele também.

Já foi demonstrado que a tilápia-do-nylo atravessa espontaneamente pelo aparato, tanto isolada (BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019) quanto em grupo (CAPÍTULO 1 – dados não publicados). Além disso, a comida foi distribuída cada dia de um lado diferente do aquário para forçar o atravessamento dos animais pelo aparato.

Tabela 1: Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros da água nos três dias de medição em cada tratamento (n = 10 cada tratamento).

Parâmetro	Sem estimulação e alta densidade	Sem estimulação e baixa densidade	Com estimulação e alta densidade	Com estimulação e baixa densidade
T (°C)	27,57 $\pm$ 0,06	27,34 $\pm$ 0,09	27,32 $\pm$ 0,10	27,40 $\pm$ 0,09
pH	7,04 $\pm$ 0,03	7,05 $\pm$ 0,05	7,03 $\pm$ 0,05	7,07 $\pm$ 0,03
OD (ppm)	8,29 $\pm$ 0,07	8,46 $\pm$ 0,07	8,47 $\pm$ 0,07	8,45 $\pm$ 0,12
Amônia (ppm)	0,12 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,03
Nitrito (ppm)	0,14 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02

Temperatura (T) e pH medidos por aparelho eletrônico - Hanna HI98127; Oxigênio dissolvido (OD) medido por aparelho eletrônico - Hanna HI9146; Níveis de amônia e nitrito medidos por kits comerciais – LabconTest.

2.7. Análise de dados

Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (HA; HA, 2012; LEHNER, 1996) e a homocedasticidade por Fmax (ZAR, 1999). Foi utilizado Two-way ANOVA para comparar os comprimentos padrão e os pesos iniciais e finais, os coeficientes de variação do grupo, o ganho de comprimento, o ganho de peso, o SGR, a taxa de eficiência alimentar e o nível de cortisol do grupo (variáveis dependentes) entre estimulação e densidade (variáveis categóricas). MANOVA para medidas repetidas foi usado para comparar o fator de condição inicial e final (variáveis dependentes) entre estimulação e densidade (variáveis categóricas). Teste de Tukey HSD foi utilizado como teste post-hoc. Foi considerado $P \leq 0,05$ para significância estatística.

2.8. Nota ética

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto, SP (CEUA-IBILCE/UNESP), protocolo nº 213/2019.

3. Resultados

Não houve diferença do comprimento padrão e peso iniciais entre os tratamentos, assim como nos respectivos coeficientes de variação do grupo. Porém, houve diferença desses parâmetros no final do período entre os tratamentos, exceto dos coeficientes de variação do grupo (Tabela 2). Houve diferença, também, no ganho de comprimento, ganho de peso, taxa de crescimento específica, taxa de eficiência alimentar e nível de cortisol do grupo entre os tratamentos (Two-way ANOVA; Tabela 3; Figuras 2A-E). Levando em consideração essas variáveis, os animais tiveram menor desempenho no tratamento sem estimulação e alta densidade ($p < 0,0003$) e maior desempenho no tratamento com estimulação e baixa densidade do que nos demais ($p < 0,0001$). Além disso, os animais dos tratamentos sem estimulação e baixa densidade e com estimulação e alta densidade tiveram desempenho semelhante ($p > 0,96$). Exceto o nível de cortisol, o qual foi menor no tratamento sem estimulação e alta densidade ($p < 0,03$) e semelhante nos demais tratamentos ($p > 0,22$).

Tabela 2: Média $\pm$ erro padrão do comprimento padrão e peso dos animais no início e final do período e seus respectivos coeficientes de variação do grupo em cada tratamento (n = 10 cada tratamento).

Variável	Sem estimulação e alta densidade	Sem estimulação e baixa densidade	Com estimulação e alta densidade	Com estimulação e baixa densidade	Valores de $F_{(1,36)}$	Valores de p
CP inicial	8,07 $\pm$ 0,3	7,99 $\pm$ 0,26	8,02 $\pm$ 0,3	8,29 $\pm$ 0,35	Com vs Sem Estimulação: 0,16 Alta vs Baixa Densidade: 0,09 Interação: 0,34	0,69 0,77 0,56
CV do grupo	5,28 $\pm$ 0,81	4,87 $\pm$ 0,52	5,04 $\pm$ 0,78	3,93 $\pm$ 0,38	Com vs Sem Estimulação: 0,82 Alta vs Baixa Densidade: 1,35 Interação: 0,30	0,37 0,25 0,59
P inicial	17,78 $\pm$ 2,48	16,33 $\pm$ 1,72	17,25 $\pm$ 2,17	19,02 $\pm$ 2,54	Com vs Sem Estimulação: 0,23 Alta vs Baixa Densidade: 0,005 Interação: 0,51	0,63 0,95 0,48
CV do grupo	18,11 $\pm$ 2,28	16,98 $\pm$ 1,85	17,48 $\pm$ 2,56	14,11 $\pm$ 1,49	Com vs Sem Estimulação: 0,70 Alta vs Baixa Densidade: 1,17 Interação: 0,29	0,41 0,29 0,59
CP final	8,16 $\pm$ 0,28 ^a	8,53 $\pm$ 0,22 ^{ab}	8,53 $\pm$ 0,30 ^{ab}	9,39 $\pm$ 0,35 ^b	Com vs Sem Estimulação: 4,35 Alta vs Baixa Densidade: 4,39 Interação: 0,71	0,04 0,04 0,41
CV do grupo	6,69 $\pm$ 0,82	6,14 $\pm$ 0,45	7,90 $\pm$ 0,82	5,45 $\pm$ 0,45	Com vs Sem Estimulação: 0,15 Alta vs Baixa Densidade: 5,07 Interação: 2,05	0,70 0,03 0,16
P final	18,13 $\pm$ 2,12 ^a	20,66 $\pm$ 1,72 ^a	21,56 $\pm$ 2,32 ^a	31, 02 $\pm$ 3,25 ^b	Com vs Sem Estimulação: 8,12 Alta vs Baixa Densidade: 6,13 Interação: 2,04	0,007 0,02 0,16
CV do grupo	21,56 $\pm$ 2,54	18,75 $\pm$ 1,66	24,93 $\pm$ 2,57	17,87 $\pm$ 1,54	Com vs Sem Estimulação: 0,34 Alta vs Baixa Densidade: 5,33 Interação: 0,99	0,57 0,03 0,33

Two-way ANOVA seguido de Tukey HSD. Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos. Valores significativamente diferentes estão destacados em cinza e negrito. CP: Comprimento padrão (cm); CV: Coeficiente de variação (%); P: Peso (g).

Tabela 3: Comparação por Two-way ANOVA do ganho de comprimento, ganho de peso, taxa de crescimento específica, taxa de eficiência alimentar e nível de cortisol entre tratamentos (n = 10 cada tratamento).

Variável	Valor de $F_{(1,36)}$	P
Ganho de comprimento	Com vs. Sem Estimulação: 97,03	< 0,0001
	Alta vs. Baixa Densidade: 110,94	< 0,0001
	Interação: 1,89	0,18
Ganho de peso	Com vs. Sem Estimulação: 109,65	< 0,0001
	Alta vs. Baixa Densidade: 110,59	< 0,0001
	Interação: 11,27	0,002
Taxa de crescimento específica	Com vs. Sem Estimulação: 62,45	< 0,0001
	Alta vs. Baixa Densidade: 68,03	< 0,0001
	Interação: 1,26	0,27
Taxa de eficiência alimentar	Com vs. Sem Estimulação: 64,40	< 0,0001
	Alta vs. Baixa Densidade: 66,67	< 0,0001
	Interação: 3,07	0,08
Cortisol	Com vs. Sem Estimulação: 7,18	0,01
	Alta vs. Baixa Densidade: 1,85	0,18
	Interação: 1,94	0,17

Valores significativamente diferentes estão destacados em cinza e negrito.

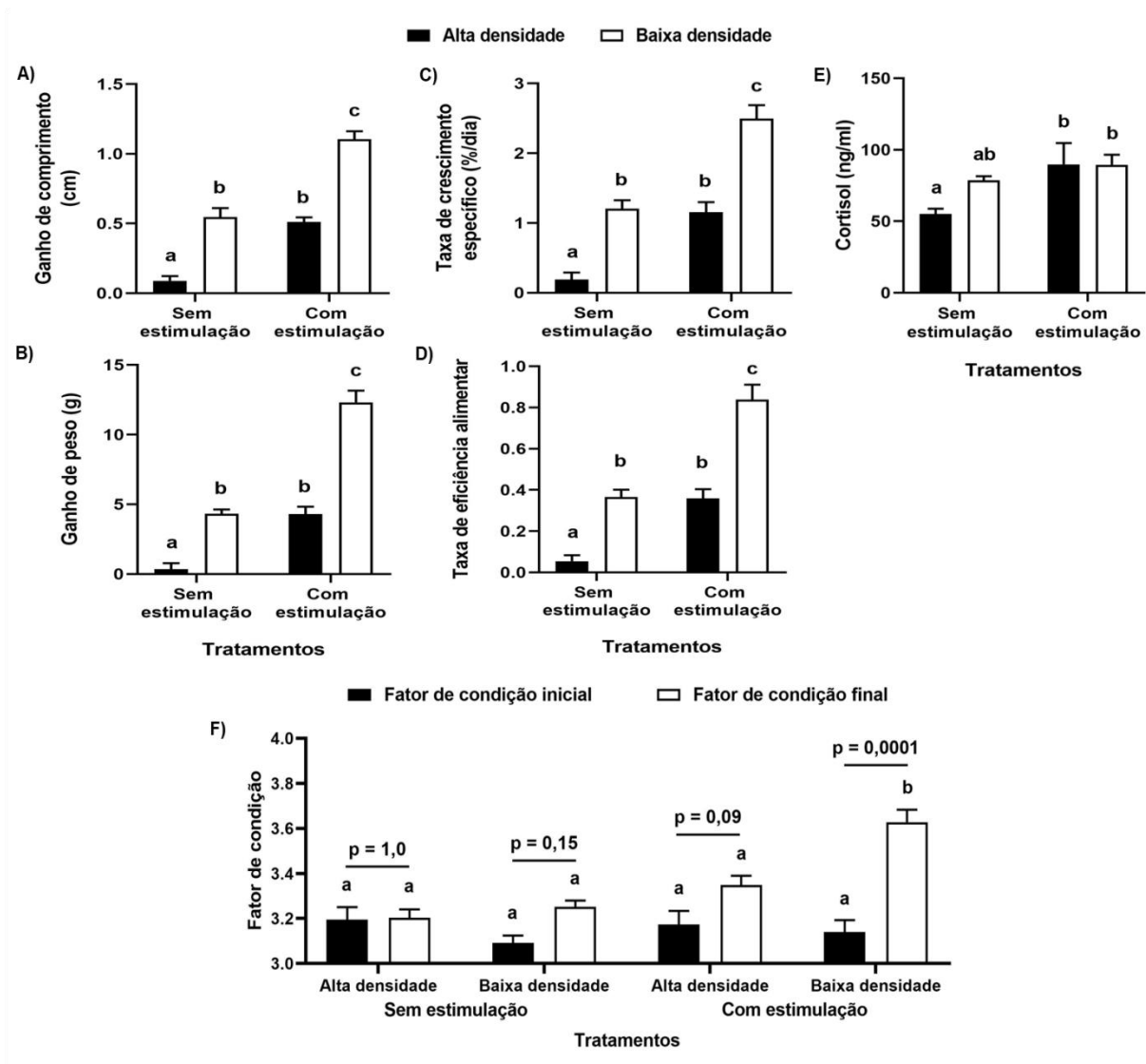


Figura 2: Média $\pm$ EP (A) ganho de comprimento, (B) ganho de peso, (C) taxa de crescimento específico, (D) taxa de eficiência alimentar e (E) nível de cortisol do grupo em cada tratamento. Comparação entre os tratamentos por Two-way ANOVA, seguido de Tukey HSD. Letras diferentes indicam diferença estatística. Média $\pm$ EP do (F) fator de condição no início e final do período experimental. MANOVA para medidas repetidas seguido de Tukey HSD. Valores de p indicam diferenças significativas dentro de cada tratamento. Letras comparam os fatores de condição inicial e final entre os tratamentos. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Houve também diferença no fator de condição entre os tratamentos no início e final do período (MANOVA para medidas repetidas, com interação entre tratamento e

densidade: $F_{(1,36)} = 4,40$, $p = 0,04$; com interação entre fator de condição e densidade: $F_{(1,36)} = 15,39$, $p = 0,0004$; com interação entre fator de condição e tratamento: $F_{(1,36)} = 17,52$, $p = 0,0002$; sem interação entre fator de condição, densidade e tratamento: $F_{(1,36)} = 1,84$, $p = 0,18$; Figura 2F). Não houve diferença no fator de condição inicial entre os tratamentos ($p > 0,77$). O fator de condição final foi igual entre os tratamentos ($p > 0,37$), exceto no tratamento com estimulação e baixa densidade, o qual foi maior que os demais ($p < 0,002$). Além disso, houve aumento comparando o fator de condição do início e do final do período no tratamento com estimulação e baixa densidade ($p = 0,0001$), o que não ocorreu no restante dos tratamentos, onde o fator de condição se manteve igual ($p > 0,09$).

4. Discussão

Neste estudo foi observado que a estimulação tátil de longo prazo melhorou o desempenho produtivo da tilápia-do-nilo, aumentando o crescimento, a eficiência alimentar e o fator de condição dos animais, possivelmente por reduzir os efeitos negativos da alta densidade de estocagem. Além disso, a estimulação tátil de longo prazo combinada com a baixa densidade de estocagem, tem o melhor desempenho entre os tratamentos, mesmo com nível de cortisol mais alto do que no tratamento sem estimulação e alta densidade. Portanto, a estimulação tátil pode ser uma ferramenta utilizada na piscicultura com a proposta de aumentar a produtividade por meio do aumento do bem-estar dos peixes.

Os animais partiram de uma condição semelhante de comprimento padrão e peso em todos os tratamentos. Foi observado crescimento em todos eles, porém na presença da estimulação tátil esse crescimento foi maior. Todos os tratamentos tinham uma boa qualidade da água, a qual é um fator que pode influenciar no desempenho dos animais em altas densidades (ELLIS et al., 2002; HUNTINGFORD; TURNBULL; KADRI, 2018). Portanto, podemos sugerir que todos os parâmetros analisados aqui tiveram clara influência da estimulação tátil nas duas densidades de estocagem, uma vez que todas as variáveis abióticas foram adequadamente controladas.

Já foi demonstrado para essa espécie que a estimulação tátil diminui a agressividade em animais isolados (BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS, 2019) e animais agrupados (CAPÍTULO 1 – dados não publicados). Isso pode acontecer, pois a estimulação tátil aumenta os níveis de serotonina em humanos (FIELD et al., 2005) e a manipulação do sistema serotoninérgico demonstrou ter efeito sobre a agressão em peixes. Por exemplo, Lepage et al. (2005) demonstraram diminuição da agressão dos indivíduos após estimular a produção de serotonina na truta arco-íris. Além disso, Adams, Liley e Gorzalka (1996) mostraram aumento da agressão em uma espécie de ciclídeo após inibição do sistema serotoninérgico. Juntos, esses dados demonstram que níveis elevados de serotonina estão associados com redução de agressividade nos animais. As interações agressivas, por sua vez, demandam alto gasto energético para os peixes (ALVARENGA; VOLPATO, 1995), o que interfere no crescimento da tilápia-do-nilo (FERNANDES; VOLPATO, 1993). Assim, sugerimos que esse possa ser um dos fatores que explica o maior crescimento dos peixes mantidos em contato com a estimulação tátil.

Considerando a diminuição da agressividade no tratamento com estimulação tátil, os animais também podem ter apresentado maior crescimento pela inibição dos seguintes mecanismos: 1) Em situações de luta ou fuga, o sistema nervoso simpático é ativado, aumentando a secreção de adrenalina pelas células cromafins (WENDELAAR BONGA, 1997). A adrenalina, por sua vez, aumenta a quebra de estoques de substrato de energia, como glicogênio hepático e gorduras (WENDELAAR BONGA, 1997). 2) Em situações de estresse social, o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) é ativado em peixes, aumentando a secreção de cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997; WINBERG; HÖGLUND; ØVERLI, 2016). O cortisol é um hormônio catabólico, o qual facilita a lipólise e em condições crônicas promove quebra de proteínas (WENDELAAR BONGA, 1997). Esses dois mecanismos atuam diretamente no crescimento dos animais, uma vez que ganho de peso e comprimento são eventos anabólicos e, portanto, são favorecidos pela menor ativação do sistema nervoso simpático e do eixo HPI. Além disso, o cortisol pode interferir na ação do hormônio de crescimento (GH), de forma direta, influenciando a

produção do GH (DEANE; WOO, 2009), ou indireta, inibindo seus receptores de IGF-1 no fígado, com consequente redução no crescimento muscular (KAJIMURA et al., 2003; SADOUL; VIJAYAN, 2016). Além desses efeitos, o cortisol também pode inibir o apetite e interferir na absorção de nutrientes em peixes (SADOUL; VIJAYAN, 2016). Assim, tanto o crescimento quanto a eficiência alimentar podem estar associados à melhor ingestão e assimilação de alimento, caso a estimulação tátil diminuísse o estresse social.

Apesar de existirem estudos mostrando que a estimulação tátil reduz o nível de cortisol em mamíferos (FIELD et al., 2005; FREITAS et al., 2015; REHN et al., 2014) e peixes recifais (SOARES et al., 2011), não encontramos redução neste estudo. Observamos maior nível de cortisol nos tratamentos com maior crescimento dos animais, o que vai contra aos mecanismos de crescimento influenciados pelo cortisol citados acima. Porém, o nível de cortisol encontrado nesse estudo pode não significar que os animais estão estressados, uma vez que cortisol é necessário para a manutenção de todos os organismos (SELYE, 1950). Aqui usamos a tilápia-do-nilo linhagem GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapias*), a qual foi selecionada para aumentar seu desempenho em crescimento (DEY et al., 2000; GUPTA; ACOSTA, 2004), podendo haver seleção de indivíduos mais ou menos reativos ao estresse, os quais podem apresentar níveis diferentes de cortisol do que a tilápia-do-nilo comum (e.g. POTTINGER; MORAN; MORGAN, 1994, com truta arco-íris). Para essa linhagem, alguns trabalhos relatam níveis basais de 90 - 110 ng/ml⁻¹ para animais isolados (BOLOGNESI; GAUY; GONÇALVES-DE-FREITAS; 2019) e 70 – 90 ng/ml⁻¹ para animais agrupados (JUN et al., 2013; QIANG et al., 2016). Desse modo, os níveis de cortisol encontrados nos tratamentos com estimulação tátil estão dentro dos níveis basais para essa linhagem. Além disso, o menor nível de cortisol encontrado no tratamento sem estimulação e alta densidade pode ser explicado, pois a elevação crônica do nível de cortisol é regulada por *feed-back* negativo do eixo HPI (WENDELAAR BONGA, 1997), refletindo em um menor pico de cortisol nessa situação (e.g. BARCELLOS et al., 1999a; SALONIUS; IWAMA, 1993). Desse modo, o menor nível de cortisol encontrado no tratamento sem estimulação e alta densidade não significa que os animais estavam menos estressados do que no

tratamento com estimulação e baixa densidade. Esse fato ainda pode ser confirmado pelo melhor desempenho dos animais em todos os parâmetros produtivos, mesmo com o nível de cortisol mais alto, o que não aconteceria se esse nível de cortisol indicasse estresse, uma vez que o estresse interfere no crescimento dos animais (SADOUL; VIJAYAN, 2016).

Além do crescimento, a eficiência alimentar também apresentou uma melhora na presença da estimulação tátil em ambas as densidades. Esse parâmetro indica a conversão do alimento em peso, ou seja, quanto melhor a eficiência alimentar menos alimento foi consumido por g de peixe produzido (DE VERDAL et al., 2017). Comparando entre os tratamentos, podemos sugerir que uma quantidade semelhante de ração pode ser convertida em 3 vezes mais peso quando os animais estão em contato com a estimulação tátil. De acordo com Besson et al. (2016) melhorar a taxa de crescimento e a eficiência alimentar dos animais tem impacto positivo na piscicultura, uma vez que essas características vão reduzir os custos (BESSON et al., 2016; DE VERDAL et al., 2017; GARCIA et al., 2016) e os impactos ambientais dessa prática (BESSON et al., 2016; DE VERDAL et al., 2017).

Outro ponto importante a ser destacado é que a estimulação tátil teve efeito positivo no tratamento com alta densidade de estocagem, aumentando os parâmetros produtivos a níveis semelhantes aos encontrados no tratamento sem estimulação e com baixa densidade. Os tratamentos com baixa densidade, tanto sem quanto com estimulação tátil, apresentaram melhor desempenho nos parâmetros produtivos comparados com os tratamentos com alta densidade. Alguns trabalhos com tilápia-do-nilo já demonstraram que altas densidades têm impacto negativo na produção dessa espécie. Por exemplo, Azaza et al. (2013) e Garcia et al. (2013) demonstraram que alta densidade de estocagem está associada com menor crescimento e menor eficiência alimentar. Além desses parâmetros, Wu et al. (2018) também observaram menor fator de condição, qualidade da carne e sobrevivência em alta densidade. Barcellos et al. (1999b) e Jun et al. (2013) mostraram elevado nível de cortisol em densidades maiores. Esses efeitos negativos podem ocorrer, pois as altas densidades podem influenciar as interações sociais, suprimindo o crescimento dos animais (ASHLEY, 2007; ELLIS et al., 2002). De fato, todos os

trabalhos citados a cima, mostrando os impactos da alta densidade na tilápia-do-nylo, discutem a influência das interações sociais nos resultados encontrados. Desse modo, podemos sugerir que a estimulação táctil de longo prazo teve efeito reduzindo os impactos negativos da alta densidade de estocagem na tilápia-do-nylo, provavelmente, diminuindo as interações agressivas no grupo (como demonstrado no Capítulo 1 – dados não publicados).

A combinação da estimulação táctil com a baixa densidade teve o melhor desempenho entre os tratamentos, o qual foi demonstrado pelo maior crescimento, maior eficiência alimentar e aumento do fator de condição dos animais. O fator de condição está relacionado com diversas características de desempenho do animal, como crescimento e qualidade nutricional (FROESE, 2006), portanto seu aumento demonstra boas condições de bem-estar e criação. Wu et al. (2018) também observaram maior fator de condição em baixa densidade de estocagem na tilápia-do-nylo. Além disso, animais dessa espécie em contato com a estimulação táctil de longo prazo apresentaram maior fator de condição do que os animais do controle (CAPÍTULO 1 – dados não publicados). Assim, podemos sugerir que a combinação de estimulação táctil com baixa densidade de estocagem tem melhor desempenho na produção e, provavelmente, na saúde e bem-estar dos animais.

Podemos concluir, portanto, que a estimulação táctil de longo prazo pode ser uma ferramenta promissora para aumentar a produtividade na piscicultura, principalmente se associada com baixas densidades e, também, para anular os efeitos negativos da alta densidade de estocagem. Desse modo, essa ferramenta pode melhorar a produção no futuro, uma vez que, para atender à demanda mundial de peixes, a piscicultura precisará produzir maiores quantidades utilizando menos alimento, água e espaço (GODFRAY et al., 2010; HUNTINGFORD; TURNBULL; KADRI, 2018). Nesse contexto, a estimulação táctil é um método eficiente, embora, mais estudos sejam necessários para confirmar essa eficiência em tanques com número maior de animais.

5. Referências

- ADAMS, C. F.; LILEY, N. R.; GORZALKA, B. B. PCPA increases aggression in male firemouth cichlids. **Pharmacology**, v. 53, p. 328-330, 1996.
- ALVARENGA, C. M. D.; VOLPATO, G. L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 75–80, 1995.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, p. 199-235, 2007.
- AZAZA, M. S.; ASSAD, A.; MAGHRBI, W.; EL-CAFSI, M. The effects of rearing density on growth, size heterogeneity and inter-individual variation of feed intake in monosex male Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Animal**, v. 7, n. 11, 1865-1874, 2013.
- BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v. 30, 437-444, 1999a.
- BARCELLOS, L. J. G.; NICOLAIEWSKY, S.; DE SOUZA, S. M. G.; LULHIER, F. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 887-892, 1999b.
- BARRETO, T. N.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Homogeneously sized groups increase aggressive interaction and affect social stress in Thai strain Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 48, n. 5, p. 309–318, 2015.
- BESSON, M.; AUBIN, J.; KOMEN, H.; POELMAN, M.; QUILLET, E.; VANDEPUTTE, M.; VAN ARENDONK, J. A. M.; DE BOER, I. J. M. Environmental impacts of genetic improvement of growth rate and feed conversion ratio in fish farming under rearing density and nitrogen output limitations. **Journal of Cleaner Production**, v. 116, p. 100-109, 2016.

BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. S.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Tactile stimulation reduces aggressiveness but does not lower stress in a territorial fish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

BOSCOLO, C. N. P.; MORAIS, R. N.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 1–2, p. 154–159, 2011.

DE VERDAL, H.; KOMEN, H.; QUILLET, E.; CHATAIN, B.; ALLAL, F.; BENZIE, J. A. H.; VANDEPUTTE, M. Improving feed efficiency in fish using selective breeding: A review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 833-851, 2017.

DEANE, E. E.; WOO, N. Y. S. Modulation of fish growth hormone levels by salinity, temperature, pollutants and aquaculture related stress: A review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 19, p. 97–120, 2009.

DEY, M. M.; EKNATH, A. E.; SIFA, L.; HUSSAIN, M. G.; THIEN, T. M.; HAO, N. V.; AYPAN, S.; PONGTHANA, N. Performance and nature of genetically improved farmed tilapia: A bioeconomic analysis. **Aquaculture Economics and Management**, v. 4, p. 83-106, 2000.

ELLIS, T.; JAMES, J. D.; SUNDH, H.; FRIDELL, F.; SUNDELL, K.; SCOTT, A. P. Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 272, n. 1–4, p. 698–706, 2007.

ELLIS, T.; NORTH, B.; SCOTT, A. P.; BROMAGE, N. R.; PORTER, M.; GADD, D. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 493-531, 2002.

ELLIS, T.; YILDIZ, H. Y.; LÓPEZ-OLMEDA, J.; SPEDICATO, M. T.; TORT, L.; ØVERLI, Ø.; MARTINS, C. I. M. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 163-188, 2012.

FALSARELLA, L. N.; BRANDÃO, M. L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Fish adjust aggressive behavior to audience size with limited information on bystanders' fighting ability. **Behavioural Processes**, v. 142, p. 116-118, 2017.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2020 - Sustainability in action**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2020, p. 206.

FERNANDES, M. O.; VOLPATO, G. L. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 2, p. 319–323, 1993.

FIELD, T.; HERNANDEZ-REIF, M.; DIEGO, M.; SCHANBERG, S.; KUHN, C. Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. **International Journal of Neuroscience**, v. 115, n. 10, p. 1397–1413, 2005.

FREITAS, D.; ANTONIAZZI, C. T. D.; SEGAT, H. J.; METZ, V. G.; VEY, L. T.; BARCELOS, R. C. S.; DUARTE, T.; DUARTE, M. M. M. F.; BURGER, M. E. Neonatal tactile stimulation decreases depression-like and anxiety-like behaviors and potentiates sertraline action in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 47, p. 192-197, 2015.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight–length relationships: History, meta-analysis and recommendations. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 4, p. 241–253, 2006.

FULTON, T. W. The rate of growth of fishes. **Twenty-second Annual Report of the Fishery Board of Scotland**, v.3, p. 141–241, 1904.

GARCIA, F.; ROMERA, D. M.; GOZI, K. S.; ONAKA, E. M.; FONSECA, F. S.; SCHALCH, S. H. C.; CANDEIRA, P. G.; GUERRA, L. O. M.; CARMO, F. J.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. **Aquaculture**, v. 410-411, p. 51-56, 2013.

GARCIA, F.; ROMERA, D. M.; SOUSA, N. S.; PAIVA-RAMOS, I.; ONAKA, E. M. The potential of periphyton-based cage culture of Nile tilapia in a Brazilian reservoir. **Aquaculture**, v. 464, p. 229-235, 2016.

GAUY, A. C. S.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Less water renewal reduces effects on social aggression of the cichlid *Pterophyllum scalare*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 198, p. 121–126, 2018.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; TOULMIN, C. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, p. 812– 818, 2010.

GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. S.; BRANDÃO, M. L.; GIAQUINTO, P. C.; FERNANDES-CASTILHO, M. Social behavior and welfare in Nile tilapia. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2019.

GUPTA, M. V.; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. **Naga World Fish Center Q**, v. 27, p. 4-14, 2004.

HA, R. R.; HA, J. C. **Integrative Statistics for the Social and Behavioral Sciences**. SAGE Publications, Inc., California. 1 ed., 2012, p. 429.

HUNTINGFORD, F. A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V. A.; KADRI, S.; POTTINGER, T. G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J. F. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, p. 332–372, 2006.

HUNTINGFORD, F. A.; KADRI, S. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 33, n. 1, p. 233-244, 2014.

HUNTINGFORD, F. A.; TURNBULL, J. F.; KADRI, S. Methods to increase fish production: Welfare and sustainability implications. In: GRANDIN, T.; WHITING, M. (Eds.), **Are We Pushing Animals to Their Biological Limits? Welfare and Ethical Implications**. CABI, p.89-121, 2018.

IGHWELA, K. A.; AHMED, A. B.; ABOL-MUNAFI, A. B. Condition factor as an indicator of growth and feeding intensity of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) feed on different levels of maltose. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 11, n. 4, p. 559-563, 2011.

JUN, Q.; HONG, Y.; HUI, W.; DIDLYN, K. M.; JIE, H.; PAO, X. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding. **Aquaculture Research**, v. 46, p 1-11, 2013.

KAJIMURA, S.; HIRANO, T.; VISITACION, N.; MORIYAMA, S.; AIDA, K; GRAU, E. G. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Endocrinology**, v. 178, p. 91–99, 2003.

LEHNER, P. N. **Handbook of Ethological Methods**. Cambridge University Press, Cambridge. 2 ed., 1996, p. 672.

LEPAGE, O.; LARSON, E. T.; MAYER, I.; WINBERG, S. Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant–subordinate relationships and aggression in rainbow trout. **Hormones and Behavior**, v. 48, p. 233-242, 2005.

MAIA, C. M.; VOLPATO, G. L. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. **Zoology**, v. 116, n. 1, p. 64–66, 2013.

MARTINS, C. I. M.; GALHARDO, L.; NOBLE, C.; DAMSGÅRD, B.; SPEDICATO, M. T.; ZUPA, W.; BEAUCHAUD, M.; KULCZYKOWSKA, E.; MASSABUAU, J. C.; CARTER, T.; PLANELLAS, S. R.; KRISTIANSEN, T. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 17–41, 2012.

MOZANZADEH, M. T.; MARAMMAZI, J. G.; YAGHOUBI, M.; YAVARI, V.; AGH, N.; GISBERT, E. Somatic and physiological responses to cyclic fasting and re-feeding periods in sobaity sea bream (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, p. 181–191, 2015.

POTTINGER, T. G.; MORAN, T. A.; MORGAN, J. A. W. Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress. **Journal of Fish Biology**, v. 44, p. 149–163, 1994.

POTTINGER, T. G. The stress response in fish – Mechanisms, effects and measurement. In: BRANSON, E. J. (Ed.), **Fish Welfare**. Blackwell Publishing Ltd, UK, p. 32–48, 2008.

QIANG, J.; HE, J.; YANG, H.; XU, P.; HABTE-TSION, H. M.; MA, X. Y.; ZHU, Z. X. The changes in cortisol and expression of immune genes of GIFT tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) at different rearing densities under *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture International**, v. 24, p. 1365-1378, 2016.

REHN, T.; HANDLIN, L.; UVNÄS-MOBERG, K.; KEELING, L. J. Dog's endocrine and behavioural responses at reunion are affected by how the human initiates contact. **Physiology & Behaviour**, v. 124, p. 45-53, 2014.

SADOUL, B.; VIJAYAN, M. M. Stress and growth. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.), **Biology of Stress in Fish**. Elsevier Academic Press, UK, p. 167-205, 2016.

SALONIUS, K.; IWAMA, G. K. Effects of early rearing environment on stress response, immune function, and disease resistance in juvenile Coho (*Oncorhynchus kisutch*) and Chinook Salmon (*O. tshawytscha*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.50, p. 759-766, 1993.

SARAIVA, J. L.; ARECHAVALA-LOPEZ, P. Welfare of fish - no longer the elephant in the room. **Fishes**, v. 4, n. 3, p. 1–3, 2019.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v.1, p. 1383-1392, 1950.

SOARES, M. C.; OLIVEIRA, R. F.; ROS, A. F.H.; GRUTTER, A. S.; BSHARY, R. Tactile stimulation lowers stress in fish. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

TALLET, C.; SY, K.; PRUNIER, A.; NOWAK, R.; BOISSY, A.; BOIVIN, X. Behavioural and physiological reactions of piglets to gentle tactile interactions vary according to their previous experience with humans. **Livestock Science**, v. 167, p. 331–341, 2014.

WEI, B.; TAI, F.; LIU, X.; MA, L.; YANG, X.; JIA, R.; ZHANG, X. Neonatal tactile stimulation alleviates the negative effects of neonatal isolation on novel object recognition, sociability and neuroendocrine levels in male adult mandarin voles (*Microtus mandarinus*). **Physiology & Behavior**, v. 112, p. 14-22, 2013.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591–625, 1997.

WINBERG, S.; HÖGLUND, E.; ØVERLI, Ø. Variation in the neuroendocrine stress response. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.), **Biology of Stress in Fish**. Elsevier Academic Press, UK, p. 35-74, 2016.

WU, F.; WEN, H.; TIAN, J.; JIANG, M.; LIU, W.; YANG, C.; YU, L.; LU, X. Effect of stocking density on growth performance, serum biochemical parameters, and muscle texture properties of genetically improved farm tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, v. 26, p. 1247-1259, 2018.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analyses**. Prentice Hall, New Jersey. 4 ed., 1999, p. 663.

Referências Complementares

- ALMAZÁN-RUEDA, P.; SCHRAMA, J. W.; VERRETH, J. A. Behavioural responses under different feeding methods and light regimes of the African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. **Aquaculture**, v. 231, n. 1–4, p. 347–359, 2004.
- ALMEIDA, O.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; LOPES, J. S.; OLIVEIRA, R. F. Social instability promotes hormone–behavior associated patterns in a cichlid fish. **Hormones and Behavior**, v. 66, p. 369–382, 2014.
- ALVARENGA, C. M. D.; VOLPATO, G. L. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. **Physiology and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 75–80, 1995.
- ANANI, F. A.; NUNOO, F. K. E. Length-weight relationship and condition factor of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed farm-made and commercial tilapia diet. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 5, p. 647–650, 2016.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, p. 199–235, 2007.
- BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. S.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Tactile stimulation reduces aggressiveness but does not lower stress in a territorial fish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
- BOSCOLO, C. N. P.; MORAIS, R. N.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, n. 1–2, p. 154–159, 2011.
- CARVALHO, T. B.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 807–812, 2008.
- CHARNETSKI, C. J.; RIGGERS, S.; BRENNAN, F. X. Effect of petting a dog on immune system function. **Psychological Reports**, v. 95, p. 1087–1091, 2004.
- DE VERDAL, H.; KOMEN, H.; QUILLET, E.; CHATAIN, B.; ALLAL, F.; BENZIE, J. A. H.; VANDEPUTTE, M. Improving feed efficiency in fish using selective breeding: A review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 833–851, 2017.

DUNBAR, R. I. M. The social role of touch in humans and primates: Behavioural function and neurobiological mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, p. 260-268, 2010.

ELLIS, T.; NORTH, B.; SCOTT, A. P.; BROMAGE, N. R.; PORTER, M.; GADD, D. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 493-531, 2002.

ELLIS, T.; YILDIZ, H. Y.; LÓPEZ-OLMEDA, J.; SPEDICATO, M. T.; TORT, L.; ØVERLI, Ø.; MARTINS, C. I. M. Cortisol and finfish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 163-188, 2012.

FERNANDES, M. O.; VOLPATO, G. L. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 2, p. 319–323, 1993.

FIELD, T. Massage therapy for infants and children. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, v. 16, n. 2, p. 105-111, 1995.

FIELD, T.; HERNANDEZ-REIF, M.; DIEGO, M.; SCHANBERG, S.; KUHN, C. Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. **International Journal of Neuroscience**, v. 115, n. 10, p. 1397–1413, 2005.

FROESE, R. Cube law, condition factor and weight–length relationships: History, meta-analysis and recommendations. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 4, p. 241–253, 2006.

GAUY, A. C. S.; BOSCOLO, C. N. P.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Less water renewal reduces effects on social aggression of the cichlid *Pterophyllum scalare*. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 198, p. 121–126, 2018.

GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; BOLOGNESI, M. C.; GAUY, A. C. S.; BRANDÃO, M. L.; GIAQUINTO, P. C.; FERNANDES-CASTILHO, M. Social behavior and welfare in Nile tilapia. **Fishes**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2019.

GREAVES, K.; TUENE, S. The form and context of aggressive behaviour in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Aquaculture**, v.193, p.139-147, 2001.

GRUTTER, S. A. Relationship between cleaning rates and ectoparasite loads in coral reef fishes. **Marine Ecology Progress Series**, v. 118, n. 1-3, p. 51-58, 1995.

HUNTINGFORD, F. A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V. A.; KADRI, S.; POTTINGER, T. G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J. F. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, v. 68, p. 332–372, 2006.

HUNTINGFORD, F.; KADRI, S.; JOBLING, M. Introduction: Aquaculture and Behaviour. In: HUNTINGFORD, F.; JOBLING, M.; KADRI, S. (Eds.), **Aquaculture and Behavior**. Blackwell Publishing Ltd, UK, p. 1-35, 2012.

HUNTINGFORD, F. A.; KADRI, S. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 33, n. 1, p. 233-244, 2014.

IM, H.; KIM, E. Effect of Yakson and Gentle Human Touch versus usual care on urine stress hormones and behaviors in preterm infants: A quasi-experimental study. **International Journal of Nursing Studies**, v. 46, p. 450-458, 2009.

JOHNSSON, J. I.; WINBERG, S.; SLOMAN, K. A. Social interactions. In: SLOMAN, K. A.; WILSON, R. W.; BALSINHE, S. (Eds.), **Behaviour and Physiology of Fish**. Elsevier Academic Press, UK, p. 151-196, 2006.

MARTINS, C. I. M.; GALHARDO, L.; NOBLE, C.; DAMSGÅRD, B.; SPEDICATO, M. T.; ZUPA, W.; BEAUCHAUD, M.; KULCZYKOWSKA, E.; MASSABUAU, J. C.; CARTER, T.; PLANELLAS, S. R.; KRISTIANSEN, T. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 17–41, 2012.

OLIVEIRA, R. F.; HIRSCHENHAUSER, K.; CARNEIRO, L. A.; CANÁRIO, A. V. M. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 132, p. 203–215, 2002.

PROBST, J. K.; NEFF, A. S.; LEIBER, F.; KREUZER, M.; HILLMANN, E. Gentle touching in early life reduces avoidance distance and slaughter stress in beef cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 139, n. 1-2, p. 42-49, 2012.

SILVA, L. P.; SANT'ANNA, A. C.; SILVA, L. C. M.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Long-term effects of good handling practices during the pre-weaning period of

crossbred dairy heifer calves. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 153-162, 2017.

SOARES, M. C.; OLIVEIRA, R. F.; ROS, A. F.H.; GRUTTER, A. S.; BSHARY, R. Tactile stimulation lowers stress in fish. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, 2011.

SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O'CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE, S. J. Stress indicators in fish. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.), **Biology of Stress in Fish**. Elsevier Academic Press, UK, pp. 405-462, 2016.

VOLPATO, G. L.; GIAQUINTO, P. C.; FERNANDES-DE-CASTILHO, M.; BARRETO, R. E.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Animal Welfare: From concepts to reality. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 1, p. 5-15, 2009.

VON KNORRING, A. L.; SÖDERBERG, A.; AUSTIN, L.; UVNÄS-MOBERG, K. Massage decreases aggression in preschool children: A long-term study. **Acta Paediatrica**, v. 97, n. 9, p. 1265–1269, 2008.

WEBSTER, J. Animal welfare: Freedoms, dominions and “a life worth living”. **Animals**, v. 6, n. 35, 2016.

WEI, B.; TAI, F.; LIU, X.; MA, L.; YANG, X.; JIA, R.; ZHANG, X. Neonatal tactile stimulation alleviates the negative effects of neonatal isolation on novel object recognition, sociability and neuroendocrine levels in male adult mandarin voles (*Microtus mandarinus*). **Physiology & Behavior**, v. 112, p. 14-22, 2013.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591–625, 1997.

WINGFIELD, J. C.; HEGNER, R. E.; DUFTY, A. M.; BALL, G. F. The "Challenge Hypothesis": Theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. **The American Naturalist**, v. 136, n. 6, p. 829-846, 1990.