



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Câmpus de São José do Rio Preto

Mariana Helena Baptista Martines

**Testando o efeito da estimulação táctil sobre o comportamento  
agressivo do peixe *Betta splendens***

São José do Rio Preto  
2023

Mariana Helena Baptista Martines

**Testando o efeito da estimulação táctil sobre o comportamento  
agressivo do peixe *Betta splendens***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gonçalves de Freitas

Coorientador: Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina dos Santos Gauy

São José do Rio Preto  
2023

M385t

Martines, Mariana Helena Baptista

Testando o efeito da estimulação táctil sobre o comportamento agressivo do peixe  
*Betta splendens* / Mariana Helena Baptista Martines. -- São José do Rio Preto, 2023  
34 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade  
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José  
do Rio Preto

Orientadora: Eliane Gonçalves de Freitas

Coorientadora: Ana Carolina dos Santos Gauy

1. Bem-estar. 2. Enriquecimento sensorial. 3. Isolamento. 4. Lutas. I. Título.

Mariana Helena Baptista Martines

**Testando o efeito da estimulação táctil sobre o comportamento  
agressivo do peixe *Betta splendens***

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas, junto ao Conselho de Curso de  
Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto  
de Biociências, Letras e Ciências Exatas da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gonçalves de Freitas  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Stela Maioli Castilho Noll  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Dr<sup>a</sup>. Marcela Cesar Bolognesi  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
05 de dezembro de 2023

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais que sempre me dedicaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus amados pais, que nunca mediram esforços para me proporcionar o melhor que podiam.

À minha cara tia Regina, por sempre me encorajar a seguir em frente.

À minha querida avó Helena, a quem homenageia meu segundo nome e me aconselhou a seguir meu coração.

Aos meus amigos, que fizeram desta jornada mais leve e divertida.

À minha orientadora Dra. Eliane Gonçalves de Freitas, por toda paciência e ensinamentos preciosos.

À minha coorientadora Dra. Ana Carolina dos Santos Gauy, por todo apoio, disponibilidade e incentivo.

Às minhas colegas de laboratório Bianca Cambiaghi e Sarah Prado, por toda a ajuda prestada para que esse trabalho fosse possível.

Ao biólogo Carlos Eduardo de Souza, pelo apoio técnico e por toda solicitude.

Ao Ibilce, por sua beleza que sempre nos alegra.

“Andamos crescendo juntos, distraidamente. As árvores crescem conosco. Nossa pele se estende, nosso entendimento, teso, também. O século cresce conosco. O amor pelas ventas da cara do mundo, também.”  
Matilde Campilho (2014)

## RESUMO

Com mais de 31.000 espécies, os peixes apresentam a maior diversidade entre o grupo dos vertebrados e desempenham papéis cruciais na pesca, aquicultura, pesquisa científica e como animais de estimação. O Antropoceno intensifica a preocupação com o impacto das atividades humanas sobre o bem-estar animal, por conseguinte, a estimulação táctil corporal (semelhante a massagens terapêuticas) tem sido utilizada como enriquecimento sensorial para melhorar o bem-estar em teleósteos, pois aumenta a taxa de crescimento, reduz o estresse e a agressividade em algumas espécies. No entanto, as respostas à estimulação podem variar com base no comportamento natural da espécie. O estudo se concentra em *Betta splendens*, o famoso peixe beta, conhecido por seu comportamento agressivo, resultante de seleção artificial. Neste trabalho, foram examinados os efeitos da estimulação táctil prolongada no comportamento agressivo dos peixes beta. Utilizamos um dispositivo feito com estrutura retangular de PVC preenchida por hastes plásticas verticais contendo cerdas de silicone nas laterais. Introduzimos o aparato no centro do aquário. Os peixes receberam estimulação táctil ao atravessarem por entre as cerdas. Um aparato semelhante, mas sem as cerdas, foi utilizado como controle. Machos adultos isolados foram testados em tratamentos com e sem estimulação táctil (N = 10 cada) por 21 dias. A agressividade foi avaliada pelo teste do espelho (10 min) antes e após esse período. Não encontramos diferença significativa entre os tratamentos. Dentro dos tratamentos observamos aumento de exibição lateral nos peixes do grupo com estimulação táctil. Entretanto, observamos aumento da ondulação caudal, redução das mordidas e aumento da latência para o primeiro ataque no grupo sem estimulação. Os resultados sugerem que, ao contrário de outros estudos do mesmo gênero em tilápias, a estimulação táctil não resultou em um impacto significativo na redução da agressividade nos peixes beta. Isso pode estar relacionado ao tempo de estimulação, ao comportamento isolado natural dos bettas e à longa história de seleção artificial para agressividade.

**Palavras-chave:** Bem-estar; enriquecimento sensorial, isolamento, lutas.



## ABSTRACT

With more than 31,000 species, fish have the greatest diversity among the vertebrate group and play crucial roles in fishing, aquaculture, scientific research and as pets. The Anthropocene intensifies concern about the impact of human activities on animal welfare, therefore, tactile body stimulation (similar to therapeutic massages) has been used as sensory enrichment to improve welfare in teleosts, as it increases the rate growth, reduces stress and aggression in some species. However, responses to stimulation may vary based on the species' natural behavior. The study focuses on *Betta splendens*, the famous beta fish, known for its aggressive behavior, resulting from artificial selection. In this work, the effects of prolonged tactile stimulation on the aggressive behavior of beta fish were examined. We used a device made with a rectangular PVC structure filled with vertical plastic rods containing silicone bristles on the sides. We introduce the apparatus in the center of the aquarium. The fish received tactile stimulation as they passed through the bristles. A similar apparatus, but without the bristles, was used as a control. Isolated adult males were tested in treatments with and without tactile stimulation (N = 10 each) for 21 days. Aggressiveness was assessed by the mirror test (10 min) before and after this period. We found no significant difference between treatments. Within the treatments, we observed an increase in lateral display in the fish in the group with tactile stimulation. However, we observed an increase in caudal undulation, a reduction in biting and an increase in the latency to the first attack in the group without stimulation. The results suggest that, unlike other studies of the same genre in tilapia, tactile stimulation did not result in a significant impact on reducing aggression in beta fish. This may be related to stimulation time, the natural isolated behavior of bettas, and the long history of artificial selection for aggression.

**Keywords:** Welfare; Sensory enrichment; Isolation; Fights

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estimuladores tácteis	20
Figura 2 – Número de atravessamentos pelo centro do aquário durante o período de 22 dias de tratamento com estimulação táctil	23
Figura 3 – Comportamentos de exibição	24
Figura 4 – Comportamentos de ataque	24
Figura 5 – Soma comportamentos de exibição, ataque e soma total	25
Figura 6 – Latência do primeiro ataque dos grupos controle e tratamento	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Etograma com os comportamentos exibidos pelos animais durante o teste do espelho (adaptado de Ramos <i>et al.</i> ; 2021)	21
Tabela 2 – Dados das análises ANOVA para modelos mistos e teste Fisher-LSD	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA** Análise de Vicariância

**LSD** Least Significant Difference

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus celsius
<b>mJ</b>	Milijoule
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro cuadrado
<b>s</b>	Segundo
<b>cm</b>	Centímetro
<b>mg</b>	Miligramma
<b>min</b>	Minutos
<b>mm</b>	Milímetros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
2.1.	Aclimatação dos Animais	18
2.2.	Delineamento experimental	18
2.3.	Biometria	19
2.4.	Realocação para Aquários Individuais	19
2.5.	Estimulação táctil	19
2.6.	Interações agressivas	20
2.7.	Análise de dados	21
2.8.	Princípios éticos	22
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Embora hoje se saiba que não se trata de um grupo monofilético, os peixes possuem a maior diversidade de espécies entre o grupo dos vertebrados, contando com mais de 31.000 espécies, um número maior do que todos os outros grupos de vertebrados em conjunto (Bemvenuti & Fischer, 2010). Os peixes são animais amplamente utilizados em áreas distintas, seja em pesca e aquicultura, na investigação científica, ou ainda como animais ornamentais (Pedrazzani *et al.*; 2007).

A era do Antropoceno traz consigo uma preocupação de grande relevância: o impacto das atividades humanas no bem-estar dos animais. Este impacto abrange uma variedade de contextos, desde a criação de animais em ambientes artificiais para fins que vão desde a investigação científica até a pecuária. O debate sobre o bem-estar animal é notável por sua diversidade e abordagem multidisciplinar, conforme destacado por Gauy (2022). O estudo de Broom e Molento (2004) evidencia essa ênfase na criação intensiva de animais como ponto de partida para a discussão do bem-estar animal.

O tema do bem-estar animal é abrangente, abordando uma gama diversificada de espécies e contextos, desde animais de estimação até aqueles utilizados em pesquisa e produção de alimentos. Segundo Duncan e Fraser (1997) o bem-estar animal refere-se à sua qualidade de vida. Na atualidade, faz-se necessário encontrar um equilíbrio entre as necessidades humanas e o respeito pelos direitos dos animais. O crescente interesse sobre esse tópico se manifesta tanto naqueles que estão envolvidos com a prática, como o cultivo, como naqueles que se dedicam à pesquisa em peixes (Vaz *et al.*, 2007).

Para abordar questões de bem-estar em peixes, é necessário que primeiro possamos compreender suas capacidades de perceber sensações, tais como dor, desconforto, frio, calor e a habilidade consciente de distinguir estados internos como "agradável ou desagradável" (Volpato, Gonçalves-de-Freitas & Fernandes-Castilho, 2007), a esta última, damos o nome de *senciência*. Além disso, os peixes têm a capacidade de adquirir informações de eventos externos nos quais não estão diretamente envolvidos através da aprendizagem observacional, e podem aplicar essas informações para guiar seu comportamento futuro, como demonstrado por Oliveira, McGregor e Latruffe, (1998). Tais informações atestam, portanto, que os peixes possuem capacidade de escolha.

A estimulação táctil é uma alternativa que tem sido utilizada para melhorar o bem-estar dos animais e tem se mostrado eficiente (Gauy, 2021). Embora a percepção táctil seja frequentemente associada a mamíferos no geral, os peixes também possuem sistemas sensoriais complexos que permitem detectar e responder aos estímulos táteis no ambiente aquático. Os peixes são capazes de detectar o fluxo de corrente usando um sistema mecanossensorial chamado linha lateral, esse sistema, encontrado em todos os peixes, apresenta receptores denominados neuromastos (Montgomery, Baker & Carton, 1997). A estimulação táctil é uma forma de estímulo mecânico que é transmitida por células sensoriais até a medula espinhal e interpretada nas regiões cerebrais do sistema nervoso central (Gauy, Bolognesi & Gonçalves-de-Freitas, 2022).

Os estímulos tácteis são parte integrante do ambiente aquático típico, provenientes em grande parte dos movimentos da água induzidos pelas correntes ou por peixes próximos (Schirmer, Jesuthasan & Mathuru, 2013). Grande parte das respostas positivas à estimulação táctil está associada ao repertório comportamental natural dos animais (Gauy, Bolognesi & Gonçalves-de-Freitas, 2019), como as interações limpador-cliente entre peixes de recifes de coral (Soares *et al.*; 2011). Nesse estudo de Soares *et al.* (2011), foi observado que os peixes cirurgiões (*Ctenochaetus striatus*), tratados como peixes clientes, procuram ativamente a estimulação tátil oferecida por um modelo conhecido por peixe limpador, o bodião-limpador (*Labroides dimidiatus*). Além disso, observou-se que essa forma de estimulação contribuiu para a redução dos níveis de cortisol nos peixes clientes após serem submetidos ao estresse do confinamento. Outros estudos, como o de Gauy (2021) observaram a diminuição da agressividade em tilápias-do-nilo que passaram pela estimulação táctil, atestando que esse estímulo também favoreceu o crescimento e a eficiência alimentar desses animais. Portanto, a estimulação táctil pode ser denominada um comportamento sócio-positivo interespecífico (Bshary & Würth, 2001) e pode ser usada artificialmente como um instrumento para aumentar o bem-estar dos peixes, ao mesmo tempo que melhora o desempenho produtivo (Gauy, 2021).

Os peixes beta (*Betta splendens*, Regan, 1910), também conhecidos por “peixe de briga siamês” são peixes teleósteos pertencentes à ordem Anabantiformes e à família Osphronemidae. Esses animais possuem origem no sudeste asiático (Welcomme, 1988) e sua domesticação teve início por volta de 2000 anos atrás, nessa mesma região (Kwon *et al.*, 2022). Em vida selvagem, costumam habitar águas rasas



e calmas, geralmente com uma vegetação densa que os proporcione abrigo e proteção (Jaroensutasinee & Jaroensutasinee, 2001). Similar a outros peixes Anabantiformes, os *B. splendens* possuem a capacidade de realizar respiração aérea devido à presença de órgãos acessórios, como o labirinto (Tate *et al.*, 2017), esse órgão é o que permite ao beta viver em águas com baixa concentração de oxigênio dissolvido (Goldstein, 2004).

Os peixes beta foram submetidos a vários anos de seleção artificial em ambientes de cativeiro (Smith, 1945), isso resultou na ampla variedade de colorações que apresentam atualmente, um contraste marcante em relação às espécies selvagens, que tendem a exibir cores mais discretas e tamanhos menores (Faria *et al.*, 2006). Além da diversidade de colorações, a cauda dos betas também passou pelo processo de seleção artificial, resultando em diversas e variadas formas de cauda hoje encontradas no mercado de aquarismo (Kida, 2022). No entanto, além de cores mais vibrantes e caudas mais exuberantes, a seleção artificial acabou resultando também na modificação do comportamento agressivo e das respostas fisiológicas de *B. splendens* (Ramos & Gonçalves, 2019).

Os peixes beta são uma das espécies de peixes ornamentais mais populares do mundo e são, frequentemente, reconhecidos pela agressividade entre indivíduos da mesma espécie (Oliveira *et al.*; 2022). Dado isso, esses animais são tidos como um bom modelo para estudos comportamentais que visam estudar a agressividade (Ramos *et al.*; 2021). Quando confrontado com um macho oponente, alguns dos comportamentos que podem ser exibidos por um beta macho são a extensão de suas nadadeiras, a abertura do opérculo e movimentos laterais de batida da cauda (Lichak *et al.*; 2022). Esses comportamentos são conhecidos como "exibição frontal", "exibição opercular" e "batida caudal", respectivamente. Além disso, a agressão do macho pode ser provocada ao permitir que os peixes vejam seu próprio reflexo em um espelho (Lichak *et al.*; 2022).

A agressividade entre machos da mesma espécie é um comportamento adaptativo que desempenha um papel importante no estabelecimento de hierarquias sociais, influenciando o acesso a recursos alimentares, a conquista de parceiros sexuais e a defesa da prole (Krebs & Davies, 1996). Entretanto, frequentemente, a agressão está ligada a níveis de estresse, o que pode ter um impacto negativo no desempenho individual (Moberg & Folke, 1999). As interações territoriais requerem um grande gasto de energia, e, frequentemente, resultam em danos tanto para os

vencedores quanto para os perdedores (Butler & Marusaka, 2016). Além disso, o estresse em níveis não naturais pode causar impacto no crescimento e na alimentação dos peixes (Gauy, Bolognesi & Gonçalves-de-Freitas, 2022).

A estimulação táctil, por outro lado, é fortemente reconhecida pela sua capacidade de causar uma diminuição do estresse, um dos fatores que estão intimamente ligados com a agressividade. Em humanos, a estimulação táctil pode ser tida como o que conhecemos por massagem terapêutica (Gauy, Bolognesi & Gonçalves-de-Freitas, 2022), podendo levar a diminuição do estresse, melhora nas respostas imunológicas e elevação dos níveis de serotonina (Field *et al.*; 2005). A estimulação táctil corporal representa também um tipo de enriquecimento sensorial, agindo no melhoramento da cognição e adaptabilidade a novas situações, como um ambiente artificial (Näslund e Johnsson, 2016).

Vários estudos demonstraram os efeitos positivos da estimulação táctil em mamíferos, como por exemplo, em leitões (Tallet *et al.*, 2014), cordeiros (Coulon *et al.*, 2015) e em bovinos (Probst *et al.*, 2012). Além disso, este efeito positivo ocorre em peixes teleósteos cooperativos, como verificado por Soares *et al.* (2011). Tendo em vista esses dados, podemos inferir que as respostas positivas à estimulação táctil podem estar associadas ao repertório comportamental natural dos animais. Todavia, vários estímulos tácteis são naturalmente negativos, como aqueles resultantes de interações agonísticas, que podem causar lesões, dor e estresse social (Damsgard & Huntingford, 2012). Nesse contexto, a estimulação táctil pode ter um significado diferente para animais cujo comportamento natural envolve confrontos agressivos, como, por exemplo, animais que lutam para proteger seu território (Bolognesi, 2017).

Este estudo teve como objetivo testar se a estimulação táctil a longo prazo tem um efeito positivo na diminuição do comportamento agressivo de *Betta splendens*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para cumprir com o objetivo, foram avaliados dois grupos de peixes machos (controle e tratamento), submetendo um dos grupos a estimulação usando um dispositivo especialmente desenvolvido para esse fim. Os peixes foram direcionados a passar pelo dispositivo de estimulação táctil para acessar o alimento, que era depositado no lado oposto ao qual os peixes se encontravam no aquário no horário

da alimentação. Isso foi feito com a expectativa de que, se a estimulação táctil tivesse um efeito redutor no estresse, os peixes demonstrariam um aumento na busca por esses estímulos, o que seria visto durante os períodos de filmagem dos animais, que eram realizadas duas vezes ao dia.

Os comportamentos agressivos de *Betta splendens* foram identificados por meio da criação de um etograma adaptado de Ramos *et al.*; 2021 (Tabela 1). Isso permitiu a caracterização dos comportamentos exibidos, auxiliando na identificação dos movimentos observados durante o teste do espelho. O teste do espelho foi escolhido devido a dados que demonstram que para investigar aspectos comportamentais ou fisiológicos da agressão, o teste do espelho pode ser adequado em espécies que respondem significativamente a esses tipos de estímulos (Ramos *et al.*; 2021), como é o caso dos peixes beta.

## **2.1. Aclimação dos Animais**

No início do experimento, 20 animais foram submetidos a um período de sete dias de aclimação. Os animais foram alojados separadamente em aquários individuais de policarbonato com um volume de 10 litros. Os aquários faziam parte do sistema Rack Zebrafish ALTAMAR. Durante a aclimação, os animais foram mantidos a uma temperatura de 28°C e não tiveram contato visual com animais de aquários vizinhos. Cada aquário estava equipado com um filtro autolimpante e um sistema de desinfecção que garantia uma dose superior a 60 mJ/cm<sup>2</sup>/s de radiação ultravioleta. Além disso, os aquários foram submetidos a trocas de água automáticas regulares. Durante o período de aclimação, os animais foram alimentados duas vezes ao dia com uma porção de ração em cada refeição. Cada porção equivale a três grãos de ração comercial específica para *B. splendens*.

## **2.2. Delineamento Experimental**

Para cumprir com o objetivo, foram avaliados dois grupos de peixes machos um sem e outro com estimulação táctil, utilizando um dispositivo especialmente desenvolvido para esse fim. A agressividade dos animais foi testada por meio de teste do espelho, um dia antes e após 21 dias de estimulação táctil.

### **2.3. Biometria**

Após a semana de aclimação, foi realizada a seleção e biometria dos animais, iniciando, então, o primeiro dia de experimento. Nesse processo, o comprimento e o peso de cada peixe foram medidos. Além disso, as características de cor dos animais foram registradas.

### **2.4. Realocação para Aquários Individuais**

Após a biometria, os animais foram realocados para aquários individuais de 96 litros (40x40x60cm). Cada aquário foi preenchido com substrato de cascalho e mantido a uma temperatura constante de 28°C. A água foi mantida até a metade da altura dos aquários (20 centímetros). Os animais permaneceram em seus respectivos aquários por um período de 24 dias, onde recebiam alimentação e eram filmados duas vezes ao dia. Ao final do experimento, no vigésimo quinto dia, os animais foram realocados para aquários onde ocorreram as lutas com seus oponentes reais (tratamento versus tratamento; controle versus controle). Após o término das lutas, que tiveram um total de 20 minutos cada, os animais eram retirados e colocados em baldes contendo uma solução de 0,32mg de benzocaína diluída em um litro de água, dose necessária para que ocorresse a eutanásia dos animais. Feito isso, cada animal foi submetido novamente ao processo de biometria, onde foram mensuradas alterações em seu comprimento e peso, e em seguida, foram coletados os materiais necessários para a pesquisa.

Neste trabalho, as lutas com os oponentes reais não foram avaliadas. Foram quantificados apenas os comportamentos exibidos durante os 10 minutos de gravação do teste do espelho.

### **2.5. Estimulação Táctil**

Os animais do grupo controle foram alojados em aquários com um aparelho de estimulação formado por uma estrutura retangular de policloreto de vinila, equipada com bastões plásticos verticais (Figura 1 - a). Por outro lado, os animais do grupo tratamento foram alojados em aquários com um aparato de estimulação constituído pela mesma estrutura retangular de policloreto de vinila, equipada com bastões plásticos verticais com a adição de cerdas macias de silicone nas laterais (Figura 1 - b). As cerdas de silicone foram projetadas para tocar e estimular sensorialmente os animais quando eles se moviam de um lado para outro nos aquários. A oferta da ração

era realizada do lado oposto ao que os animais se encontravam, com o intuito de estimular a passagem pelo aparato. Os animais eram filmados durante 30 minutos, sendo divididos em 10 minutos antes, durante e após a alimentação. Este procedimento foi conduzido com o intuito de avaliar os efeitos da estimulação tátil nas respostas comportamentais dos animais dos grupos controle e tratamento.

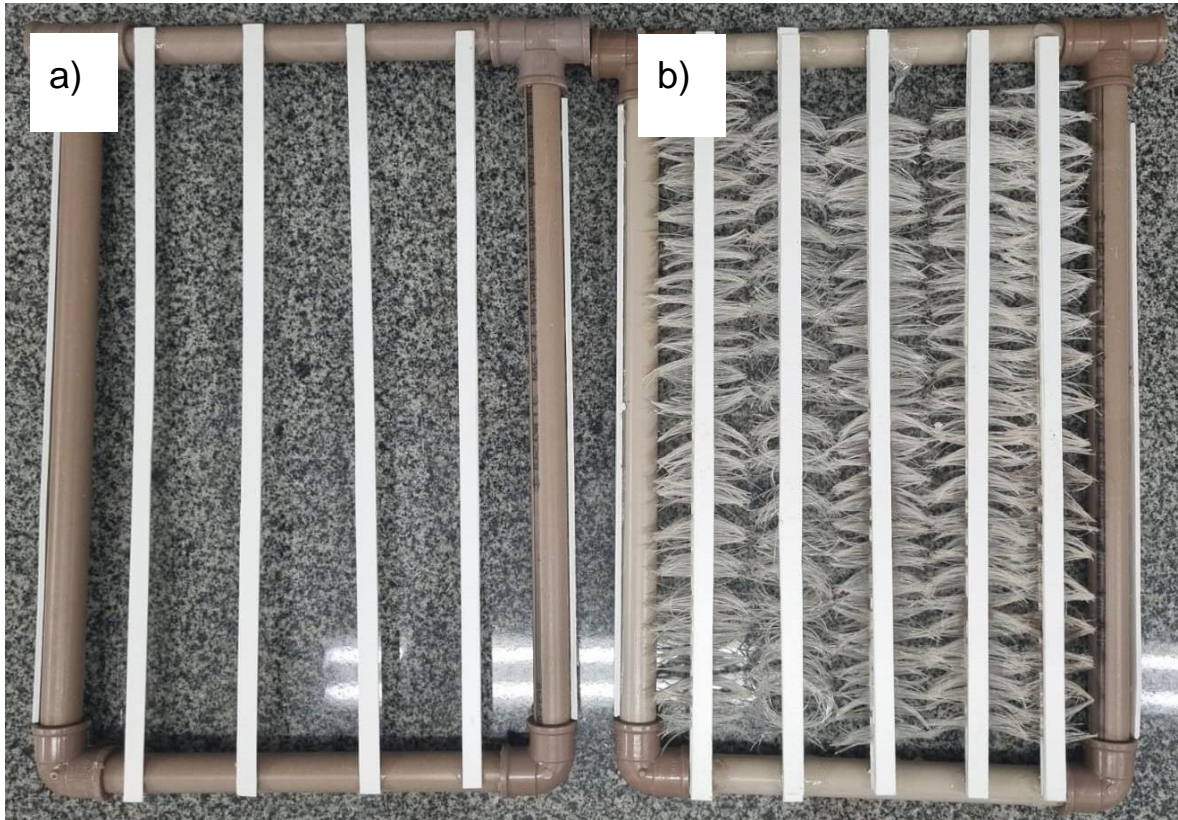


Figura 1: Estimuladores tácteis - a) Aparelho de estimulação táctil controle (altura 41cm; largura 28 cm; distância entre as hastes 5cm); b) Aparelho de estimulação táctil tratamento (altura 41cm; largura 28 cm; distância entre as hastes 2mm).

## 2.6. Interações agressivas

Os comportamentos agressivos de *Betta splendens* foram identificados por meio da criação de um etograma adaptado de Ramos *et al.*; 2021 (Tabela 1). Isso permitiu a caracterização dos comportamentos exibidos, auxiliando na identificação dos movimentos observados durante o teste do espelho. O teste do espelho foi escolhido devido a dados que demonstram que para investigar aspectos comportamentais ou fisiológicos da agressão, o teste do espelho pode ser adequado em espécies que respondem significativamente a esses tipos de estímulos (Ramos *et al.*; 2021), como é o caso dos peixes beta.

Tabela 1: etograma com os comportamentos exibidos pelos animais durante o teste do espelho (adaptado de Ramos *et al.*; 2021)

<b>Comportamento</b>	<b>Descrição</b>
<i>Comportamentos de ameaça</i>	
Exibição lateral	Abertura do opérculo e da membrana branquiostegal associada a extensão total das nadadeiras, enquanto se posiciona lateralmente ao espelho
Exibição frontal	Encara o espelho frontalmente abrindo o opérculo, a membrana branquiostegal e toda extensão de suas nadadeiras
Ondulação caudal	Ondulação da nadadeira caudal em direção ao seu reflexo no espelho
<i>Comportamentos de ataque</i>	
Mordidas	Intensivamente tenta morder seu reflexo
Batida caudal	Bate sua nadadeira caudal contra seu reflexo
<i>Comportamentos de atividade</i>	
Respiração	O peixe nada até a superfície para respirar

## 2.7. Análise de dados

Os dados foram avaliados quanto à normalidade por teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade por teste de F-Max (Ha & Ha, 2011). As variáveis operacionais avaliadas foram analisadas da seguinte maneira:

- Frequência de atravessamentos pelo estimulador – Somamos a frequência de atravessamentos nos 10 min antes e nos 10 min após a alimentação, manhã e tarde. Não consideramos os 10 min da alimentação para evitar vieses nas análises. Em seguida, a frequência (40 min/dia) foi analisada por ANOVA para modelos mistos, sendo os tratamentos as variáveis categóricas e, os dias de registro, as variáveis repetidas.
- Frequência de unidades agressivas foi transformada por  $\log(x+1)$  para ajuste à normalidade. Utilizamos ANOVA para modelos mistos, considerando os tratamentos

com e sem estimulação como variáveis categóricas, e a frequência de agressividade como variável repetida.

- Latência para o primeiro ataque ao espelho – Também foi avaliada por ANOVA para modelos mistos, após transformação por  $\log(x+1)$ .

Em todos os casos, utilizamos o teste de Fisher-LSD para comparações múltiplas. Utilizamos  $p < 0,05$  para estabelecer diferença estatística significativa.

## 2.8. Princípios éticos

Este estudo seguiu a legislação brasileira e as regulamentações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/Brasil), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, processo nº 246/2023.

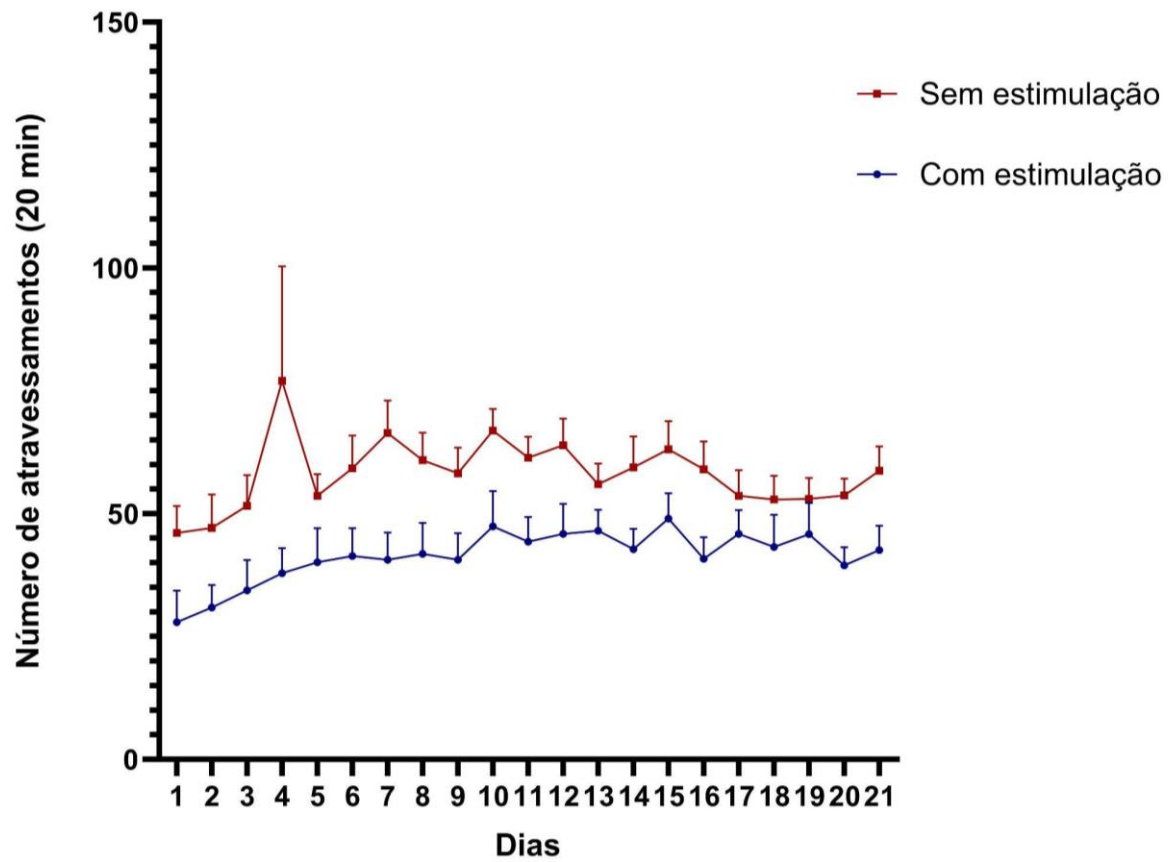
## 3 RESULTADOS

Todos os animais atravessaram pelo estimulador. Após a soma dos atravessamentos antes e após a alimentação, manhã e tarde, constatamos que os animais do grupo controle passaram mais vezes pelo estimulador do que o grupo com estimulação ( $F_{(1,18)} = 6,30$ ,  $P = 0,02$ ; Fig 2). Também encontramos diferença significativa entre os dias registrados ( $F_{(1,20)} = 2,72$ ,  $P = 0,0001$ ). No grupo controle, os atravessamentos tiveram um aumento significativo a partir do quarto dia ( $P = 0,00001$ ) e no grupo com estimulação, a partir do sexto dia ( $P = 0,03$ ).

Não foram encontradas diferenças significativas em todas as comparações realizadas (Tab. 2). No entanto, foram encontradas algumas diferenças dentro dos tratamentos. Não houve diferença na exibição frontal (Fig 3A), mas a ameaça lateral aumentou nos animais que receberam estimulação tátil (Fig. 3 B) e a ondulação caudal aumentou no controle (Fig. 3C). As mordidas reduziram no controle (Fig. 4A) e a batida de cauda foi semelhante dentro dos tratamentos (Fig. 4B). As somas das exibições de ameaça, ataques e a soma total das unidades agressivas não apresentaram diferenças significativas nem entre e nem dentro dos tratamentos (Fig. 5A-C).

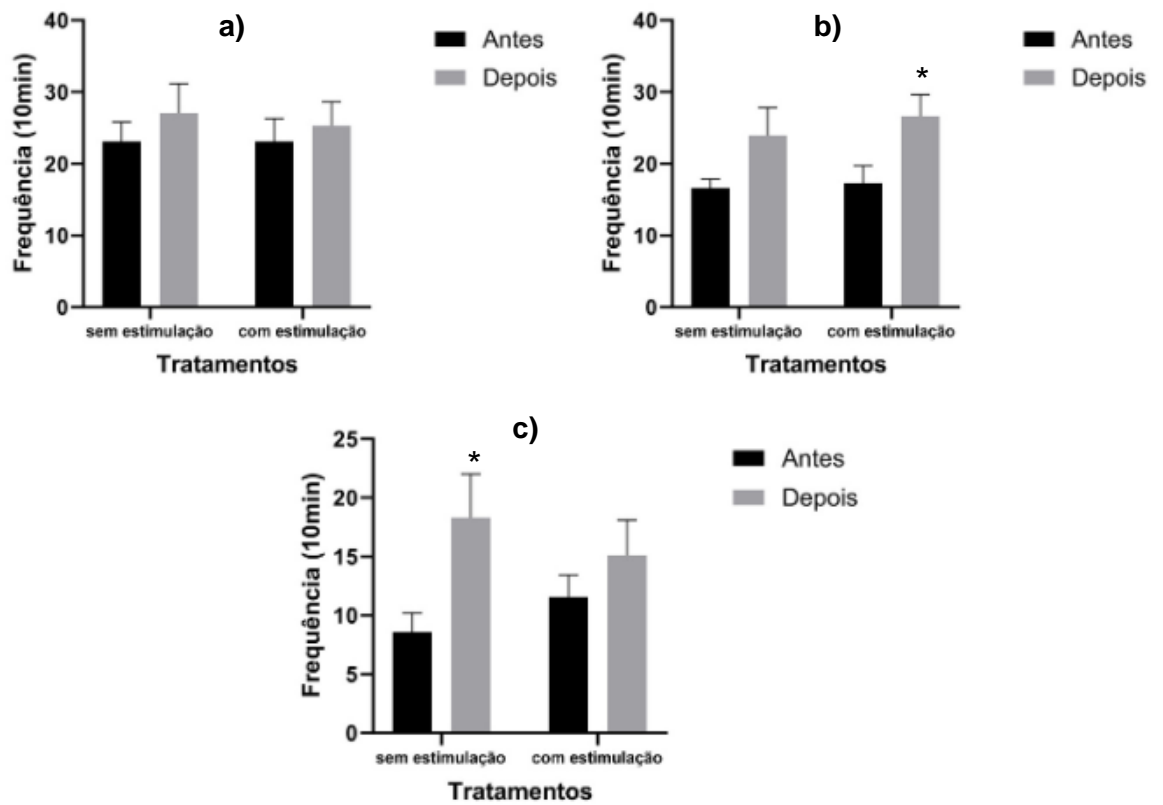
A latência para o primeiro ataque contra o espelho também foi semelhante entre os tratamentos, mas reduziu no tratamento sem estimulação (Fig. 6). Os eventos de

respiração também foram semelhantes entre e dentro dos tratamentos (respectivamente:  $F_{(1,18)} = 0,0017$ ,  $p = 0,97$ ;  $F_{(1,18)} = 0,018$ ,  $p = 0,89$ ).

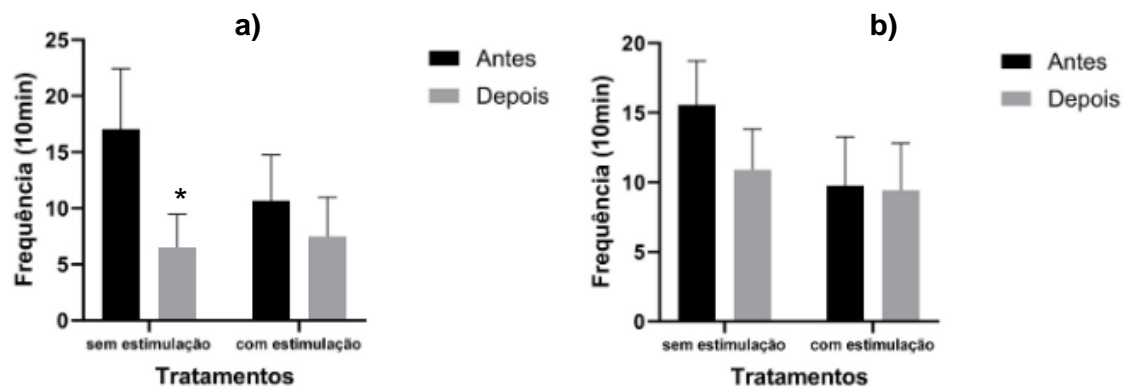


**Figura 2.** Número de atravessamentos pelo aparato nos tratamentos com ou sem cerdas para estimulação durante o período de 21 dias. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

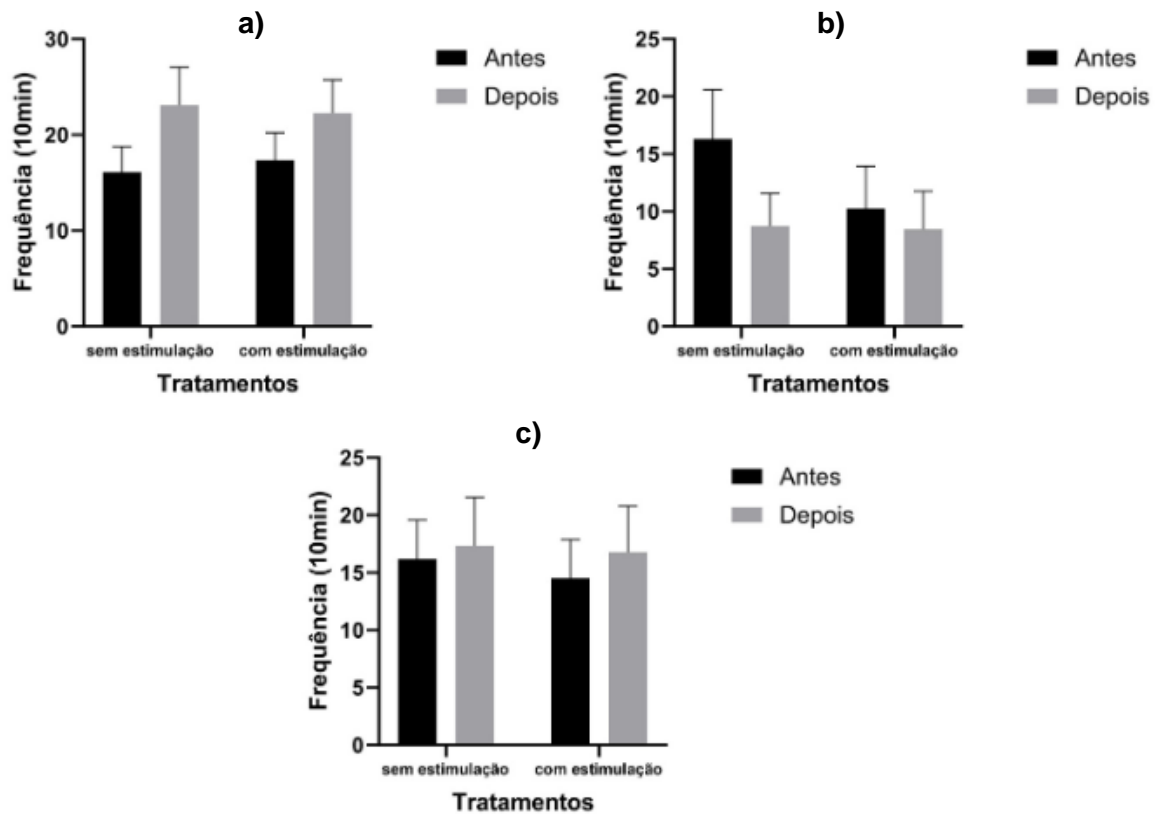




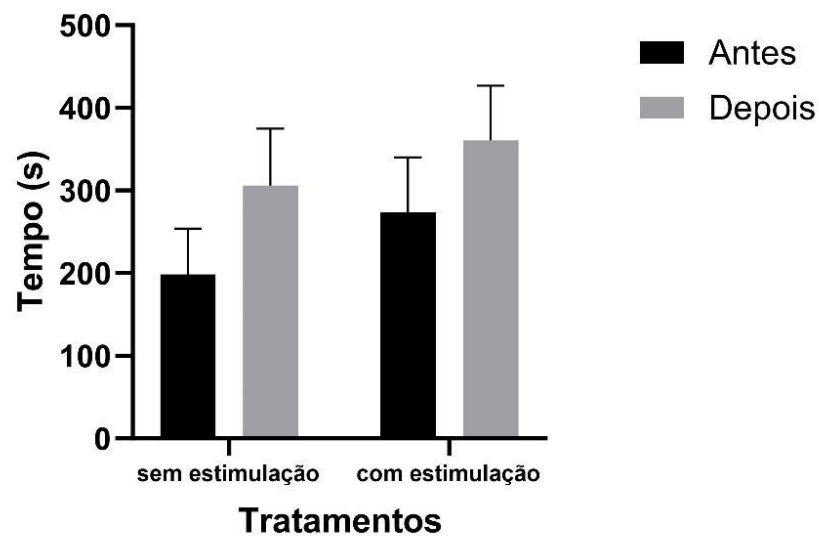
**Figura 3.** Comportamentos de exibição - a) exibição frontal; b) exibição lateral; c) ondulação caudal. O asterisco indica diferenças significativas dentro dos tratamentos após teste de Fisher-LSD. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.



**Figura 4.** Comportamentos de ataque - a) mordidas; b) batida caudal. O asterisco indica diferenças significativas dentro dos tratamentos após teste de Fisher-LSD. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.



**Figura 5.** Soma dos comportamentos de exibição, ataque e soma total - a) soma dos comportamentos de ameaça frontal, lateral e ondulação caudal; b) soma dos comportamentos de ataque mordidas e batidas de cauda; c) soma de todos os comportamentos exibidos. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 6.** Latência do primeiro ataque entre os grupos controle e tratamento. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

**Tabela 2:** Análise estatística das unidades comportamentais agressivas. Dados das análises ANOVA para modelos mistos completada por teste Fisher -LSD.

Unidade comportamental	Com vs. Sem estimulação táctil		Antes e Depois da estimulação		Fisher LSD: valores de P dentro dos tratamentos	
	F (1,18)	P	F (1,18)	P	P sem Estimulação	P Com Estimulação
Exibição frontal	0,04	0,85	2,70	0,12	-	-
Exibição lateral	0,19	0,67	10,82	0,004	0,06	0,016
Ondulação caudal	0,009	0,93	8,85	0,008	0,001	0,20
Mordidas	0,15	0,70	3,67	0,07	-	-
Batida caudal	0,85	0,37	0,25	0,62	-	-
Soma das exibições de ameaça	0,0003	0,1	4,62	0,04	0,15	0,14
Soma dos ataques	0,60	0,45	1,14	0,30	-	-
Soma dos comportamentos	0,04	0,83	3,42	0,08	-	-
Latência	2,52	0,13	5,20	0,03	0,016	0,57

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo testamos a hipótese de que a estimulação táctil corporal reduziria as interações agressivas do peixe beta. No entanto, observamos apenas alguns efeitos dentro de cada grupo, principalmente nas exposições de ameaça.

O protocolo e os aparatos utilizados foram semelhantes aos utilizados por Bolognesi *et al.*, 2019; Gauy *et al.*, 2021; 2022) para a tilápia-do-Nilo. Como não há outros trabalhos com o mesmo protocolo, a maior parte de nossas comparações só podem ser feitas com a tilápia. Ao contrário da tilápia-do-nilo, o Beta atravessa com elevada frequência já no primeiro dia com os aparatos. Provavelmente se ajustam mais rápido a situações novas no aquário, sem responder ao aparato como objeto novo (e.g. Bolognesi *et al.*, 2019). Ao longo do período de estudo, os machos isolados de beta apresentaram uma elevada frequência de atravessamentos pelo estimulador quando comparado às tilápias isoladas (Bolognesi *et al.*, 2019). Essa atividade pode ser explicada pelo fato dos machos de Beta serem mantidos constantemente isolados, como orientam as recomendações (Iwata *et al.*, 2021). Dessa forma, o isolamento parece afetar menos a exploração do ambiente nessa espécie.

Apesar do Beta atravessar com maior frequência pelo aparato sem as cerdas de silicone, o estimulador não afetou a liberdade do peixe nadar e explorar o ambiente. Além disso, a estimulação táctil parecia ser suave o suficiente para evitar lesões corporais ou perda de escamas. Além disso, a elevada frequência de atravessamentos no grupo com estimulação sugere que o aparato não é aversivo para *Betta splendens*. Portanto, nosso protocolo é adequado para testar várias hipóteses a respeito da estimulação táctil nessa espécie.

Testes de espelhos têm sido utilizados para avaliar a agressividade individual em várias espécies de peixes (Barreto *et al.*, 2009), incluindo o *B. splendens* (Ramos *et al.*, 2021; Oliveria *et al.*, 2022). Apesar de algumas críticas relacionadas à ausência de sinais específicos nas lutas, já foi observado ao menos para uma espécie que não há diferença na motivação agressiva quando um ciclídeo macho encontra um co-específico ou sua própria imagem no espelho (Reddon *et al.*, 2012). Quando um peixe luta com outro, o comportamento de um indivíduo depende do que o outro faz (Reddon *et al.*, 2012). Assim, a vantagem do uso do espelho é o controle do “oponente virtual” e, dessa forma, os resultados são atribuídos apenas ao comportamento do indivíduo focal.

Os resultados demonstram que a estimulação táctil nos peixes beta não foi tão eficaz na diminuição do comportamento agressivo como o que foi observado nas tilápias do Nilo por Gauy, Bolognesi & Gonçalves-de-Freitas (2019), no qual os animais que receberam a estimulação apresentaram mais exhibições de ameaça e menos ataques. Apesar disso, nossos resultados mostraram que os peixes que receberam estimulação táctil apresentaram mais comportamentos de exibição lateral, o que indica uma postura mais cautelosa, com maior frequência de avaliação do oponente, antes de iniciar lutas físicas (Ramos *et al.*, 2021). Por outro lado, a ondulação caudal (outro comportamento de avaliação) aumentou nos animais do grupo sem estimulação, enquanto as mordidas diminuiram. Isso era esperado para os animais que receberam estimulação táctil. Somamos a isso, o fato da latência para o primeiro ataque ter aumentado no grupo sem estimulação. O aumento da latência indica menor motivação para lutar (Gonçalves-de-Freitas *et al.* (2014), demonstrando que algumas unidades agressivas podem estar associadas ao tempo de isolamento.

Uma das causas que podemos inferir para explicar o que houve com os peixes betta é o tempo de estimulação, para as tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), 21 dias de tratamento foram suficientes para que se pudesse observar diminuição na agressividade, entretanto, para *B. splendens*, talvez seja necessário que o tempo de estimulação táctil seja maior. Outro fato que pode ter influenciado para que a resposta das tilápias à estimulação táctil fosse positiva está no comportamento de corte desses animais, no qual os indivíduos exibem um comportamento ondulatório no sentido ântero-posterior antes de se acasalar (Neves, 2018), o que pode causar uma sensação semelhante à da estimulação, sendo esta presente em seu comportamento natural.

Além do mais, a tilápia-do-nilo é uma espécie pertencente à família dos ciclídeos (Cichlidae), uma família de peixes comumente conhecida por seu rico repertório de comportamento social (Gonçalves-de-Freitas, 2019). Esse fato pode ocasionar no contato com formas de estimulação táctil naturais, tornando-as mais familiarizadas com esses estímulos. As tilápias são peixes que apresentam interação social coespecífica, como a formação de hierarquias (Gonçalves-de-Freitas, 2019), ao contrário dos peixes beta, que são animais que costumam majoritariamente viver de maneira isolada, sendo altamente territorialistas (Iwata *et al.*, 2021). O isolamento social poderia, portanto, reduzir os efeitos da estimulação táctil devido à falta de contato físico com outros coespecíficos em *B. splendens*.

Outra causa possível para tais resultados está na intensa seleção artificial pela qual os peixes beta passaram. Os peixes beta possuem uma longa história de seleção artificial: registros datam que esses animais já estariam sendo cultivados para agressão, a fim de serem usados em lutas clandestinas há 600 anos (Sermwatanakul, 2019). Posteriormente, os peixes beta também foram submetidos a processos de seleção com foco no tamanho corporal, morfologia das nadadeiras, dimensões da boca e espessura das escamas (Srikulnath *et al.*, 2021). Essa seleção a longo prazo, com o cruzamento entre diferentes linhagens, aprimorou seu comportamento agressivo (Witte & Schmidt, 1992). Portanto, o que pode ser feito para que os peixes beta apresentem uma diminuição verdadeiramente significativa em seu comportamento agressivo é aumentar o número de dias em que os animais sejam submetidos a estimulação, uma vez que demonstraram ser mais resistentes aos efeitos positivos da estimulação tátil.

Em vista disso, podemos concluir que os dados mostraram ausência de efeito da estimulação tátil sobre a agressividade em *B. splendens*, ao menos no que se diz sobre a agressividade direcionada à imagem no espelho e na quantidade de dias no qual receberam a estimulação. Mais estudos serão desenvolvidos para testar o efeito da estimulação tátil frente a um oponente real (em duplas) e com um maior número de réplicas.

## REFERÊNCIAS

- BARRETO, R. E. *et al.* Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 42(2), 109-118, 2009.
- BEMVENUTI, M.A. & FISCHER, L.G. Cadernos de Ecologia Aquática 5 (2) :31-54, ago – dez, 2010.
- BOLOGNESI, M. C. Effect of tactile stimulation in a territorial fish. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - São José do Rio Preto, 2017.
- BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – Revisão. *Archives of Veterinary Science*, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- BSHARY, R. & WÜRTH, M. Cleaner fish *Labroides dimidiatus* manipulate client reef fish by providing tactile stimulation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 268, n. 1475, p. 1495-1501, 2001.
- BUTLER, J.M. & MARUSAKA, K.P. Mechanosensory signaling as a potential mode of communication during social interactions in fishes. *J. Exp. Biol.* 219 , 2781–2789 (2016).
- CAMPILHO, M. Fevereiro – Jóquei. Lisboa, Tinta-da-China, 2014.
- COULON, M. *et al.* Do lambs perceive regular human stroking as pleasant? Behavior and heart rate variability analyses. *Plos One*, v. 10, 2015.
- DAMSGÅRD, B.; HUNTINGFORD, F. Fighting and aggression. In: HUNTINGFORD, F., JOBLING, M., KADRI, S. (Eds.). *Aquaculture and Behavior*. Oxford: Willey-Blackwell, p. 248-285, 2012.
- DUNCAN, I.J.H.; FRASER, D.; 1997. Understanding animal welfare. In: Appleby, M.C., Hughes, B.O. (Eds.), *Animal Welfare*, CAB International. University Press, Cambridge, pp. 19–31.
- FARIA, P. M. C.; *et al.* Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens* (Regan 1910). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p.134-149, jul/dez. 2006.
- FIELD, T. *et al.* Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. *International Journal of Neuroscience*, 115(10), 1397–1413, 2005.

- GAUY, A. C. S. Efeito da estimulação táctil de longo prazo sobre o bem-estar da tilápia-do-nilo. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura - Jaboticabal, 2021.
- GAUY, A.C.S.; BOLOGNESI, M.C. & GONÇALVES-DE-FREITAS, E. Long-term body tactile stimulation reduces aggression and improves productive performance in Nile tilapia groups. *Sci Rep* 12, 20239 (2022).
- GOLDSTEIN, R. J. The Betta Handbook. Barrons educational series Inc., New York, 2004.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; *et al.* Social Behavior and Welfare in Nile Tilapia. *Fishes* - 4, 23 - 2019.
- GONÇALVES-DE-FREITAS, E., CARVALHO, T. B., & OLIVEIRA, R. F. Photoperiod modulation of aggressive behavior is independent of androgens in a tropical cichlid fish. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 41-49, 2014.
- HA, R. R. & HA, J. C. *Integrative Statistics for the Social and Behavioral Sciences* (Sage, 2011).
- IWATA, E. *et al.* Timing of isolation from an enriched environment determines the level of aggressive behavior and sexual maturity in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *BMC Zool* 6, 15 (2021).
- JAROENSUTASINEE, M.; JAROENSUTANSINEE, K. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *Journal of Fish Biology*, v. 58, n. 5, p. 1311-1319, 2001.
- KWON, Y. M. *et al.* Genomic consequences of domestication of the Siamese fighting fish. *Science Advances* - Vol 8, Issue 10. 2022.
- KIDA, V. R. Caracterização de processos patológicos que acometem peixes-de-briga-Siamês (*Betta splendens*) no estado de São Paulo. São Paulo, 2022.
- LICHAK, M. R.; *et al.* Care and Use of Siamese Fighting Fish (*Betta Splendens*) for Research. *Comp Med*. Jun, 2022.
- MOBERG, F. & FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics*, vol. 29, issue 2, 215-233, 1999.
- MONTGOMERY, J. C.; BAKER, C. F. & CARTON, A. G. The lateral line can mediate rheotaxis in fish. *Nature* - Vol 389 – October, 1997.
- NASLUND, J.; JOHNSON, J.I. Environmental enrichment for fish in captive environments: Effects of physical structures and substrates. *Fish Fish*, 17, 1–30. 2016.



- NEVES, B. M. S. P. Relação macho e fêmea e a presença de substrato no comportamento reprodutivo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Universidade Federal de Lavras, 2018.
- OLIVEIRA, J. A. *et al.* Oxytocin reduces the frequency of aggressive behaviours in male betta fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, Vol 200, August 2022.
- OLIVEIRA, R.F.; MCGREGOR, P.K.; LATRUFFE, C. Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proc Biol Sci* – 265 (1401):1045–1049, 1998.
- PEDRAZZANI, A. S. *et al.*; Fish welfare and the problem of sentience. *Archives of Veterinary Science*, v 11, n.3. p.60-70, 2007.
- PROBST, J. *et al.* Gentle touching in early life reduces avoidance distance and slaughter stress in beef cattle. *Applied Animal Behaviour Science* v. 139, p. 42-49, 2012.
- RAMOS, A. *et al.* Androgens and corticosteroids increase in response to mirror images and interacting conspecifics in males of the Siamese fighting fish *Betta splendens*. *Horm Behav.* 132:104991. Jun 2021.
- RAMOS, A.; GONÇALVES, D. Artificial selection for male winners in the Siamese fighting fish *Betta splendens* correlates with high female aggression. *Front Zool* **16**, 34 (2019).
- REDDON, A. R., *et al.* (2012). Effects of isotocin on social responses in a cooperatively breeding fish. *Animal Behaviour*, 84(4), 753-760.
- SCHIRMER, A.; JESUTHASAN, S.; MATHURU, A. Tactile stimulation reduces fear in fish. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol 7, 2013.
- SERMWATANAKUL, A. Capacitating the local farmers to enhance global marketing of Thailand's national aquatic animal, the Siamese fighting fish. *Fish for the People*; 17(2): 42-48 - 2019.
- SMITH, H. M. *The Fresh-Water Fishes of Siam, or Thailand*. Washington: United States Government Printing Office, 622 p. 1945.
- SOARES, M. *et al.* Tactile stimulation lowers stress in fish. *Nature communications* - article number: 534 (2011).
- SRIKULNATH, K. *et al.* Overview of the betta fish genome regarding species radiation, parental care, behavioral aggression, and pigmentation model relevant to humans. *Genes & Genomics*, 43(2), 91–104. 2021.

- TALLET, C. *et al.* 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.
- TATE, M. *et al.* Life in a bubble: the role of the labyrinth organ in determining territory, mating and aggressive behaviours in anabantoids. *Journal Of Fish Biology*, v. 91, n. 3, p. 723-749, 2017.
- VAZ, B. S.; *et al.* Aspects related to well-being in cultivated fish, v.13, n.4, p.419-422, out-dez, 2007.
- VOLPATO, G.L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E.; FERNANDES-DE-CASTILHO, M. Insights into the concept of fish welfare. *Disease of Aquatic Organisms*, v. 75, p. 165–171, 2007.
- WITTE, K.; SCHIMIDT, J. *Betta brownorum*, a new species of anabantoids (Teleostei; Belontiidae) from Northwestern Borneo, with a key to the genus. *Ichthyol Explor Freshw* 2:305–330. 1992.
- WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. Food&Agriculture Org., 1988.