

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITO DA QUANTIDADE DE ÁGUA
RENOVADA SOBRE A INTERAÇÃO
AGRESSIVA EM CICLÍDEOS**

Ana Carolina dos Santos Gauy

Jaboticabal, São Paulo
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**EFEITO DA QUANTIDADE DE ÁGUA
RENOVADA SOBRE A INTERAÇÃO
AGRESSIVA EM CICLÍDEOS**

Ana Carolina dos Santos Gauy

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas

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

Jaboticabal, São Paulo
2016

G277e Gauy, Ana Carolina dos Santos
Efeito da quantidade de água renovada sobre a interação
agressiva em ciclídeos / Ana Carolina dos Santos Gauy. --
Jaboticabal, 2016
58 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2016
Orientadora: Eliane Gonçalves de Freitas
Banca examinadora: Gelson Genaro, Percília Cardoso Giaquinto
Bibliografia

1. Comunicação química. 2. Sinais sociais. 3. Hierarquia social. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **Efeito da quantidade de água renovada sobre a interação agressiva em ciclídeos**

AUTORA: ANA CAROLINA DOS SANTOS GAUY

ORIENTADORA: ELIANE GONCALVES DE FREITAS

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

Profa. Dra. ELIANE GONÇALVES DE FREITAS
Departamento de Zoologia e Botânica / IBILCE/UNESP

Prof. Dr. GELSON GENARO
Centro Universitário Barão de Mauá

Profa. Dra. PERCÍLIA CARDOSO GIAQUINTO
Departamento de Fisiologia / IB/UNESP, Botucatu-SP

Jaboticabal, 15 de julho de 2016

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	1
AGRADECIMENTOS.....	2
APOIO FINANCEIRO.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO GERAL.....	6
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	8
MANUSCRITO 1: Menor quantidade de água renovada reduz o efeito sobre a agressividade social no ciclídeo <i>Pterophyllum scalare</i>	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Manutenção dos peixes.....	16
2.2 Delineamento experimental.....	16
2.3 Interação agressiva.....	17
2.4 Posição hierárquica e estabilidade social.....	17
2.5 Detalhes experimentais.....	17
2.6 Análise dos dados.....	18
3. CONDUTA ÉTICA.....	19
4. RESULTADOS.....	19
4.1 Ataques.....	19
4.2 <i>Displays</i>	20
4.3 Efeito na posição social.....	20
5. DISCUSSÃO.....	22
6. REFERÊNCIAS.....	24
7. LEGENDAS DAS FIGURAS.....	29
8. FIGURAS E TABELAS.....	30

MANUSCRITO 2: Renovação da água do aquário não aumenta interações agressivas no ciclídeo <i>Cichlasoma paranaense</i>	35
RESUMO	36
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Manutenção dos peixes.....	39
2.2 Delineamento experimental.....	40
2.3 Interação agressiva.....	41
2.4 Posição hierárquica e estabilidade social.....	41
2.5 Detalhes experimentais.....	41
2.6 Análise dos dados.....	42
3. CONDUTA ÉTICA	43
4. RESULTADOS	43
4.1 Ataques.....	43
4.2 <i>Displays</i>	43
4.3 Efeito na posição social.....	44
5. DISCUSSÃO	45
6. REFERÊNCIAS	47
7. LEGENDAS DAS FIGURAS	52
8. FIGURAS E TABELAS	53

DEDICATÓRIA

À Ana Rosa dos Santos Gauy pelo exemplo de força, amor e apoio incondicional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ana Rosa e João Carlos pelo amor incondicional, apoio e dedicação. Sempre me incentivando a alcançar caminhos cada vez mais distantes.

À minha família e amigos por todo o incentivo e amor. Por serem minha base.

À professora Eliane Gonçalves de Freitas pela oportunidade, orientação e dedicação. Além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Comportamento Animal pelo companheirismo e ajuda para desenvolver o trabalho.

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

Ao Centro de Aquicultura da UNESP pelo mestrado e pelo fornecimento dos acarás-bandeira utilizados no experimento.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

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

APOIO FINANCEIRO

CAPES, Bolsa de Mestrado.

RESUMO

Animais sociais interagem agressivamente para estabelecer territórios e hierarquia de dominância. Para evitar lutas constantes e reduzir a probabilidade de injúrias, eles mantêm a posição social por meio de *displays* e outros tipos de sinalização social. Em algumas espécies de peixes, sinais químicos que sinalizam a posição social são liberados na água. Porém, a troca da água em aquários ou tanques de criação (necessária para remover restos de alimentos e materiais orgânicos) diluem os sinais químicos, atrapalhando a comunicação social e o reconhecimento da posição social. O resultado é um aumento e persistência da interação agressiva, o que pode causar severas injúrias físicas e aumentar o nível de estresse social nos peixes. Nesse estudo, perguntamos se a agressividade está associada com os níveis de sinais químicos diluídos. Assim, foi testado o efeito da quantidade de água do aquário renovada na agressividade e estabilidade social em dois ciclídeos neotropicais, o *Pterophyllum scalare* e o *Cichlasoma paranaense*, pois o mecanismo pode variar entre espécies. Observamos para *P. scalare* que a renovação de uma pequena quantidade de água (25%) interfere menos no comportamento agressivo dos indivíduos dentro do grupo social do que uma maior quantidade de água (50%). Além disso, a agressividade rapidamente retorna a níveis basais. Em contraste a renovação de 50% da água parece reduzir as interações agressivas no grupo de *C. paranaense*. Assim, esses efeitos podem estar associados a mecanismos diferentes de sinalização social entre as espécies de ciclídeos.

PALAVRAS-CHAVE: hierarquia social, comunicação química, aquariofilia, sinais sociais.

ABSTRACT

Social animals interact aggressively to establish territories and social hierarchy. To avoid constant fights and reduce the probability of injuries, they signalize social rank by means of displays and other types of signaling. In some fish species, chemicals that signalize social rank are released into the water. However, the water renewal in aquaria or breeding tanks (required to remove food leftovers and organic materials) dilutes the chemicals, therefore impairing social communication and rank recognition. The result is an increased and constant group aggressive interaction that may cause severe physical injuries, and raise fish's social stress levels. In this study, it was asked whether the aggressiveness is associated with the levels of chemicals diluted. Then, it was tested the effect of the amount of aquarium's water renewed on the aggressiveness and social stability in two Neotropical cichlids, *Pterophyllum scalare*, and *Cichlasoma paranaense*, as the mechanisms can vary according to the species. It was noticed to *P. scalare* that the renovation of a small amount of aquarium's water (25%) interfere less in aggressive behavior of individuals within the social group than in higher changing water (50%). Aggressiveness, moreover, quickly returns to basal levels. In contrast, the renewal of 50% of water seems to reduce aggressive interactions in *C. paranaense*'s social groups. Thus, these effects may be associated with different mechanisms of social signaling between the cichlid species.

KEY-WORDS: social hierarchy, chemical communication, aquarism, social signals.

INTRODUÇÃO GERAL

As interações sociais em peixes são influenciadas por sinais visuais, químicos e sonoros (Brönmark & Hansson, 2000). Entretanto, em ambientes aquáticos, a comunicação visual e auditiva podem se tornar menos perceptíveis devido a alguns fatores como turbidez da água, baixa luminosidade e alta complexidade do habitat (Brönmark & Hansson, 2000). Assim, os sinais químicos passam a ter importância maior, uma vez que são pouco afetados por esses fatores. Barcellos *et al.* (2014) demonstraram que a comunicação química fornece informações adicionais do ambiente para co-específicos que são incapazes de detectar um potencial perigo visualmente (predador).

A comunicação química em peixes permite o acesso a várias informações, como identificação de risco de predação (Brown, 2003), tamanho dos co-específicos (Giaquinto & Volpato, 2005), antecipação a possíveis ameaças (Barcellos *et al.*, 2011), sinalização de alerta (Jordão & Volpato, 2000; Giaquinto & Hoffmann, 2010), reconhecimento de parceiros (Thünken *et al.*, 2009; Giaquinto *et al.*, 2010) e estimulação do sistema reprodutivo da fêmea (Huertas *et al.*, 2014). Ela é realizada por meio de sinais químicos que são liberados na água pela urina, fezes e sangue. Maruska & Fernald (2012) mostraram que machos de *Astatotilapia burtoni* usam sinais químicos encontrados na urina em interações territoriais (intrasexual) e reprodutivas (intersexual). De acordo com Miranda *et al.* (2005), as fêmeas de *Oreochromis mossambicus* liberam sinais químicos na urina e fezes, que permitem aos machos identificarem a condição reprodutiva da fêmea. Barreto *et al.* (2013), demonstraram que substâncias químicas presentes no sangue de predadores atuam como substância de alarme na tilápia-do-nylo (*O. niloticus*). Assim, é possível perceber que a comunicação química tem diversas funções em peixes e é essencial para a comunicação social em peixes.

Além das funções citadas, a comunicação química também é uma importante via de informação social entre peixes. As espécies da família Cichlidae, por exemplo, vivem em grupos e defendem seu território, formando assim uma hierarquia de dominância, cuja posição social é definida por meio de confrontos agressivos (Turner & Huntingford, 1986). O comportamento agressivo é formado por lutas ritualizadas, das quais fazem parte interações agressivas de

variável risco de injúrias (Greaves & Tuene, 2001) e gasto energético (Ros *et al.*, 2006). Após o estabelecimento da hierarquia, os ataques são reduzidos e os *displays*, que são interações de baixo custo energético, se tornam mais frequentes (Alvarenga & Volpato, 1995; Neat *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 2006). Quando a hierarquia de dominância se estabelece, as sinalizações entre os indivíduos são necessárias para que haja reconhecimento da posição social de cada indivíduo. Dessa forma, os peixes informam a sua posição social, reduzindo as chances de confrontos físicos diretos constantes. Essas sinalizações ocorrem por meio da coloração dos olhos (Volpato *et al.*, 2003), coloração do corpo (O'Connor *et al.*, 1999), sons (Amorim *et al.*, 2003; Longrie *et al.*, 2008) e sinais químicos (Giaquinto & Volpato, 1997; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008).

Apesar do conhecimento das funções mediadas pela comunicação química em peixes, na aquarofilia o manejo de renovação de água do aquário é realizado ao menos uma vez por semana (Goldstein, 2001). De acordo com esse autor, esse manejo é necessário para remover sobras de alimentos e material orgânico, os quais se acumulam e formam compostos nitrogenados que são tóxicos aos peixes. No entanto, a renovação também retira substâncias químicas que são fundamentais para sinalizar a posição social entre os peixes, provocando aumento de interações agressivas e instabilidade social nos animais (e.g. Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008), podendo aumentar o estresse social dos animais (Johnsson *et al.*, 2006). Essas condições são indesejáveis para a aquicultura e manutenção de animais em aquários, pois resultam em redução do crescimento (Volpato & Fernandes, 1994) e aparecimento de doenças (Conte, 2004; Gilmour *et al.*, 2005). Assim, são necessários estudos para se definir a quantidade adequada de renovação de água que permita manter a boa qualidade da água sem causar aumento excessivo das interações agressivas e, conseqüentemente, dos efeitos negativos das interações agressivas.

Para este estudo foram escolhidas duas espécie de ciclídeos, pois esses animais usam a comunicação química em vários contextos sociais (Keller-Costa *et al.*, 2015). Além disso, representantes da família Cichlidae possuem organização social definida por meio de interações agressivas (Baerends & Baerends-Van Roon, 1950), ideal para testar o objetivo proposto. As espécies utilizadas foram o *Pterophyllum scalare* (Schultze 1823) e o *Cichlasoma*

paranaense (Kullander 1983) (Perciformes, Cichlidae). O uso dos sinais químicos como sinalizadores da posição social vem sendo estudado principalmente em ciclídeos africanos (e.g. Barata *et al.*, 2007; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008; Maruska & Fernald, 2012) e dependendo da espécie, o padrão de resposta pode mudar. Por isso, este trabalho investigou tais variações na resposta à comunicação química em espécies neotropicais com distribuição amazônica (*P. scalare*) e ao longo da bacia do Alto Rio Paraná (*C. paranaense*). A família Cichlidae apresenta uma grande variedade de espécies, cores, comportamentos e nichos, isso provavelmente reflete uma variedade parecida na comunicação química (Keller-Costa *et al.*, 2015). Por isso, comparar espécies pode trazer informações mais abrangentes sobre os mecanismos de manutenção da organização social em ciclídeos.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- Alvarenga, C. M. D. & G. L. Volpato. 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology & Behavior*, 57: 75-80.
- Amorim, M. C. P., P. J. Fonseca & V. C. Almada. 2003. Sound production during courtship and spawning of *Oreochromis mossambicus*: male–female and male–male interactions. *Journal of Fish Biology*, 62: 658-672.
- Baerends, G. P. & J. M. Baerends-Van Roon. 1950. An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes. *Behaviour Supplement*, 1: 1-242.
- Barata, E. N., P. C. Hubbard, O. G. Almeida, A. Miranda & A. V. M. Canário. 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Bio Med Center Biology*, 5: 54.
- Barcellos, L. J. G., G. Koakoski, J. G. S. da Rosa, D. Ferreira, R. E. Barreto, P. C. Giaquinto & G. L. Volpato. 2014. Chemical communication of predation risk in zebrafish does not depend on cortisol increase. *Scientific Reports*, 4: 5076.
- Barcellos, L. J. G., G. L. Volpato, R. E. Barreto, I. Coldebella & D. Ferreira. 2011. Chemical communication of handling stress in fish. *Physiology & Behavior*, 103: 372-375.

- Barreto, R. E., C. A. Miyai, F. H. C. Sanches, P. C. Giaquinto, H. C. Delicio & G. L. Volpato. 2013. Blood Cues Induce Antipredator Behavior in Nile Tilapia Conspecifics. PLOS ONE, 8: doi: 10.1371/journal.pone.0054642.
- Brönmark, C. & L. A. Hansson. 2000. Chemical Communication in Aquatic Systems: an introduction. Oikos, 88: 103-109.
- Brown, G. E. 2003. Learning about danger: chemical alarm cues and local risk assessment in prey fishes. Fish and Fisheries, 4: 227-234.
- Conte, F. S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. Applied Animal Behaviour Science, 86: 205-223.
- Giaquinto, P. C. & A. Hoffmann. 2010. Role of olfaction and vision cues in feeding behavior and alarm reaction in the catfish pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. Journal of Ethology, 28: 21-27.
- Giaquinto, P. C. & G. L. Volpato. 1997. Chemical Communication, Aggression, and Conspecific Recognition in the Fish Nile Tilapia. Physiology & Behavior, 62: 1333-1338.
- Giaquinto, P. C. & G. L. Volpato. 2005. Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma corruscans*. Acta Ethologica, 8: 65-69.
- Giaquinto, P. C., C. M. S. Berbert & H. C. Delicio. 2010. Female preferences based on male nutritional chemical traits. Behavioral Ecology and Sociobiology, 64: 1029-1035.
- Gilmour, K. M., J. D. DiBattista & J. B. Thomas. 2005. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. Integrative and Comparative Biology, 45: 263-273.
- Goldstein, R. J. 2001. Angelfish: a complete pet owner's manual. Barron's Educational Series, Inc. Hauppauge (NY), 95 p.
- Gonçalves-de-Freitas, E., F. B. Teresa, F. S. Gomes & P. C. Giaquinto. 2008. Effect of water renewal on dominance hierarchy of the Nile tilapia. Applied Animal Behavior Science, 112: 187-195.

- Greaves, K. & S. Tuene. 2001. The form and context of aggressive behaviour in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 193: 139-147.
- Huertas, M., O. G. Almeida, A. V. M. Canário & P. C. Hubbard. 2014. Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *General and Comparative Endocrinology*, 196: 106-111.
- Johnsson, J. I., S. Winberg & K. A. Sloman. 2006. Social interactions. Pp. 151–196. In: Sloman, K. A., R. W. Wilson & S. Balshine (Eds.). *Behaviour and physiology of fish*. San Diego, Elsevier Inc.
- Jordão, L. C. & G. L. Volpato. 2000. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour*, 137: 681-690.
- Keller-Costa, T., A. V. M. Canário & P. C. Hubbard. 2015. Chemical communication in cichlids: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 221: 64-74.
- Longrie, N., M. L. Fine & E. Parmentier. 2008. Innate sound production in the cichlid *Oreochromis niloticus*. *Journal of Zoology*, 275: 413-417.
- Maruska, K. P. & R. D. Fernald. 2012. Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *The Journal of Experimental Biology*, 215: 68-74.
- Miranda, A., O. G. Almeida, P. C. Hubbard, E. N. Barata & A. V. M. Canário. 2005. Olfactory discrimination of female reproductive status by male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *The Journal of Experimental Biology*, 208: 2037-2043.
- Neat, F. C., A. C. Taylor & F. A. Huntingford. 1998. Proximate costs of fighting in male cichlid fish: the role of injuries and energy metabolism. *Animal Behaviour*, 55: 875-882.
- O'Connor, K. I., N. B. Metcalfe & A. C. Taylor. 1999. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Animal Behaviour*, 58: 1269-1276.
- Ros, A. F. H., K. Becker & R. F. Oliveira. 2006. Aggressive behaviour and energy metabolism in a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Physiology & Behavior*, 89: 164-170.

Thünken, T., N. Waltschyk, T. C. M. Bakker & H. Kullmann. 2009. Olfactory self-recognition in a cichlid fish. *Animal Cognition*, 12: 717-724.

Turner, G. F. & F. A. Huntingford. 1986. A problem for game theory analysis: assessment and intention in male mouth brooder contests. *Animal Behaviour*, 34: 961-970.

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

Volpato, G. L., A. C. Luchiari, C. R. A. Duarte, R. E. Barreto & G. C. Ramanzini. 2003. Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36: 1659-1663.

Menor quantidade de água renovada reduz o efeito sobre a agressividade social no ciclídeo *Pterophyllum scalare*

Ana Carolina dos Santos Gauy ^{a,b*}, Eliane Gonçalves-de-Freitas ^{a,b}

^a Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Cristóvão Colombo, 2265,15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

^b Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP

*E-mail de correspondência: ana.gauy@gmail.com

RESUMO

A renovação da água em aquários é necessária para remover materiais orgânicos e manter a boa qualidade da água. Esse procedimento, entretanto, pode diluir sinais químicos que sinalizam a posição social em algumas espécies de peixes, aumentando assim as interações agressivas no grupo. Aqui, foi testado se o nível de água renovada está associado à agressividade social no acará-bandeira, *Pterophyllum scalare*, um peixe ciclídeo amazônico muito popular na aquariofilia. Os resultados mostraram que renovando 50% da água, as interações agressivas aumentam e continuam elevadas após 24h. Entretanto, a interação agressiva é baixa com a renovação de 25% e retorna a níveis basais após 1h. Assim, renovando uma pequena quantidade de água do aquário é possível prevenir interações agressivas em excesso no *P. scalare*, reduzindo a probabilidade de injúrias, estresse e impactos negativos sobre o bem-estar dos peixes

PALAVRAS-CHAVE: comunicação química, posição social, sinais sociais, peixe ornamental, bem-estar.

ABSTRACT

Water change in fish aquaria is required to keep good water quality. This procedure, however, can dilute chemical signals which signalize social rank in some fish species, thus increasing aggressive interactions in the group. Here, it was tested if the level of water changed is associated to social aggressiveness in the angelfish, *Pterophyllum scalare*, a popular ornamental Amazonian cichlid fish. The results showed that by changing 50% of water, aggressive interaction increases and remains elevated after 24h. However, the aggressive interaction is lower under 25% water changing and returns to baseline levels after 1h. Therefore, by changing a small volume of aquarium water is possible to prevent exaggerated aggressive interaction in *P. scalare*, thus reducing the probability of injuries, stress, and negative impacts on fish welfare.

KEY-WORDS: chemical communication; social rank; social signaling; ornamental fish; welfare.

1. Introdução

A organização social em muitas espécies é baseada em uma hierarquia de dominância que permite aos indivíduos dominantes acessar primeiro alguns recursos como alimento, abrigo, território e parceiros para acasalamento (Ang and Manica, 2010). Peixes ciclídeos, por exemplo, apresentam comportamento territorial, formando assim uma hierarquia de dominância cuja posição social é alcançada por confrontos agressivos (Turner and Huntingford, 1986). A hierarquia social é mantida por comportamentos de baixo custo energético, pois os peixes reconhecem sua posição social e a sinalizam de diversas maneiras, usando sinais visuais (e.g. Beeching, 1992; Boscolo et al., 2011; Korzan et al., 2008; O'Connor et al., 1999; Volpato et al., 2003), acústicos (e.g. Longrie et al., 2008), e químicos (e.g. Giaquinto and Volpato, 1997; Gonçalves-de-Freitas et al., 2008). A comunicação química em peixes, entretanto, é uma característica que pode atrapalhar a manutenção de peixes em aquários, pois a troca de água (necessária para remover sobras de alimento, fezes e compostos nitrogenados tóxicos) também pode diluir possíveis sinais químicos sociais e, assim, aumentar a interação agressiva dentro do grupo (e.g. Gonçalves-de-Freitas et al., 2008). Essa condição é indesejada já que pode interferir no bem-estar dos peixes de diversos modos (e.g. Damsgård and Huntingford, 2012). Apesar desse problema, não há dados empíricos com relação à quantidade de água que deve ser trocada durante o manejo do aquário para que ela reduza o impacto na agressividade dos peixes. Manuais de aquarofilia sugerem a troca de 20 a 25% da água semanalmente para manter a boa qualidade da água (e.g. Berg, 2005). Goldstein (2001) sugere trocar 50% da água do aquário para espécies ornamentais de ciclídeos. Entretanto, Gonçalves-de-Freitas et al. (2008) mostraram que, a renovação de água em fluxo contínuo desestabiliza a hierarquia social e aumenta os ataques em machos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Assim, nesse estudo, foi testado o efeito de diferentes quantidades de renovação da água do aquário sobre o comportamento agressivo do acará-bandeira, *Pterophyllum scalare*, uma espécie popular de ciclídeo ornamental. Encontramos que a troca de 25% ao invés de 50% da água do aquário atenua o impacto sobre a agressividade social.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção dos peixes

Os animais foram provenientes do Laboratório de Peixes Ornamentais - Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP. *Pterophyllum scalare* Schultze 1823 (Figura 1A) juvenis foram aclimatados durante 15 dias em caixas d'água de polietileno (ca. 1 peixe/10L) com água na temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e regime de luz de 12L:12E (das 7:00h as 19:00h). Foram utilizados juvenis, pois *P. scalare* é uma espécie monomórfica e já apresenta interação agressiva nessa fase (Carvalho et al., 2012). Os peixes foram alimentados com ração "Tetra Color - Tropical Granules" duas vezes ao dia (8:00h e 18:00h) até saciedade aparente. A qualidade da água foi mantida por filtros biológicos (Canister; filtragem 400L/h) e aeração constante.

2.2. Delineamento experimental

O efeito da renovação de água sobre a interação agressiva foi testado em grupos de três indivíduos sem identificação de sexo, medindo de 30 a 50 mm (comprimento padrão) e pesando de 0,5 a 5,5 g. Os animais foram agrupados por três dias para estabelecimento da hierarquia social e, no quarto dia, foram designados para um dos três tratamentos (n = 15 cada tratamento):

1) Renovação de 0% da água (controle); 2) Renovação de 25% da água; 3) Renovação de 50% da água. Vamos nos referir a eles como T0%, T25% e T50% respectivamente. Em todos os tratamentos, 50% do volume de água do aquário foi retirado por um tubo plástico preso na lateral interna do aquário. No T0%, a mesma água retirada do aquário foi repostada, servindo como controle. No T25%, foi repostado 25% da água retirada do aquário e 25% de água nova. No T50%, foi repostado 50% de água nova (Figura 1B). A água nova foi coletada de um aquário similar aos utilizados nos testes, com filtro biológico, aeração e na mesma temperatura, porém sem peixes. A água foi cuidadosamente colocada no aquário usando um bquer para que a interferência no comportamento dos peixes fosse minimizada.

Os peixes foram agrupados por três dias, o que é suficiente para estabelecer a hierarquia social em *P. scalare* (Gómez-Laplaza and Morgan, 2003). No quarto dia, o comportamento agressivo foi filmado (10 min) antes da

renovação (*baseline* – valores basais), logo após, 1 hora, 2 horas e 24 horas após a renovação (Figura 1C), para avaliar em diversos intervalos de tempo o efeito da renovação na interação agressiva e também o tempo de recuperação para os níveis basais. As filmagens foram feitas entre as 14:00h e 18:00h para evitar possíveis influências do ritmo circadiano. Esse período foi escolhido, pois se distanciava da primeira alimentação, evitando também a influência da competição por alimento (Gómez-Laplaza and Morgan, 2003; Grobler and Wood, 2013).

2.3. Interação agressiva

As interações agressivas foram baseadas no etograma descrito por Carvalho et al. (2012), para *P. scalare* (Tabela 1). Os comportamentos agressivos foram divididos em ataques (mordida no corpo, ataque frontal e perseguição) e *displays* (ameaça lateral, exibição frontal e ondulação). Os ataques são unidades agressivas que envolvem contato físico direto e geralmente são seguidos de elevado gasto energético, enquanto os *displays* são as unidades agressivas que não envolvem contato físico e geralmente são seguidas de reduzido gasto energético (Haller and Wittenberger, 1988; Ros et al., 2006).

2.4. Posição hierárquica e estabilidade social

A posição hierárquica foi inferida por meio do índice de dominância (ID = frequência de comportamentos agressivos emitidos pelo indivíduo / frequência total de comportamentos agressivos no grupo) como utilizado por 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 (Gonçalves-de-Freitas et al., 2008). Foi verificado o ID para cada posição social durante os três primeiros dias de agrupamento e também no quarto dia, antes da renovação da água (*baseline*).

2.5. Detalhes experimentais

Antes do agrupamento os animais foram anestesiados com Benzocaína (12,8 mg/L; e.g. Carvalho et al., 2012), pesados e medidos. A média (\pm E.P.) do comprimento padrão e peso dos peixes foram respectivamente: T0% – 36,24 \pm 1,4 mm; 2,1 \pm 0,23 g; T25% – 38,24 \pm 1,4 mm; 2,78 \pm 0,31 g; T50% – 35,31 \pm 1,02 mm; 2.57 \pm 0.18 g. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o

comprimento (one-way ANOVA, $F_{(2,42)} = 1,40$; $p = 0,26$) e peso ($F_{(2,42)} = 2,02$; $p = 0,15$). O coeficiente de variação dentro do grupo também foi similar entre os tratamentos para o comprimento ($F_{(2,42)} = 1,90$, $p = 0,15$) e peso ($F_{(2,42)} = 0,59$, $p = 0,55$).

Os animais foram individualmente identificados por marcas naturais de coloração (e.g. Carvalho et al., 2012). Eles foram observados em aquários (400 x 300 x 400 mm; ca. 48L) com as três paredes laterais cobertas por plástico azul afim de evitar contato visual entre animais de aquários adjacentes, somente a parede frontal não foi coberta para permitir as filmagens. A cor azul foi escolhida, pois reduz os níveis de cortisol em outra espécie de ciclídeo (Maia and Volpato, 2013; Volpato and Barreto, 2001). A temperatura da água foi $28 \pm 1^\circ\text{C}$, e o fotoperíodo foi 12L:12E (das 7:00h as 19:00h). O oxigênio da água foi mantido a $8,24 \pm 0,64$ ppm e o pH a $7,0 \pm 0,1$ (aferidos com medidores eletrônicos). Os níveis de amônia e nitrito foram medidos no final do experimento, a fim de mostrar que a renovação de 25% da água do aquário é eficiente para retirar esses compostos nitrogenados do ambiente (medidos com kits comerciais – LabconTest). Os níveis foram respectivamente: 0 ppm; $0,25 \pm 0,08$ ppm no T0%; 0 ppm; $0,1 \pm 0,06$ ppm no T25%; 0 ppm; $0,1 \pm 0,1$ ppm no T50%. Os animais foram alimentados com a mesma ração utilizada durante a aclimação, correspondente a 3% da biomassa, fornecida duas vezes ao dia (8:00h e 18:00h).

2.6. Análise dos dados

A normalidade dos dados foi testada por Kolmogorov-Smirnov (Ha and Ha, 2012; Lehner, 1996) e a homocedasticidade pelo teste F_{\max} (Zar, 1999). Como parte dos dados não se mostrou homocedástico, eles foram transformados por $\sqrt{x + 0.5}$ (Zar, 1999). Então, foi comparada a frequência de ataques e de displays antes, logo após, 1h, 2h e 24h após a renovação da água por ANOVA para medidas repetidas, sendo os tratamentos as variáveis categóricas e as sessões de observação as medidas repetidas. Essa mesma comparação foi feita para cada posição social (alfa, beta e gama), para testar o efeito da renovação de água na hierarquia social. O teste de Fisher LSD foi aplicado como teste *post hoc* e a significância estatística foi $p \leq 0,05$.

3. Conduta 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 (CEUA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto, SP (Proc. 077/2013).

4. Resultados

A hierarquia social foi rapidamente estabelecida nos três dias que precederam a manipulação de água. O índice de dominância foi próximo de 0,8 para o animal alfa e abaixo de 0,4 para os animais beta e gama, e permaneceu constante até o quarto dia antes da renovação da água (Figura 2).

4.1. Ataques

Houve um claro efeito da quantidade de água renovada na agressividade social do *P. scalare*. Uma interação significativa (tratamento vs sessões de observação) foi encontrada para a frequência de ataques (ANOVA para medidas repetidas, $F_{(8,168)} = 16,99$, $p < 0,0001$; Figura 3A). No T0% a frequência de ataques logo após a renovação foi similar ao *baseline* ($p = 0,36$) e foi menor nas demais observações ($p < 0,03$). No T25% os ataques aumentaram com relação ao *baseline* logo após a renovação da água ($p < 0,0001$) e foi similar 1h, 2h e 24h após a renovação ($p > 0,07$). No T50% a frequência de ataques aumentou com relação ao *baseline* logo após a renovação ($p < 0,0001$), foi similar 1h após ($p = 0,70$) e aumentou novamente 2h e 24h após a renovação ($p < 0,0001$). Além disso, a frequência de ataques foi similar entre os tratamentos antes da renovação (*baseline*) ($p > 0,27$), mas significativamente diferente após a renovação. No T25% a frequência de ataques foi maior que no controle (T0%) logo após a renovação, mas foi menor do que no T50% ($p < 0,0001$). 1h após a renovação, a frequência de ataques foi maior no T25% e no T50% do que no controle (T0%) ($p < 0,02$) e foi similar entre eles (T25% e T50%, $p = 0,88$). 2h após a renovação, somente o T50% mostrou uma frequência de ataques

significativamente alta ($p < 0,0001$; T0% e T25%, $p = 0,62$), o mesmo foi observado 24h após a renovação ($p < 0,0001$; T0% e T25%, $p = 0,42$).

4.2. *Displays*

Interação significativa (tratamento vs sessões de observação) também foi encontrada para a frequência de *displays* ($F_{(8,168)} = 7,27$, $p < 0,0001$; Figura 3B). Comparações dentro de cada tratamento mostraram uma redução significativa dos *displays* em todas as observações após a renovação de água nos três tratamentos ($p < 0,04$). Além disso, comparações entre os tratamentos mostraram que a frequência de *displays* foi similar entre todos os tratamentos antes da renovação ($p > 0,07$), exceto para o T50% que foi maior do que o T25% ($p = 0,04$). Logo após a renovação, a frequência de *displays* foi menor no T50% do que no T25% ($p = 0,02$) e ambos foram menores do que no T0% ($p < 0,0001$). 1h após a renovação, a frequência de *displays* foi similar entre todos os tratamentos ($p > 0,37$). Somente no T50% a frequência de *displays* foi significativamente menor do que os outros tratamentos 2h ($p < 0,006$; T0% e T25%, $p = 0,85$) e 24h após a renovação ($p < 0,0001$; T0% e T25%, $p = 0,4$).

4.3. Efeito na posição social

T0%

Foi observado, para a frequência de ataques, um efeito significativo entre as posições sociais ($F_{(2,42)} = 46,68$, $p < 0,0001$; Figura 4A) e entre as sessões de observação ($F_{(4,168)} = 2,93$, $p = 0,02$), porém não houve interação significativa (posição social vs sessões de observação, $F_{(8,168)} = 1,59$, $p = 0,13$). A frequência de ataques emitida pelo peixe alfa foi menor em todas as observações quando comparadas com o *baseline* ($p < 0,03$). Já a frequência de ataques emitida pelos peixes beta e gama permaneceu similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação ($p > 0,22$). Foi encontrada interação significativa (posição social vs sessões de observação) para a frequência de *displays* ($F_{(8,168)} = 4,80$, $p < 0,0001$; Figura 4B), com redução da frequência de *displays* emitida pelo peixe alfa em todas as observações após a renovação ($p < 0,0001$). A frequência de *displays* emitida pelos peixes beta e gama permaneceu similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação ($p > 0,17$).

T25%

Foi observado efeito na interação (posição social vs sessões de observação) para a frequência de ataques ($F_{(8,168)} = 3,92$, $p = 0,0003$; Figura 4C). Houve aumento da frequência de ataques emitida pelo peixe alfa logo após a renovação ($p < 0,0001$), a qual voltou a ser similar ao *baseline* no restante das observações ($p > 0,06$). Já a frequência de ataques emitida pelos peixes beta e gama permaneceu similar ao *baseline* durante todas as observações após a renovação ($p > 0,15$). Também foi observado efeito na interação (posição social vs sessões de observação) para a frequência de *displays* ($F_{(8,168)} = 4,92$, $p < 0,0001$; Figura 4D), com redução da frequência de *displays* emitida pelo peixe alfa em todas as observações após a renovação ($p < 0,009$). O mesmo acontece com o peixe beta logo após, 1h e 2h após a renovação ($p < 0,01$) e essa frequência volta a ser similar ao *baseline* 24h após a renovação ($p = 0,37$). A frequência de *displays* emitida pelo peixe gama foi similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação ($p > 0,56$).

T50%

Foi observado efeito na interação (posição social vs sessões de observação) para a frequência de ataques ($F_{(8,168)} = 9,17$, $p < 0,0001$; Figura 4E). Houve aumento da frequência de ataques emitida pelo peixe alfa logo após a renovação ($p < 0,0001$), a qual voltou a ser similar ao *baseline* 1h após ($p = 0,49$) e voltou a aumentar 2h e 24h após a renovação ($p < 0,0001$). A frequência de ataques emitida pelo peixe beta também aumentou logo após a renovação ($p < 0,0001$), ficou similar ao *baseline* 1h e 2h após ($p > 0,06$) e voltou a aumentar 24h após a renovação ($p < 0,0001$). Já a frequência de ataques emitida pelo peixe gama permaneceu similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação ($p > 0,58$). Também foi observado efeito na interação (posição social vs sessões de observação) para a frequência de *displays* ($F_{(8,168)} = 17,53$, $p < 0,0001$; Figura 4F). Houve redução da frequência de *displays* emitida pelos peixes alfa e beta em todas as observações após a renovação ($p < 0,03$). A frequência de *displays* emitida pelo peixe gama permaneceu similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação ($p > 0,36$).

5. Discussão

O manejo da água em tanques ou aquários para a remoção de restos de comida, fezes e compostos nitrogenados acumulados, pode ser um problema para alguns peixes sociais, pois a renovação da água pode aumentar as interações agressivas no grupo. Esse estudo mostrou que a renovação da água aumenta as interações agressivas em *P. scalare* e que tal efeito foi mais forte nos peixes dominantes. Além disso, foi demonstrado que a renovação de 25% da água causa um efeito menos intenso na agressividade do acará-bandeira, a qual rapidamente volta a níveis basais. Por outro lado, com a renovação de 50% da água as interações agressivas aumentam e duram por mais tempo do que com a renovação de 25%. Assim, foi demonstrado pela primeira vez (empiricamente) que o efeito da renovação da água sobre a agressividade pode ser transiente e minimizado pela renovação de uma menor quantidade de água para o ciclídeo *P. scalare*.

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos para os ataques e *displays* nos primeiros três dias de agrupamento, indicando que os três dias iniciais foram suficientes para estabilizar a hierarquia de dominância. Essa condição basal (*baseline*) mostra que todos os tratamentos partiram do mesmo nível de agressividade, então, assumimos que os resultados foram devido à renovação da água e não a alguma condição prévia.

Muitas espécies utilizam sinais químicos liberados na água como pistas para comunicar o status social. Na tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) a ausência de informação química aumenta a interação agressiva (Giaquinto and Volpato, 1997) e um fluxo contínuo de renovação de água aumenta os ataques emitidos pelos submissos e desestabiliza a hierarquia social (Gonçalves-de-Freitas et al., 2008), indicando assim que existe uma informação química envolvida no reconhecimento da posição social. Em outro ciclídeo, *Astatotilapia burtoni*, a urina é liberada durante a invasão do território, sugerindo um tipo de sinalização química da posição social (Maruska and Fernald, 2012). Almeida et al. (2005), também demonstraram que machos de tilápia mossâmbica (*Oreochromis mossambicus*) sinalizam sua posição social liberando urina na água e um odorante do tipo esterol é provavelmente o químico que comunica a dominância social do macho

(Barata et al., 2008). Aqui, nenhum composto químico foi investigado, mas é possível que algum tipo de sinal químico social possa estar envolvido no reconhecimento da posição social do *P. scalare*.

Uma explicação alternativa seria a possibilidade de que mudanças no odor da água poderiam estressar o peixe dominante, pois seria uma novidade no ambiente. A tilápia-do-nylo, por exemplo, responde a substância de alarme de coespecífico (extrato de pele) aumentando os níveis de cortisol (Sanches et al., 2015). Além disso, um novo ambiente também aumenta níveis de cortisol em peixes (Serra et al., 2015). Entretanto, o aumento do cortisol geralmente é negativamente correlacionado com o comportamento agressivo em peixes (Castanheira et al., 2013; Øverli et al., 2002; Øverli et al., 2004), então esperaríamos uma diminuição na interação agressiva. De fato, Serra et al. (2015) demonstraram que há aumento do cortisol em um novo ambiente para um peixe caracídeo, *Brycon amazonicus*, mas o mesmo reduz as interações agressivas. Assim, é plausível supor que algum tipo de substância social pode ser diluída durante a renovação da água, e assim causar o aumento da agressividade, principalmente em peixes dominantes.

Quando 25% da água do aquário foi renovada a frequência de ataques aumentou imediatamente. Entretanto, 1h após, os ataques decaíram a níveis basais. Indicando assim, que a hierarquia social foi rapidamente reestabelecida. O oposto aconteceu com os *displays*, que decaíram após a renovação da água e aumentaram novamente, seguindo uma resposta natural dos animais em lutas escalonadas (Johnsson et al., 2006). Entretanto, quando foi renovada maior quantidade água (T50%) os ataques aumentaram ainda mais do que no T25%, mostrando que o efeito está associado com a quantidade de água renovada. Mesmo assim, 1h após a renovação, a frequência de ataques decaiu abruptamente. Isso pode ser um efeito do alto gasto energético dos ataques, que reduz (ou para) a interação agressiva em ciclídeos (e.g. Neat et al., 1998; Ros et al., 2006). De fato, tanto os ataques quanto os *displays* diminuíram, reforçando essa conclusão. De acordo com Wootton (1998), as interações agressivas tem um custo energético muito alto para os peixes, então o animal desiste de lutar por não ter estoques de energia para continuar lutando por um longo período. Além disso, lutas diretas (ataques) geram um acúmulo de lactato (Matsumasa and Murai,

2005), que leva a redução das lutas diretas, e conseqüentemente, uma redução de injúrias e gasto energético extra (Briffa and Elwood, 2001; Neat et al., 1998).

Alto gasto energético em lutas e tempo gasto em interações agressivas podem prejudicar outras atividades essenciais do indivíduo, como crescimento e reprodução. No salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*), por exemplo, o crescimento está negativamente correlacionado com a agressividade, mostrando que essas duas características não podem ser maximizadas ao mesmo tempo (Vøllestad and Quinn, 2003). Fox et al. (1997) mostraram que os níveis de cortisol são dependentes da posição social do indivíduo, bem como da estabilidade social no ciclídeo africano *A. burtoni*, indicando os efeitos negativos das interações prolongadas. Desta forma, a compreensão dos mecanismos que regulam as interações sociais entre os peixes criados em ambientes artificiais traz implicações importantes para o bem-estar dos animais (Boscolo et al., 2011; Conte, 2004; Sloman et al., 2011). Esse estudo ampliou o conhecimento sobre tal assunto, mostrando que o comportamento agressivo está associado com a quantidade de água renovada. Portanto, a renovação de uma menor quantidade de água interfere menos no comportamento agressivo dos indivíduos dentro do grupo social, reduzindo as conseqüências negativas para o bem-estar animal, resolvendo assim o paradigma entre renovação de água e estabilidade do ambiente social para essa espécie.

6. Referências

- Almeida, O.G., Miranda, A., Frade, P., Hubbard, P.C., Barata, E.N., Canário, A.V.M., 2005. Urine as a social signal in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Chem. Senses*. 30, i309–i310.
- Ang, T.Z., Manica, A., 2010. Unavoidable limits on group size in a body size-based linear hierarchy. *Behav. Ecol.* 21, 819–825.
- Barata, E.N., Fine, J.M., Hubbard, P.C., Almeida, O.G., Frade, P., Sorensen, P.W., Canário, A.V.M., 2008. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique tilapia males likely signals social dominance to females. *J. Chem. Ecol.* 34, 438–449.

- Beeching, S.C., 1992. Visual assessment of relative body size in a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. *Ethology*. 90, 177-186.
- Berg, W., 2005. William Berg's Tropical Fish - A Beginners Guide, e-book. AC Tropical Fish. http://www.aquaticcommunity.com/Tropical_Fish-A_Beginners_Guide.pdf (accessed 24.05.16).
- Boscolo, C.N.P., Morais, R.N., Gonçalves-de-Freitas, E., 2011. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 135, 154–159.
- Briffa, M., Elwood, R.W., 2001. Decision rules, energy metabolism and vigour of hermit-crab fights. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268, 1841–1848.
- Carvalho, T.B., Ha, J.C., Gonçalves-de-Freitas, E., 2012. Light intensity can trigger different agonistic responses in juveniles of three cichlid species. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 45, 91–100.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L.E.C., Martins, C.I.M., 2013. Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream *Sparus aurata*: indication of divergent coping styles. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 143, 75–81.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223.
- Damsgård, B., Huntingford, F., 2012. Fighting and aggression, in: Huntingford, F., Jobling, M., Kadri, S. (Eds.), *Aquaculture and Behavior*. Willey-Blackwell, Oxford, UK, pp. 248-285.
- Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., Fernald, R.D., 1997. Stress and dominance in a social fish. *J. Neurosci.* 17, 6463–6469.
- Giaquinto, P.C., Volpato, G.L., 1997. Chemical communication, aggression, and conspecific recognition in the fish Nile tilapia. *Physiol. Behav.* 62, 1333–1338.
- Goldstein, J.R., 2001. *Angelfish: A Complete Pet Owner's Manual*, Barron's Educational Series, Inc., New York.

- Gómez-Laplaza, L.M., Morgan, E., 2003. The influence of social rank in the angelfish, *Pterophyllum scalare*, on locomotor and feeding activities in a novel environment. *Lab. Anim.* 37, 108–120.
- Gonçalves-de-Freitas, E., Teresa, F.B., Gomes, F.S., Giaquinto, P.C., 2008. Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 112, 187–195.
- Grobler, J.M.B., Wood, C.M., 2013. The physiology of rainbow trout in social hierarchies: two ways of looking at the same data. *J. Comp. Physiol. B.* 183, 787–799.
- Ha, R.R., Ha, J.C., 2012. *Integrative Statistics for the Social & Behavioral Sciences*, SAGE Publications, Inc., California.
- Haller, J., Wittenberger, C., 1988. Biochemical energetics of hierarchy formation in *Betta splendens*. *Physiol. Behav.* 43, 447–450.
- Johnsson, J.I., Winberg, S., Sloman, K.A., 2006. Social interactions, in: Sloman, K.A., Wilson, R.W., Balshine, S. (Eds.), *Behaviour and Physiology of Fish*. Elsevier Inc., San Diego, pp. 151–196.
- Korzan, W.J., Robison, R.R., Zhao, S., Fernald, R.D., 2008. Color change as a potential behavioral strategy. *Horm. Behav.* 54, 463–470.
- Lehner, P.N., 1996. *Handbook of Ethological Methods*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Longrie, N., Fine, M.L., Parmentier, E., 2008. Innate sound production in the cichlid *Oreochromis niloticus*. *J. Zool.* 275, 413–417.
- Maia, C.M., Volpato, G.L., 2013. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. *Zoology.* 116, 64–66.
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2012. Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *J. Exp. Biol.* 215, 68–74.
- Matsumasa, M., Murai, M., 2005. Changes in blood glucose and lactate levels of male fiddler crabs: effects of aggression and claw waving. *Anim. Behav.* 69, 569–577.

- Neat, F.C., Taylor, A.C., Huntingford, F.A., 1998. Proximate costs of fighting in male cichlid fish: the role of injuries and energy metabolism. *Anim. Behav.* 55, 875–882.
- O'Connor, K.I., Metcalfe, N.B., Taylor, A.C., 1999. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Anim. Behav.* 58, 1269–1276.
- Øverli, Ø., Korzan, W.J., Höglund, E., Winberg, S., Bollig, H., Watt, M., Foster, G.L., Barton, B.A., Øverli, E., Renner, K.J., Summers, C.H., 2004. Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. *Horm. Behav.* 45, 235-241.
- Øverli, Ø., Kotzian, S., Winberg, S., 2002. Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. *Horm. Behav.* 42, 53-61.
- Ros, A.F.H., Becker, K., Oliveira, R.F., 2006. Aggressive behaviour and energy metabolism in a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Physiol. Behav.* 89, 164–170.
- Sanches, F.H.C., Miyai, C.A., Pinho-Neto, C.F., Barreto, R.E., 2015. Stress responses to chemical alarm cues in Nile tilapia. *Physiol. Behav.* 149, 8-13.
- Serra, M., Wolkers, C.P.B., Urbinati, E.C., 2015. Novelty of the arena impairs the cortisol-related increase in the aggression of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Physiol. Behav.* 141, 51-57.
- Sloman, K.A., Baldwin, L., McMahon, S., Snellgrove, D., 2011. The effects of mixed-species assemblage on the behaviour and welfare of fish held in home aquaria. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 135, 160–168.
- Turner, G.F., Huntingford, F.A., 1986. A problem for game theory analysis: assessment and intention in male mouthbrooder contests. *Anim. Behav.* 34, 961–970.
- Vøllestad, L.A., Quinn, T.P., 2003. Trade-off between growth rate and aggression in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Anim. Behav.* 66, 561–568.
- Volpato, G.L., Barreto, R.E., 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1041–1045.

Volpato, G.L., Luchiari, A.C., Duarte, C.R.A., Barreto, R.E., Ramanzini, G.C., 2003. Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1659–1663.

Wootton, R.J., 1998. *Ecology of Teleost Fishes*, second ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analyses*, fourth ed. Prentice Hall, New Jersey.

7. Legendas das Figuras

Figura 1. A) *Pterophyllum scalare*. Foto: Ana Carolina S. Gauy. B) Esquema da manipulação de água em cada tratamento. C) Esquema do delineamento experimental.

Figura 2. Índice de dominância (média \pm E.P.) de cada peixe (alfa, beta e gama) antes da renovação de água. A) T0%; B) T25%; C) T50%.

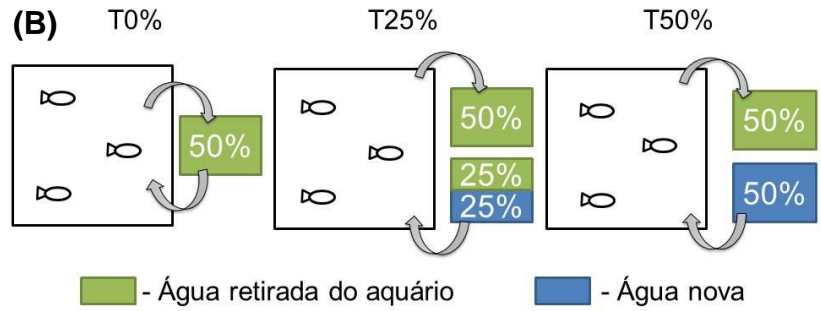
Figura 3. Frequência (média \pm E.P.) de ataques (A) e *displays* (B) ao longo do tempo, nas observações após a renovação, em cada tratamento. Asterisco indica diferença significativa em relação à observação antes da renovação de água (*baseline*) dentro de cada tratamento. Letras comparam as observações entre os tratamentos. Valores seguidos por ao menos uma mesma letra não diferem significativamente (ANOVA para medidas repetidas, seguida de Fisher LSD para comparações múltiplas).

Figura 4. Frequência (média \pm E.P.) de ataques e *displays* de cada peixe (alfa, beta e gama) em cada tratamento. T0%: frequência de ataques (A), frequência de *displays* (B). T25%: frequência de ataques (C), frequência de *displays* (D). T50%: frequência de ataques (E), frequência de *displays* (F). Asterisco indica diferença significativa em relação à observação antes da renovação de água (*baseline*) dentro de cada posição social (ANOVA para medidas repetidas, seguida de Fisher LSD para comparações múltiplas).

8. Figuras e Tabelas

Figura 1.

(A)



(C)

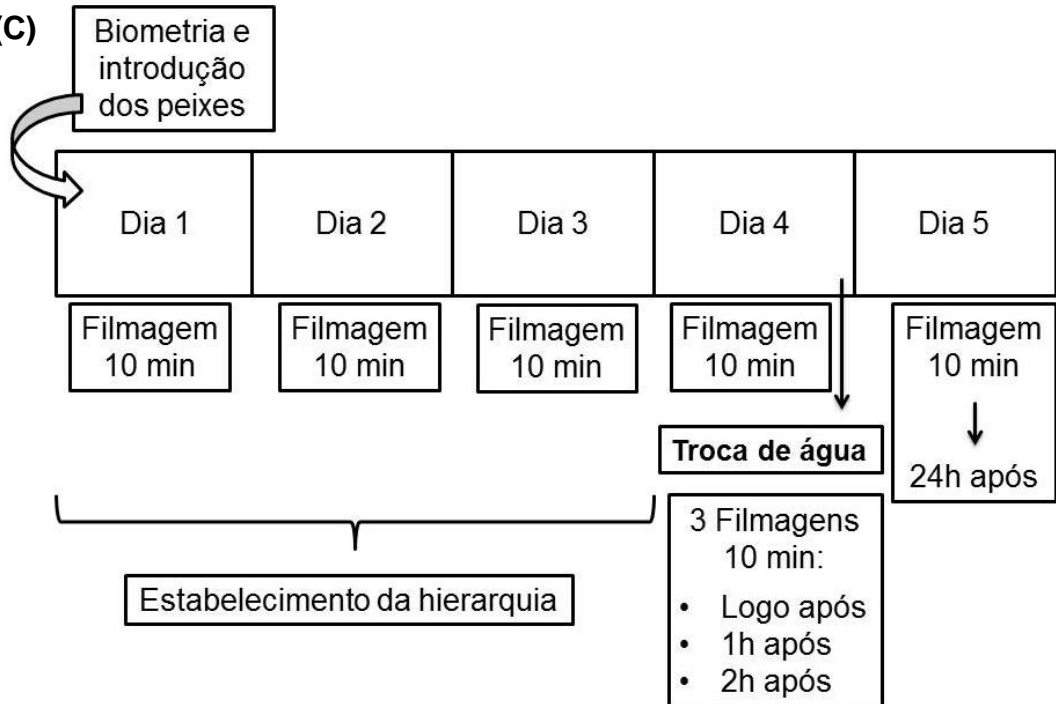


Figura 2.

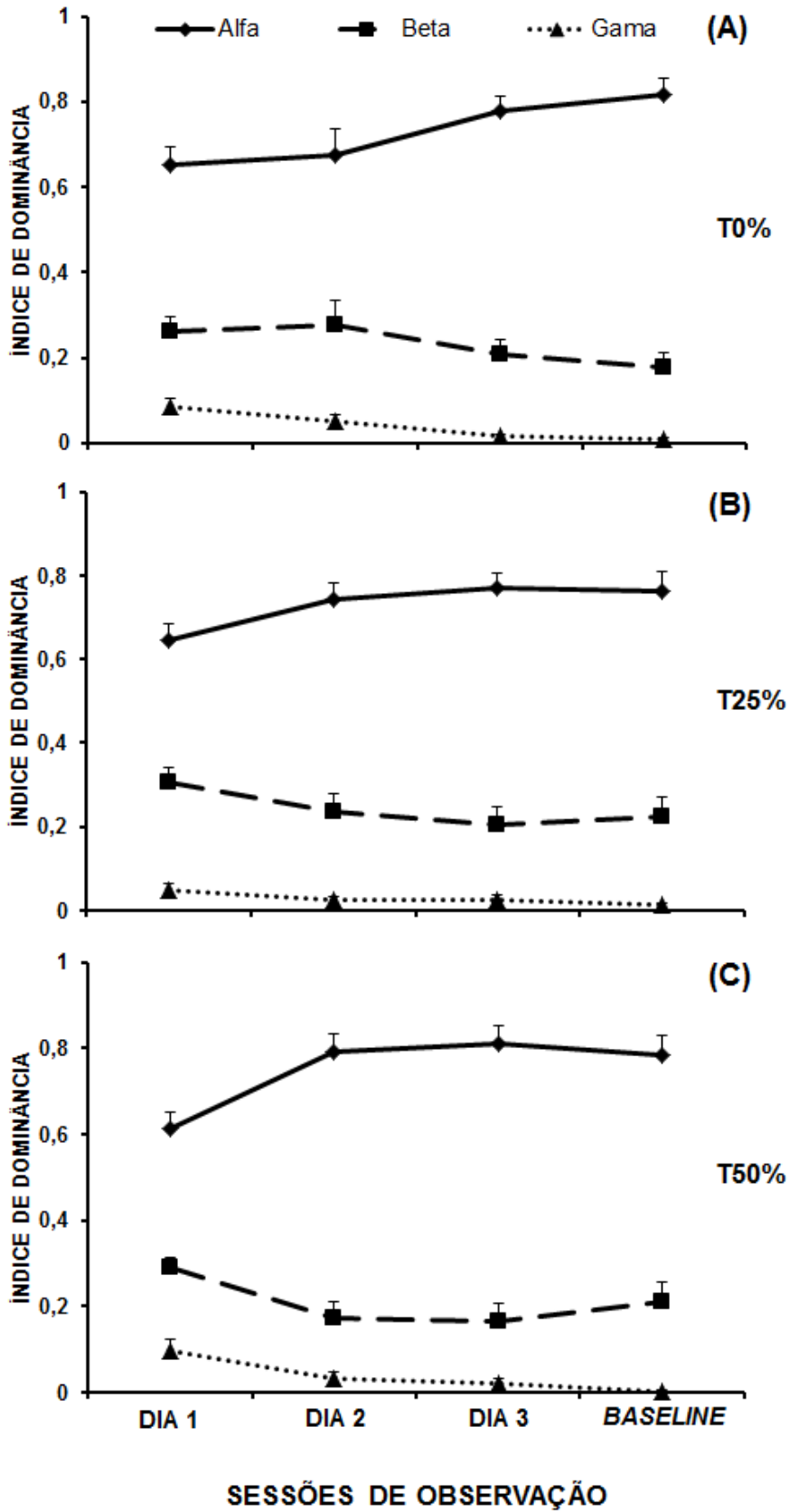


Figura 3.

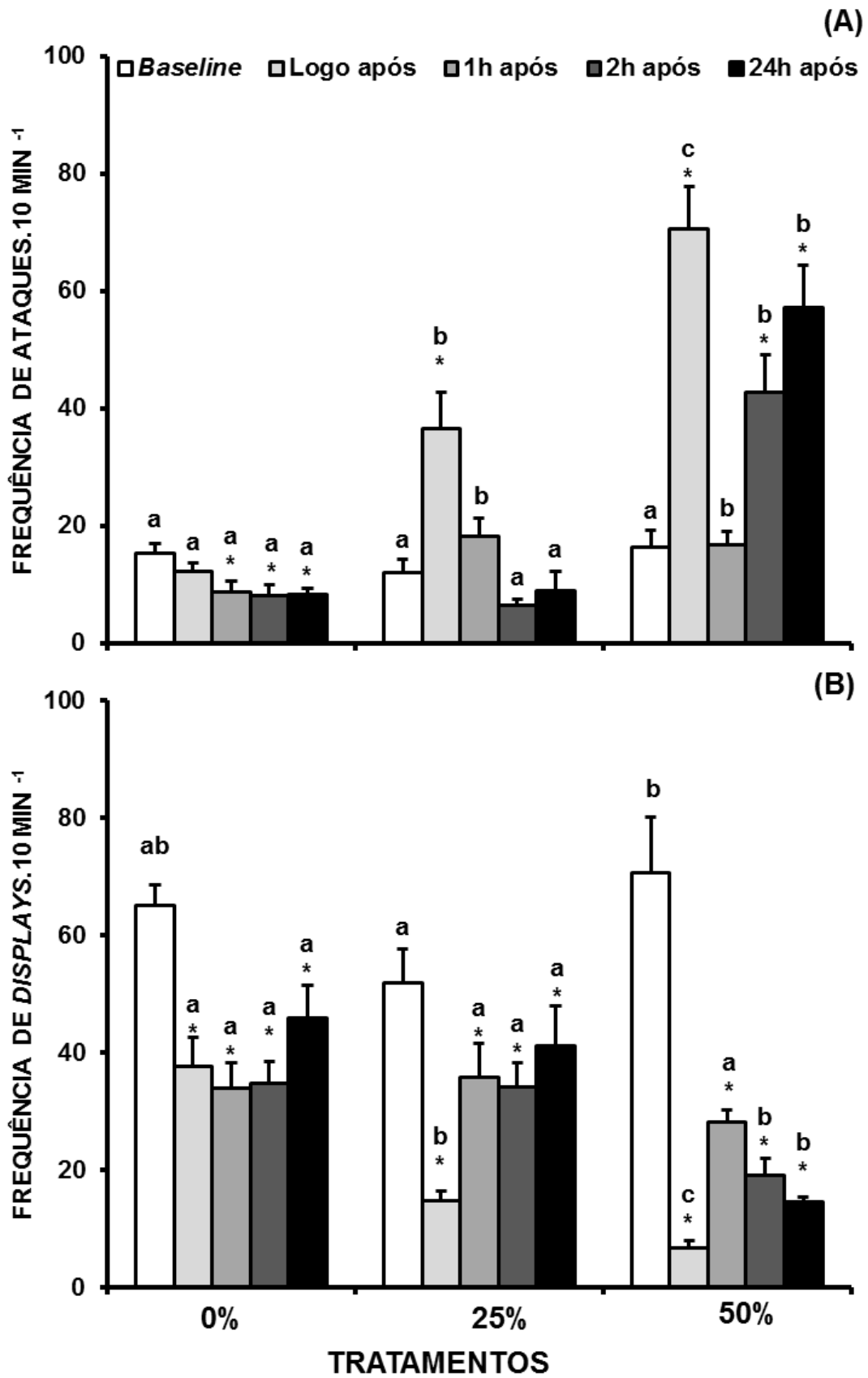


Figura 4.

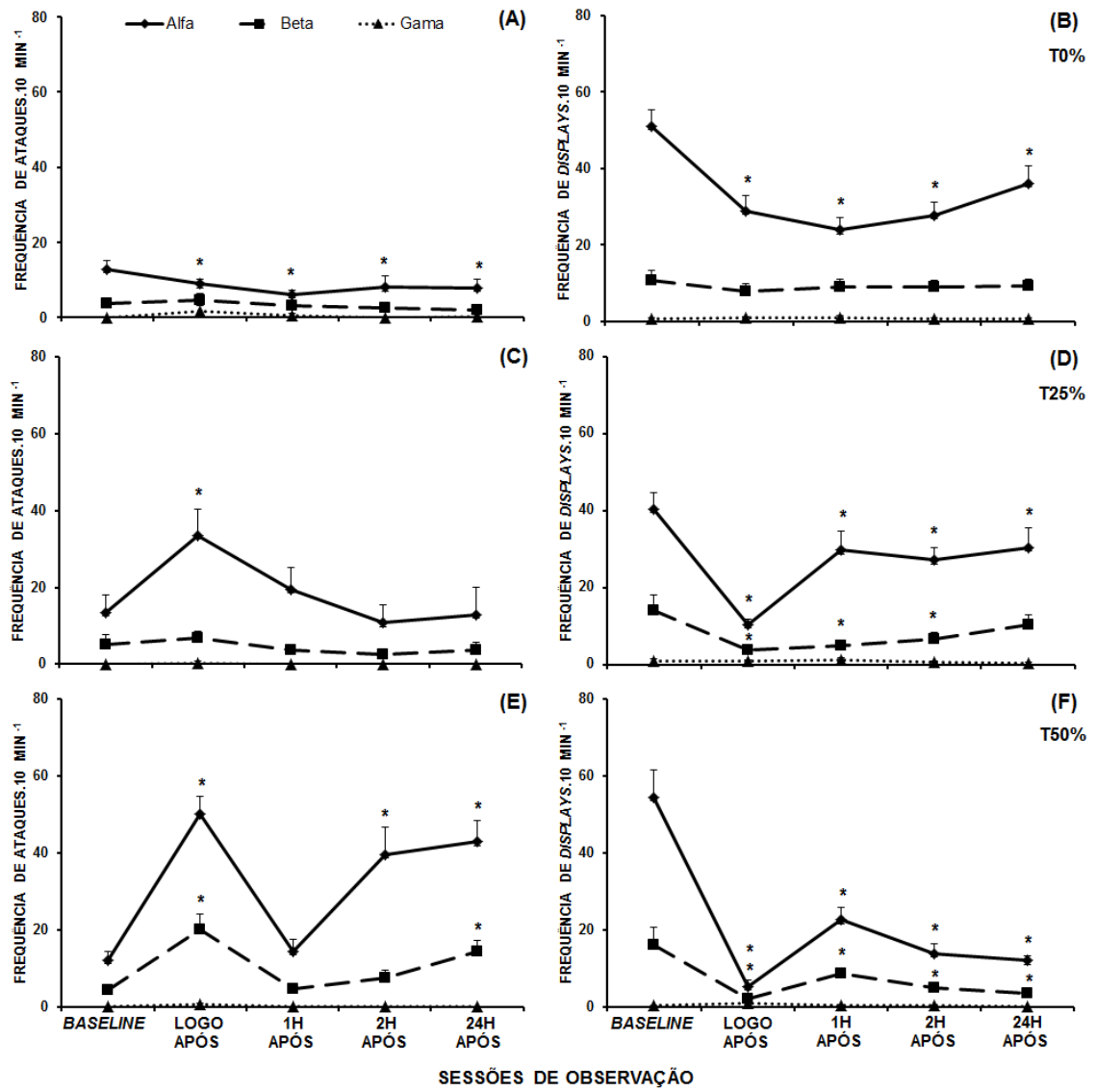


Tabela 1: Etograma da interação agressiva em *P. scalare*.

Comportamento	Descrição
Ameaça lateral	Um peixe com suas nadadeiras eriçadas e a boca aberta se aproxima lateralmente do seu oponente, que se afasta.
Exibição frontal	Dois peixes posicionam-se frente a frente, sem contato e com as cabeças levantadas (ângulo em torno de 45°).
Ondulação	Peixe ondula vigorosamente o corpo no sentido ântero-posterior, sem eriçar as nadadeiras.
Mordida no corpo	O agressor nada em direção ao seu oponente e morde seu corpo.
Ataque frontal	Dois peixes se aproximam frontalmente com suas bocas abertas e mordem a boca do oponente. As bocas permanecem unidas e os peixes se empurram.
Perseguição	Um peixe vai em direção ao oponente que nada em direção oposta.

Renovação da água do aquário não aumenta interações agressivas no ciclídeo *Cichlasoma paranaense*

Ana C. S. Gauy ^{1,2*} and Eliane Gonçalves-de-Freitas ^{1,2}

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

² Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP

*E-mail de correspondência: ana.gauy@gmail.com

RESUMO

Os peixes ciclídeos geralmente sinalizam a posição social pela comunicação visual e química. O padrão de resposta à sinalização química pode variar dependendo da espécie. Entretanto, a maioria dos estudos tem sido feito com ciclídeos africanos. Neste estudo, testamos a resposta à sinalização química em grupos do ciclídeo neotropical *Cichlasoma paranaense* por meio da renovação de água do aquário. Nós mostramos que a renovação não aumenta as interações agressivas dentro do grupo. Além disso, a renovação de 50% da água do aquário aparentemente diminui as interações agressivas nessa espécie, ao contrário de outras espécies de ciclídeos, como a tilápia-do-nilo e o acará-bandeira, indicando uma diferença interespecífica na resposta agressiva à renovação de água.

PALAVRAS-CHAVE: posição social, comunicação química, ciclídeos, sinais sociais.

ABSTRACT

Cichlid fish usually signalize social rank by visual and chemical communication. The standard response to chemical signaling may vary according to the species. The most of the studies, however, have been running with African cichlids. In this study, we tested the response to chemical signaling in social groups of the Neotropical cichlid *Cichlasoma paranaense* by renewing aquarium water. We showed that the water changing does not increase aggressive interactions within the group species. In addition, the renewal of 50% of the aquarium water apparently reduces aggressive interactions in this species, unlike other cichlid species such as Nile tilapia and angelfish, indicating an interspecific difference on aggressive response to water renewal.

KEY-WORDS: social position, chemical communication, cichlids, social signals.

1. Introdução

A comunicação química é utilizada por peixes ciclídeos em vários contextos sociais (Keller-Costa *et al.*, 2015) envolvendo reprodução (e.g. Giaquinto *et al.*, 2010; Huertas *et al.*, 2014), alarme (e.g. Jordão & Volpato, 2000; Giaquinto & Hoffmann, 2010; Barcellos *et al.*, 2014), reconhecimento de coespecíficos, tanto entre adultos (e.g. Plenderleith *et al.*, 2005; Thünken *et al.*, 2009), quanto entre jovens-adultos, influenciando no cuidado parental (e.g. Wisenden & Dye, 2009; Wisenden *et al.*, 2014).

O uso de sinais químicos como sinalizadores da posição social também é conhecido e vem sendo estudado principalmente em ciclídeos africanos: *Oreochromis mossambicus* (e.g. Barata *et al.*, 2007), *Oreochromis niloticus* (e.g. Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008) e *Astatotilapia burtoni* (e.g. Maruska & Fernald, 2012). Barata *et al.* (2007) demonstraram que machos de tilápia mossambica (*O. mossambicus*) estocam urina e a utiliza para sinalizar sua posição dominância. Esse comportamento modula a agressividade em machos rivais, contribuindo para a estabilidade da hierarquia social. De acordo com Giaquinto & Volpato (1997), a ausência de sinais químicos impede ou retarda o estabelecimento da hierarquia de dominância em tilápia-do-nylo. Adicionalmente, Gonçalves-de-Freitas *et al.* (2008), demonstraram que a renovação de água do aquário dilui prováveis sinais químicos na água, os quais atuam no reconhecimento da posição social dos indivíduos e na estabilidade da hierarquia na tilápia-do-nylo (*O. niloticus*). Maruska & Fernald (2012) demonstraram que machos dominantes de *A. burtoni* aumentam a frequência de urina liberada e de comportamentos territoriais na presença de outro macho, sugerindo que sinais químicos podem dar informações do status de dominância do indivíduo.

Apesar do conhecimento razoavelmente detalhado em ciclídeos africanos, pouco se conhece sobre esse mecanismo de manutenção da hierarquia em ciclídeos neotropicais. É possível que haja diferenças entre eles, uma vez que o mecanismo evolutivo favoreceu diferenças no comportamento social entre esses dois grandes grupos, i.e., africanos e neotropicais (e.g. Keenleyside, 1991; Barlow, 2000). Em estudo recente com um ciclídeo amazônico, o *Pterophyllum scalare* (Estudo 1 - dados não publicados), foi demonstrado que informações

químicas podem ser importantes para essa espécie comunicar sua posição social dentro do grupo. Quanto maior é a renovação da água do aquário (mais as informações químicas são diluídas), maior é o efeito e mais tempo é necessário para restaurar os níveis basais de agressão no grupo (Estudo 1 - dados não publicados).

De acordo com essas informações, podemos concluir que, dependendo da espécie, o padrão de resposta à sinalização da posição social pode mudar. Além disso, em estudos prévios realizados em nosso laboratório observamos algumas diferenças no comportamento agressivo do *Cichlasoma paranaense*, o que indica que o papel da comunicação química nessa espécie pode ser diferente de outras já estudadas. Por isso, este trabalho investigou o efeito da renovação da água sobre a agressividade e a estabilidade social e tais variações na resposta à comunicação química em uma espécie de ciclídeo neotropical o *C. paranaense* (Kullander 1983) (Perciformes, Cichlidae). Essa espécie é nativa da bacia do Alto Rio Paraná (Kullander, 2003) e seu comportamento social vêm sendo estudado em nosso laboratório. Além disso, o comportamento do *C. paranaense* é pouco conhecido e informações relacionadas com o efeito da renovação da água sobre as interações agressivas poderão auxiliar em propostas de manejo para aquariofilia e criação dessa espécie. A família Cichlidae apresenta uma grande variedade de espécies, cores, comportamentos e nichos, isso provavelmente reflete uma variedade na comunicação química (Keller-Costa *et al.*, 2015). Por isso, comparar espécies pode trazer informações mais abrangentes sobre os mecanismos de manutenção da organização social em ciclídeos.

2. Material e Métodos

2.1. Manutenção dos peixes

Os animais foram provenientes do Sítio São Bom Jesus, Ingás, Nova Granada, SP. Não há dimorfismo sexual evidente no *C. paranaense* (Figura 1A), por isso foram utilizados animais juvenis para evitar efeito do sexo sobre as interações agressivas, como observado por Carvalho & Gonçalves-de-Freitas (2008) para a tilápia-do-nilo.

Os animais foram aclimatados por 20 dias em caixas de água de polietileno (ca. 1 peixe/5L) com água na temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e regime de luz 12L:12E (das 07:00h às 19:00h). Os animais foram alimentados com ração comercial para peixes tropicais (Fri-Ribe® Peixes Tropicais, 28% de proteína bruta), duas vezes ao dia (8:00h e 18:00h), à saciedade aparente. A qualidade da água foi mantida por filtros biológicos Canister (filtração de 400 L/h) e aeração constante.

2.2. Delineamento experimental

Foi testado o efeito da renovação da água sobre a agressividade e a estabilidade social em grupos de três *C. paranaense* sem identificação de sexo, medindo de 60 a 80 mm (comprimento padrão) e pesando de 10 a 20 g. Os animais foram agrupados por três dias para o estabelecimento da hierarquia social e, no quarto dia foram submetidos a um dos dois tratamentos (n = 15 cada tratamento):

1) Renovação de 0% da água (controle); 2) Renovação de 50% da água (quantidade de renovação de água que tem o maior efeito em outras espécies de ciclídeos). Vamos nos referir a eles como T0% e T50%, respectivamente. Em ambos os tratamentos, 50% do volume da água do aquário foi retirado por um tubo plástico preso na lateral interna do aquário. No T0%, a mesma água retirada do aquário foi repostada, servindo como controle. No T50%, foi repostado 50% de água nova (Figura 1B). A água nova foi coletada de um aquário similar aos utilizados nos testes, com filtro biológico, aeração e na mesma temperatura, porém sem peixes. A água foi cuidadosamente colocada no aquário usando um béquer para que a interferência no comportamento dos peixes fosse minimizada.

Os animais foram agrupados durante cinco dias nos aquários experimentais. Os três primeiros dias de agrupamento serviram para o estabelecimento da hierarquia de dominância do grupo. No quarto dia, o comportamento agressivo foi filmado (10 min) antes da renovação (*baseline* – valores basais), logo após, 1 hora, 2 horas e 24 horas após a renovação (Figura 1C), para avaliar em diversos intervalos de tempo o efeito da renovação na interação agressiva e também o tempo de recuperação para os níveis basais. As filmagens foram feitas entre as 14:00h e 18:00h para evitar possíveis influências do ritmo circadiano. Esse período foi escolhido, pois se distanciava da primeira

alimentação, evitando também a influência da competição por alimento (Gómez-Laplaza & Morgan, 2003; Grobler & Wood, 2013).

2.3. Interação agressiva

As interações agressivas foram quantificadas por meio da frequência de comportamentos agressivos, com base no etograma descrito (Tabela 1) e ilustrado (Figura 2) previamente em nosso laboratório para o *C. paranaense*. Os comportamentos agressivos foram divididos em ataques (perseguição e fuga, golpe de cauda, ataque lateral, empurrão, puxão de nadadeira e confronto frontal) e *displays* (exibição lateral, ameaça lateral, ameaça frontal e ameaça perpendicular). Os ataques são unidades agressivas que envolvem contato físico direto e geralmente são seguidos de elevado gasto energético, enquanto os *displays* são as unidades agressivas que não envolvem contato físico e geralmente são seguidas de reduzido gasto energético (Haller & Wittenberger, 1988; Ros *et al.*, 2006).

2.4. Posição hierárquica e estabilidade social

A posição hierárquica foi inferida por meio do índice de dominância (ID = frequência de comportamentos agressivos emitidos pelo indivíduo / frequência total de comportamentos agressivos no grupo) como utilizado por Gonçalves-de-Freitas *et al.* (2008) para tilápia-do-nilo e também no Estudo 1 (dados não publicados) para o acará-bandeira. 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 (Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008). Foi verificado o ID para cada posição social durante os três primeiros dias de agrupamento e também no quarto dia, antes da renovação da água (*baseline*).

2.5. Detalhes experimentais

Antes do agrupamento os animais foram anestesiados com tricáína metanosulfonato (MS222) (20mg/L; e.g. Brandão *et al.*, 2015), pesados e medidos. A média (\pm E.P.) do comprimento padrão e peso dos peixes foram respectivamente: T0% - 68,5 \pm 0,8 mm; 14,13 \pm 0,55 g; T50% - 68,0 \pm 0,6 mm; 14,11 \pm 0,44 g. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o comprimento (one-way ANOVA, $F_{(1,28)} = 0,29$; $p = 0,59$) e peso ($F_{(1,28)} = 0,001$; $p =$

0,98). O coeficiente de variação dentro do grupo também foi similar entre os tratamentos para o comprimento ($F_{(1,28)} = 2,61$; $p = 0,12$) e peso ($F_{(1,28)} = 0,03$; $p = 0,85$).

Os animais foram identificados e destinados a um dos dois tratamentos. A identificação foi feita com VIE - Elastômero Fluorescente de Implante Visível (e.g. Ang & Manica, 2010; Brandão *et al.*, 2015). Neste procedimento, os animais foram mantidos sobre panos úmidos, a fim de evitar atrito e manter o muco natural preservado. 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. Eles foram observados em aquários (400 x 300 x 400 mm; ca. 48L) com as três paredes laterais cobertas por plástico azul afim de evitar contato visual entre animais de aquários adjacentes, somente a parede frontal não foi coberta para permitir as filmagens. A cor azul foi escolhida, pois reduz os níveis de cortisol em outra espécie de ciclídeo (Volpato & Barreto, 2001; Maia & Volpato, 2013). A temperatura da água foi $27 \pm 1^\circ\text{C}$, e o fotoperíodo foi 12L:12E (das 7:00h as 19:00h). O oxigênio da água foi mantido a $8,24 \pm 0,04$ ppm e o pH a $7,0 \pm 0,1$ (aferidos com medidores eletrônicos). Os níveis de amônia e nitrito foram medidos no final do experimento, a fim de mostrar que a renovação de 25% da água do aquário é eficiente para retirar esses compostos nitrogenados do ambiente (medidos com kits comerciais – LabconTest). Os níveis foram respectivamente: 0 ppm; $0,3 \pm 0,24$ ppm no T0%; 0 ppm; $0,15 \pm 0,1$ ppm no T50%. Os animais foram alimentados com a mesma ração utilizada durante a aclimatação, correspondente a 3% da biomassa, fornecida duas vezes ao dia (8:00h e 18:00h).

2.6. Análise dos dados

Inicialmente foram identificados os *outliers*, os quais foram retirados e substituídos pela média (Quin & Keough, 2002). Em seguida, foi testada a normalidade dos dados usando *Skewness* e *Kurtosis* (Lehner, 1996; Ha & Ha, 2012). Além disso, foi utilizado o teste Fmax para testar a homocedasticidade dos dados (Zar, 1999). Após, foi comparada a frequência de ataques e *displays* antes da renovação, logo após, 1h após, 2h após e 24h após a renovação de água por ANOVA para medidas repetidas, sendo os tratamentos as variáveis categóricas e as sessões de observação as medidas repetidas. Essa mesma comparação foi

feita para cada posição social (alfa, beta e gama), para testar o efeito da renovação de água na hierarquia social. O teste de Fisher LSD foi usado como teste *post hoc*. Foi considerado $p \leq 0,05$ para significância estatística.

3. Conduta 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 (CEUA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, São José do Rio Preto, SP (Proc. 083/2013).

4. Resultados

A hierarquia social foi rapidamente estabelecida nos três dias que precederam a manipulação de água. O índice de dominância foi próximo de 0,8 para o animal alfa e abaixo de 0,3 para os animais beta e gama, e permaneceu constante até o quarto dia antes da renovação da água (Figura 3).

4.1. Ataques

Uma interação significativa (tratamento vs sessões de observação) foi encontrada para a frequência de ataques (ANOVA para medidas repetidas, $F_{(4,112)} = 3,29$, $p = 0,01$; Figura 4A). No T0%, a frequência de ataques foi similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação de água ($p > 0,19$). No T50% a frequência de ataques também foi similar ao *baseline* em todas as observações após a renovação de água ($p > 0,16$), exceto 2h após a renovação, onde foi menor ($p = 0,03$). Além disso, a frequência de ataques foi similar entre os tratamentos em todas as observações ($p > 0,09$), exceto 2h após a renovação, onde foi menor no T50% ($p = 0,02$).

4.2. Displays

Interação significativa (tratamento vs sessões de observação) também foi encontrada para a frequência de *displays* ($F_{(4,112)} = 3,41$, $p = 0,01$; Figura 4B). No

T0%, a frequência de *displays* foi similar ao *baseline* em todas as sessões de observação após a renovação ($p > 0,44$), exceto 2h após a renovação, a qual foi maior ($p = 0,004$). No T50%, a frequência de *displays* foi maior com relação ao *baseline* logo após a renovação ($p = 0,008$) e foi similar nas demais sessões de observação ($p > 0,06$). Além disso, a frequência de *displays* foi similar entre os tratamentos em todas as observações ($p > 0,11$), exceto 2h após a renovação, onde foi menor no T50% ($p = 0,001$).

4.3. Efeito na posição social

T0%

Foi observado, para a frequência de ataques, um efeito significativo entre as posições sociais ($F_{(2,42)} = 50,07$, $p < 0,0001$; Figura 5A) e entre as sessões de observação ($F_{(4,168)} = 3,44$, $p = 0,01$), porém não houve diferença na interação (posição social vs sessões de observação, $F_{(8,168)} = 0,64$, $p = 0,74$). A frequência de ataques emitida pelo peixe alfa, beta e gama foi similar em todas as sessões de observação quando comparadas com o *baseline* ($p > 0,08$). Com relação à frequência de *displays*, foi observado um efeito significativo entre as posições sociais ($F_{(2,42)} = 49,04$, $p < 0,0001$; Figura 5B), porém não houve diferença entre as sessões de observação ($F_{(4,168)} = 1,67$, $p = 0,16$) e na interação (posição social vs sessões de observação, $F_{(8,168)} = 1,02$, $p = 0,42$). Não houve diferença na frequência de *displays* emitida pelos peixes alfa, beta e gama em todas as sessões de observação comparadas ao *baseline*.

T50%

Foi observado, tanto para a frequência de ataques, quanto para a de *displays*, um efeito significativo entre as posições sociais ($F_{(2,42)} = 91,69$, $p < 0,0001$ - ataques, Figura 5C; $F_{(2,42)} = 100,22$, $p < 0,0001$ - *displays*, Figura 5D), porém não houve diferença entre as sessões de observação ($F_{(4,168)} = 0,88$, $p = 0,47$ - ataques; $F_{(4,168)} = 1,93$, $p = 0,11$ - *displays*) e na interação (posição social vs sessões de observação, $F_{(8,168)} = 0,63$, $p = 0,75$ - ataques; $F_{(8,168)} = 1,41$, $p = 0,20$ - *displays*). Não houve diferença na frequência de ataques e *displays* emitida pelos peixes alfa, beta e gama em todas as sessões de observação comparadas com o *baseline*. Porém, 2h após a renovação houve uma diminuição da

frequência de ataques emitida pelo peixe alfa, a qual foi marginalmente significativa ($p = 0,06$).

5. Discussão

Este estudo mostrou que a renovação da água do aquário não aumenta as interações agressivas no *C. paranaense*, como ocorre em outras espécies de ciclídeos. Ao contrário, mostrou que a renovação de 50% da água aparentemente reduz as interações agressivas no grupo.

Foi observado que não houve diferença entre a frequência de ataques e de *displays* na observação antes da renovação de água entre os tratamentos, indicando que os três dias iniciais foram suficientes para o estabelecimento da hierarquia de dominância no grupo. Essa condição inicial semelhante, chamada *baseline*, é importante, para podermos admitir que os três tratamentos partiram de condições similares.

Após a renovação de água (T50%), não houve aumento das interações agressivas dentro do grupo no *C. paranaense*, sendo assim, não foi observado para essa espécie o mesmo padrão de resposta à sinalização química da posição social encontrada em outras espécies de ciclídeos. No acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*), por exemplo, a comunicação química parece ser um importante sinalizador da posição social dos animais, diminuindo as lutas dentro do grupo (Estudo 1 - dados não publicados). Em machos de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*), a comunicação química reduz as interações agressivas (Giaquinto & Volpato, 1997), enquanto a renovação de água aumenta as interações e desestabiliza a hierarquia social (Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008). Foi evidenciado, também, que machos dominantes de tilápia mossâmbica (*O. mossambicus*), aumentam a frequência de liberação de urina durante as interações agressivas, sinalizando sua posição social (Barata *et al.*, 2007, 2008) e reduzindo as interações agressivas (Keller-Costa *et al.*, 2016). Além disso, os sinais químicos que reduzem a agressão entre machos de tilápia mossâmbica são diferentes dos sinais químicos que estimulam a ovulação nas fêmeas (Keller-Costa *et al.*, 2016). Isso demonstra que existem sinais específicos para sinalizar a

posição social. Outra espécie que apresenta sinalização da posição social por meio da urina é *A. burtoni*, a qual aumenta a frequência de urina liberada na presença de um macho rival (Maruska & Fernald, 2012). Ao contrário dessas espécies, a diluição dos sinais químicos presentes no ambiente não aumenta as interações agressivas no grupo social em *C. paranaense*. Portanto, este estudo demonstrou que espécies, dentro da mesma família, apresentam diferentes mecanismos de comunicação social.

Foi observado também, que não há aumento das interações agressivas emitidas após a renovação de água por nenhuma das posições sociais (alfa, beta ou gama). Porém, foi observada uma diminuição da frequência de ataques emitida pelo peixe alfa 2h após a renovação de água (T50%), a qual foi marginalmente significativa, podendo indicar que o peixe alfa foi afetado com a renovação. Isso se assemelha ao que foi observado para o acará-bandeira, onde o peixe alfa foi o mais afetado com a renovação da água, porém, aumentando a emissão de ataques (dados não publicados - Estudo 1), ao contrário do *C. paranaense*. O Estudo 1 (dados não publicados) mostrou ainda, que o peixe beta também foi afetado com a renovação de 50% da água, aumentando a frequência de ataques emitidos, o que não aconteceu com o *C. paranaense*. Diferente, ainda, do que foi observado para o *C. paranaense*, machos submissos de tilápia-do-nilo aumentam a frequência de ataques emitidos aos dominantes quando há renovação da água do aquário (Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008). Isso reforça que essa espécie possui uma resposta diferente à renovação de água do que outras espécies de ciclídeos estudadas até o momento.

A frequência de ataques emitida pelo *C. paranaense* ao longo de todo o estudo foi alta e sempre maior que a frequência de *displays* (baixa em todo o estudo). O comportamento agressivo do *C. paranaense* não segue o padrão de resposta de lutas escalonadas, o qual é observado em outros animais, incluindo ciclídeos (Johnsson *et al.*, 2006). Esse padrão do comportamento agressivo do *C. paranaense* (frequência de ataques elevada e frequência de *displays* reduzida) foi observado em outro estudo em nosso laboratório, o qual foi realizado nas mesmas condições experimentais [e.g. água, aquários experimentais e grupo de três indivíduos (média da frequência de ataques = 40,7; frequência de *displays* = 9,1, em 10 min), dados não publicados]. Portanto pode ser um comportamento

característico dessa espécie. Além disso, a alta frequência de ataques observada ao longo do experimento pode ter ocorrido, pois os animais poderiam estar expressando uma frequência máxima de emissão de ataques, o que poderia explicar o fato de não ter sido observado aumento nessa frequência.

A tendência de redução das interações agressivas observada neste estudo pode ser interpretada como uma resposta generalizada de mudança de comportamento por alteração do ambiente. Por exemplo, juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*), diminuem as interações agressivas em um ambiente novo, e essa diminuição está relacionada a um estado de alerta dos animais (Serra *et al.*, 2015). Levando em conta que o *C. paranaense* tem um nível alto de agressão, esses indivíduos se tornam mais expostos no ambiente, assim uma mudança no meio pode ter causado a diminuição das interações agressivas, deixando o animal menos vulnerável. O ciclídeo *Crenicichla lepidota*, por exemplo, apresenta maior latência e menor frequência de ataques a coespecíficos em locais com ambiente perturbado por visitação turística do que em locais sem visitação (Bessa & Gonçalves-de-Freitas, 2014). Essa redução da resposta territorial foi atribuída à reação de medo, a qual tem sido demonstrada em outros estudos com peixes (e.g. Yue *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2011). Entretanto, são necessários estudos para testar essa hipótese, bem como melhor compreender o processo de comunicação social em *C. paranaense*. Apesar disso, este estudo demonstra, pela primeira vez, uma importante diferença interespecífica na resposta agressiva à renovação de água, que deve ser observada nos procedimentos de manutenção e criação de ciclídeos, bem como no entendimento da evolução desses mecanismos.

6. Referências

- Ang, T. Z. & A. Manica. 2010. Unavoidable limits on group size in a body size-based linear hierarchy. *Behavioral Ecology*, 21: 819-825.
- Barata, E. N., J. M. Fine, P. C. Hubbard, O. G. Almeida, P. Frade, P. W. Sorensen & A. V. M. Canário. 2008. A sterol-like odorant in the urine of Mozambique Tilapia

males likely signals social dominance to females. *Journal of Chemical Ecology*, 34: 438-449.

Barata, E. N., P. C. Hubbard, O. G. Almeida, A. Miranda & A. V. M. Canário. 2007. Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Bio Med Center Biology*, 5: 54.

Barcellos, L. J. G., G. Koakoski, J. G. S. da Rosa, D. Ferreira, R. E. Barreto, P. C. Giaquinto & G. L. Volpato. 2014. Chemical communication of predation risk in zebrafish does not depend on cortisol increase. *Scientific Reports*, 4: 5076.

Barlow, G. W. 2000. *The cichlid fishes: Nature's grand experiment in evolution*. Cambridge, Massachusetts, Perseus Publishing, 352p.

Bessa, E. & E. Gonçalves-de-Freitas. 2014. How does tourist monitoring alter fish behavior in underwater trails? *Tourism Management*, 45: 253-259.

Brandão, M. L., V. A. Braithwaite & E. Gonçalves-de-Freitas. 2015. Isolation impairs cognition in a social fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 171: 204-210.

Carvalho, T. B. & E. Gonçalves-de-Freitas. 2008. Sex group composition, social interaction, and metabolism in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Biology*, 68: 807-812.

Giaquinto, P. C. & A. Hoffmann. 2010. Role of olfaction and vision cues in feeding behavior and alarm reaction in the catfish pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. *Journal of Ethology*, 28: 21-27.

Giaquinto, P. C. & G. L. Volpato. 1997. Chemical Communication, Aggression, and Conspecific Recognition in the Fish Nile Tilapia. *Physiology & Behavior*, 62: 1333-1338.

Giaquinto, P. C., C. M. S. Berbert & H. C. Delicio. 2010. Female preferences based on male nutritional chemical traits. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64: 1029-1035.

Gómez-Laplaza, L. M. & E. Morgan. 2003. The influence of social rank in the angelfish, *Pterophyllum scalare*, on locomotor and feeding activities in a novel environment. *Laboratory Animals*, 37: 108-120.

- Gonçalves-de-Freitas, E., F. B. Teresa, F. S. Gomes & P. C. Giaquinto. 2008. Effect of water renewal on dominance hierarchy of the Nile tilapia. *Applied Animal Behavior Science*, 112: 187-195.
- Grobler, J. M. B. & C. M. Wood. 2013. The physiology of rainbow trout in social hierarchies: two ways of looking at the same data. *Journal of Comparative Physiology B*, 183: 787-799.
- Ha, R. R. & J. C. Ha. 2012. Integrative statistics for the social & behavioral sciences. Thousand Oaks, SAGE Publications, Inc., 432p.
- Haller, J. & C. Wittenberger. 1988. Biochemical energetic of hierarchy formation in *Betta splendens*. *Physiology & Behavior*, 43: 447-450.
- Huertas, M., O. G. Almeida, A. V. M. Canário & P. C. Hubbard. 2014. Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *General and Comparative Endocrinology*, 196: 106-111.
- Johnsson, J. I., S. Winberg & K. A. Sloman. 2006. Social interactions. Pp. 151–196. In: Sloman, K. A., R. W. Wilson & S. Balshine (Eds.). *Behaviour and physiology of fish*. San Diego, Elsevier Inc.
- Jordão, L. C. & G. L. Volpato. 2000. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour*, 137: 681-690.
- Keenleyside, M. H. A. (Ed.). 1991. *Cichlid fishes: Behaviour, ecology and evolution*. New York, Chapman and Hall, 378p.
- Keller-Costa, T., A. V. M. Canário & P. C. Hubbard. 2015. Chemical communication in cichlids: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 221: 64-74.
- Keller-Costa, T., J. L. Saraiva, P. C. Hubbard, E. N. Barata & A. V. M. Canário. 2016. A multi-component pheromone in the urine of dominant male Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reduces aggression in rivals. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 173-182.
- Kullander, S. O. 2003. Cichlidae (Cichlids). Pp. 605–654. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris, Jr. (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs.

- Lehner, P. N. 1996. Handbook of ethological methods. Cambridge, Cambridge University Press, 694p.
- Maia, C. M. & G. L. Volpato. 2013. Environmental light color affects the stress response of Nile tilapia. *Zoology*, 116: 64–66.
- Martins, C. I. M., P. I. M. Silva, L. E. C. Conceição, B. Costas, E. Höglund, Ø. Øverli & J. W. Schrama. 2011. Linking fearfulness and coping styles in fish. *PLOS ONE*, 6: e28084.
- Maruska, K. P. & R. D. Fernald. 2012. Contextual chemosensory urine signaling in an African cichlid fish. *The Journal of Experimental Biology*, 215: 68-74.
- Plenderleith, M., C. V. Oosterhout, R. L. Robinson & G. F. Turner. 2005. Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish. *Biology Letters*, 1: 411-414.
- Quin, G. P. & M. J. Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. United Kingdom, Cambridge University Press, 537p.
- Ros, A. F. H., K. Becker & R. F. Oliveira. 2006. Aggressive behaviour and energy metabolism in a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Physiology & Behavior*, 89: 164-170.
- Serra, M., C. P. B. Wolkers & E. C. Urbinati. 2015. Novelty of the arena impairs the cortisol-related increase in the aggression of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Physiology & Behavior*, 141: 51-57.
- Thünken, T., N. Waltschky, T. C. M. Bakker & H. Kullmann. 2009. Olfactory self-recognition in a cichlid fish. *Animal Cognition*, 12: 717-724.
- Volpato, G. L. & R. E. Barreto. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1041-1045.
- Wisenden, B. D. & T. P. Dye. 2009. Young convict cichlids use visual information to update olfactory homing cues. *Behavioral Ecology Sociobiology*, 63: 443-449.
- Wisenden, B. D., E. A. Mammenga, C. N. Storseth & N. J. Berglund. 2014. Odour tracking by young convict cichlids and a mechanism for alloparental brood amalgamation. *Animal Behaviour*, 93: 201-206.

Yue, S., R. D. Moccia & I. J. H. Duncan. 2004. Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. *Applied Animal Behaviour Science*, 87: 343-354.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analyses*. New Jersey, Printice Hall, 663p.

7. Legendas das Figuras

Figura 1. A) *Cichlasoma paranaense*. Foto: Ana Carolina S. Gauy. B) Esquema da manipulação de água em cada tratamento. C) Esquema do delineamento experimental.

Figura 2. Etograma ilustrado da interação agressiva de *C. paranaense*. Ilustração: Angelo Rodrigo Manzotti.

Figura 3. Índice de dominância (média \pm E.P.) de cada peixe (alfa, beta e gama) antes da renovação de água. A) T0%; B) T50%.

Figura 4. Frequência (média \pm E.P.) de ataques (A) e *displays* (B) ao longo do tempo, nas observações após a renovação, em cada tratamento. Asterisco indica diferença significativa em relação à observação antes da renovação de água (*baseline*) dentro de cada tratamento. Letras comparam as observações entre os tratamentos. Valores seguidos por ao menos uma mesma letra não diferem significativamente (ANOVA para medidas repetidas, seguida de Fisher LSD para comparações múltiplas).

Figura 5. Frequência (média \pm E.P.) de ataques e *displays* de cada peixe (alfa, beta e gama) em cada tratamento. T0%: frequência de ataques (A), frequência de *displays* (B). T50%: frequência de ataques (C), frequência de *displays* (D). (ANOVA para medidas repetidas, seguida de Fisher LSD para comparações múltiplas).

8. Figuras e Tabelas

Figura 1.

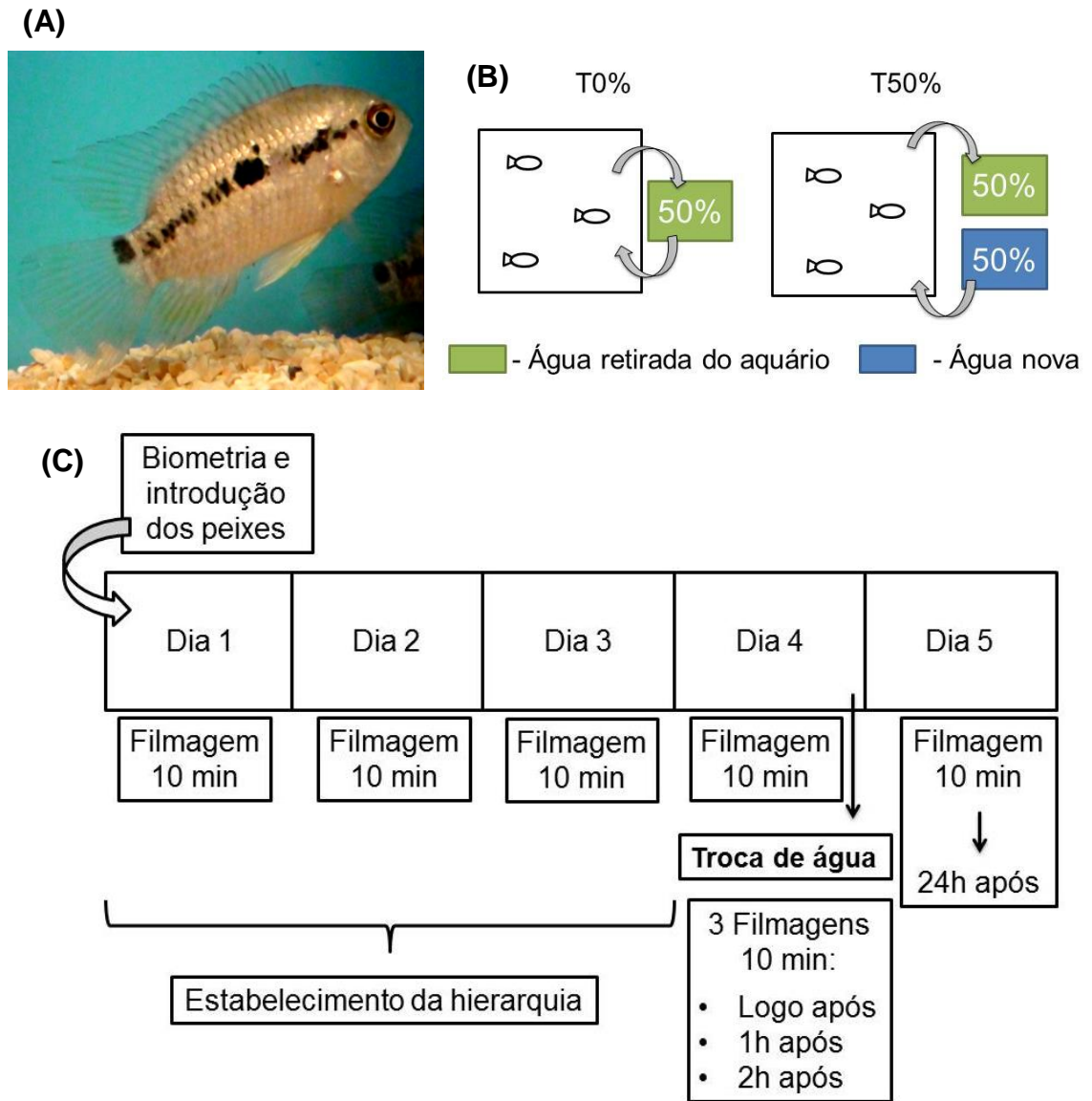


Figura 2.

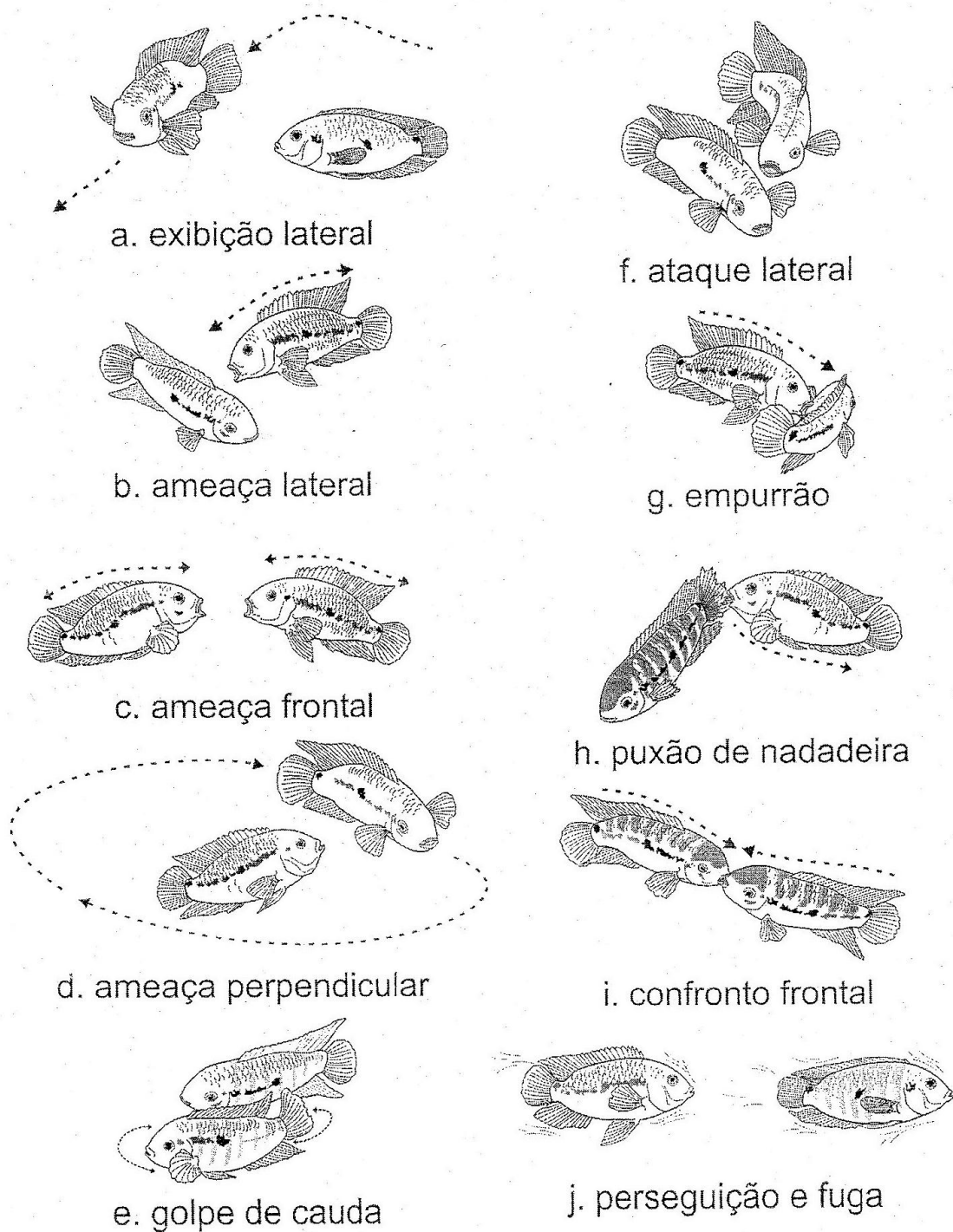


Figura 3.

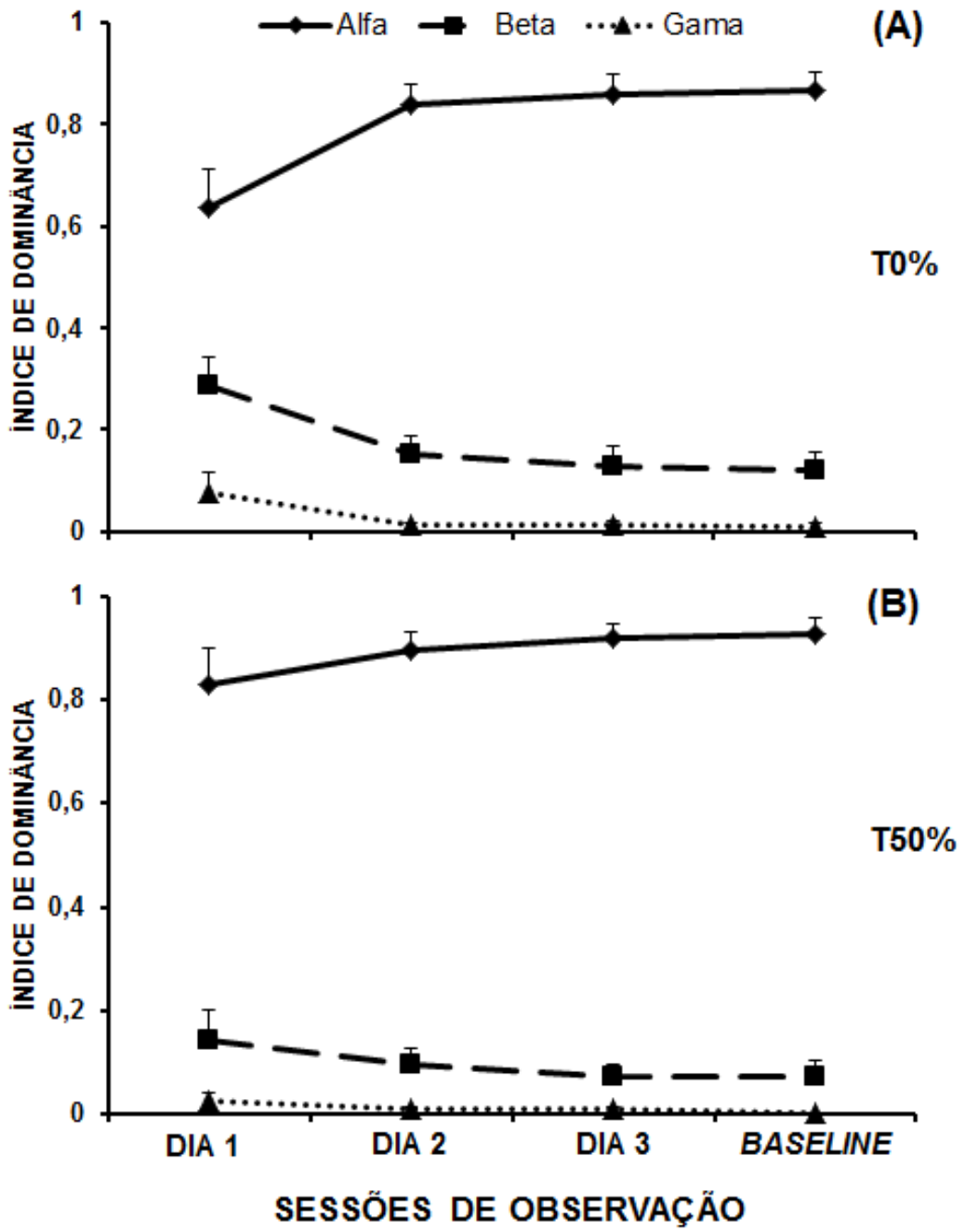


Figura 4.

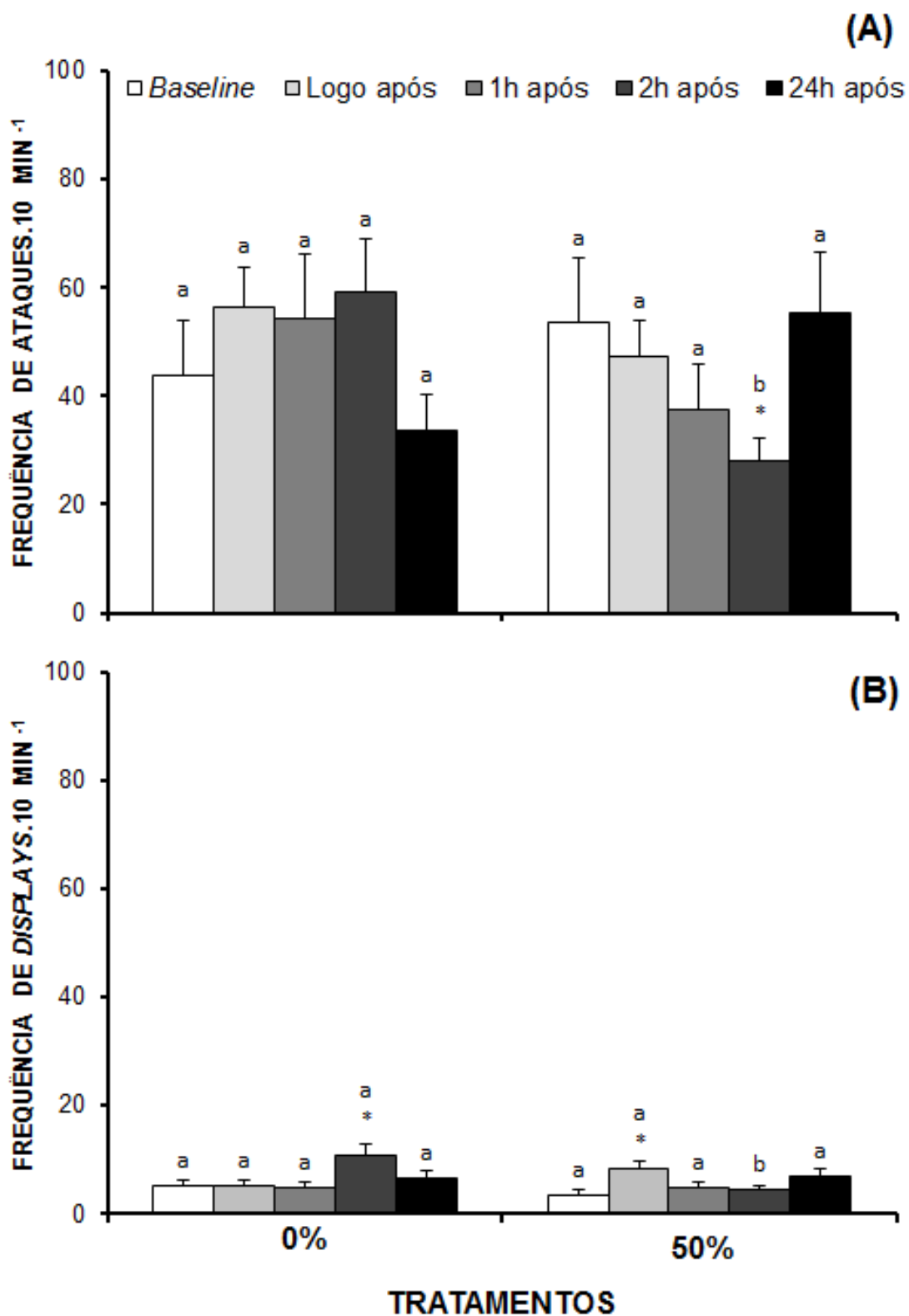


Figura 5.

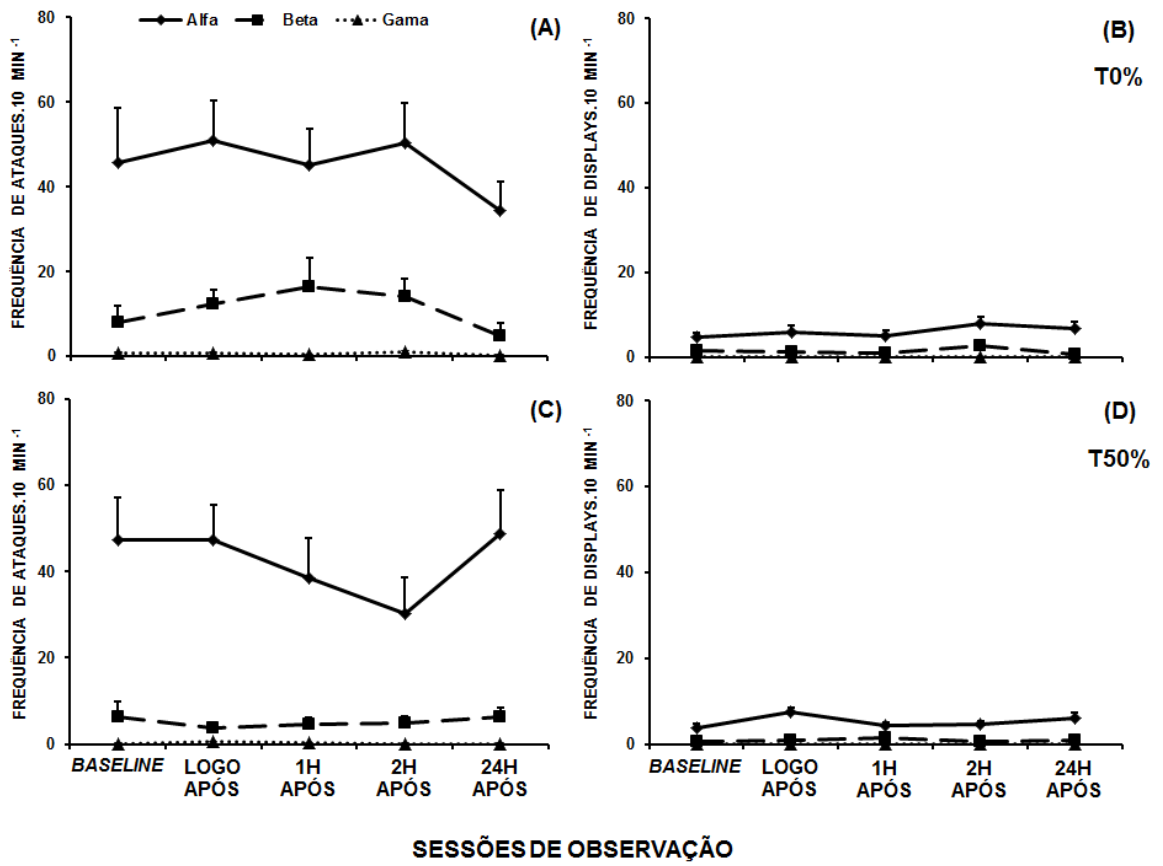


Tabela 1: Etograma da interação agressiva em *C. paranaense*.

Comportamento	Descrição
Exibição lateral	Um peixe posiciona-se próximo ao oponente, eriça as nadadeiras e abre os opérculos expondo a porção lateral de seu corpo.
Ameaça lateral	Um peixe aproxima-se rapidamente de seu oponente, que se afasta.
Ameaça frontal	Dois peixes posicionam-se frente a frente sem abrir os opérculos, cada um com a boca aberta, o corpo inclinado (em torno de 45°) e cabeça para cima. Não ocorre contato físico.
Ameaça perpendicular	Um peixe fica no centro do aquário enquanto o outro nada em trajetória circular ao seu redor. O peixe do centro abre o opérculo e acompanha com a cabeça a trajetória do oponente sem sair do lugar.
Perseguição e fuga	Um peixe nada em direção ao oponente que foge.
Golpe de cauda	Um peixe ou ambos ondulam intensamente o corpo antero-posteriormente contra o oponente.
Ataque lateral	Um peixe aproxima-se nadando paralelamente ao oponente e bate com a boca aberta no corpo do oponente.
Empurrão	Um peixe com a boca aberta toca a lateral do corpo do oponente, deslocando-o.
Puxão de nadadeira	Um peixe prende a nadadeira (pélvica, dorsal, anal ou caudal) do oponente com a boca e a puxa, deslocando o oponente em sua direção.
Confronto frontal	Dois peixes aproximam-se frontalmente com a boca aberta e se tocam ou mordem suas maxilas ou mandíbulas. Eles podem descrever uma trajetória circular enquanto mantêm suas “presas”.