



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALEXANDRE DA SILVA

**COMPORTAMENTO SOCIAL DE *Serrapinnus notomelas* E  
AVALIAÇÃO DO SEU BEM-ESTAR EM CATIVEIRO**

---

Londrina  
2018

ALEXANDRE DA SILVA

**COMPORTAMENTO SOCIAL DE *Serrapinnus notomelas* E  
AVALIAÇÃO DO SEU BEM-ESTAR EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Robalinho Lima

Coorientador: Prof. Dr. Fernando C. Jerep

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

da Silva, Alexandre.

Comportamento social de *Serrapinnus notomelas* e avaliação do seu bem-estar em cativeiro / Alexandre da Silva. - Londrina, 2018.  
99 f. : il.

Orientador: Marcos Robalinho Lima.

Coorientador: Fernando C. Jerep.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018. Inclui bibliografia.

1. Comportamento animal - Tese. 2. Hierarquia de dominância - Tese. 3. Sinalização animal - Tese. 4. Etologia aplicada - Tese. I. Lima, Marcos Robalinho. II. Jerep, Fernando C.. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

ALEXANDRE DA SILVA

**COMPORTAMENTO SOCIAL DE *Serrapinnus notomelas* E  
AVALIAÇÃO DO SEU BEM-ESTAR EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marcos Robalinho Lima  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lilian Tonelli Manica  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 17 de abril de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Marcos Robalinho Lima e Fernando Jerep, que proporcionaram que eu trabalhasse com o que mais me atrai no mundo natural: o fascinante estudo do comportamento animal. Tivemos muitas dificuldades ao longo do caminho, mas sempre em conjunto encontrávamos as soluções e alternativas possíveis. Todo esforço foi válido!

Aos meus familiares: minha avó Nair, tia Roseli, primos Henrique e Jaqueline, amados pais Luiz e Irony e meus irmãos, André e Guilherme. Obrigado por compreenderem minha falta de tempo durante o período da pós-graduação, e sei que estavam me apoiando sempre.

Agradeço a todos os amigos que fiz na UEL e em Londrina, em especial aos que mais estiveram presente ao longo do tempo: Tiago “Espanhol” Henrique, Géssi Gonzaga, Gabriela “Mordiscada” Silva, Jéssica “Jess” Azevedo, o casal Carlos “Dudinha” Eduardo e Hanny Duffeck (e claro, à recém-chegada Aurora!), Caroline “Carol” Rodrigues, Douglas “Beißola” Venancio, o casal Érika e Fernando Niekawa, Douglas “Dodô” Soda, Érika Soda, Vidal Arlequim, Thiago “Pumba” Gomes, Leandro “06” Rossini, Daniel Alves, Stephany “Raji” Piquina, Adriano Hoshino e Fernando Hata. Não posso deixar de mencionar Diego “Kakatuá” Lima, que tomou novos caminhos, mas sempre marcou presença, mesmo à distância.

Aos amigos da pós-graduação: Carolina Vizintim, Juliana Tambani, Fernando Farias, Victor Lucas, Carolina “Carol” Blefari, Guilherme Figueiredo e Hilton Fabrício.

À minha querida amiga Alana Padia, tenho certeza que ainda nos encontraremos muito pelas estradas da vida.

Aos recém-casados Eduardo Poloni e Nathalia Pimentel, desejo toda felicidade. Obrigado por ter me ensinado a cozinhar e, por isso, eu não morrer de fome durante os estudos, Eduardo!

Ao amigo Thiago “Mijimim” Takizawa, que merece menção à parte como minha forma de desculpas por ter lhe deixado fora dos agradecimentos do TCC, não tive a intenção.

Aos amigos de Telêmaco Borba: Marco “Marquinho” Antonio de Souza, Márcio Romão, Alessandro Gomes e André Gomes. Espero estar com vocês ainda em muitos churrascos.

Aos professores Oscar Shibatta e Lilian Manica, que prontamente aceitaram compor minha banca. Aos professores Paulo Meletti e Gustavo Teixeira pela suplência.

Aos técnicos da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, Valdenir Silva, Jurandir Batista e Heitor Frossard, pelas frequentes contribuições e convivência durante a realização dos experimentos.

A todos que contribuíram em algum momento no desenvolvimento deste trabalho, seja na parte prática (coleta dos peixes, materiais utilizados, ajuda no laboratório...) ou teórica (sugestões de experimentos e auxílio na estatística): Aparecido de Souza, Alexander Garcia, Clayton Fukakusa, Rony Suzuki, Lucas Jarduli, Nathália Santiago, Nicolý Costa, Tatiana Motta-Tavares, Ricardo Adelino e Larissa Corsini.

A todos que me deram carona tanto nas idas quanto (principalmente) nos retornos da Piscicultura da UEL, minha gratidão.

À Universidade Estadual de Londrina, que tornou possível a realização dos experimentos, e à CAPES pelo suporte financeiro.

*“Yeah, well - the Dude abides.”*

Jeffrey “The Dude” Lebowski em *The Big Lebowski*,  
de Joel e Ethan Coen (1998)

SILVA, Alexandre da. **Comportamento social de *Serrapinnus notomelas* e avaliação do seu bem-estar em cativeiro**. 2018. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A socialidade animal é um atributo fundamental do comportamento de muitas espécies de vertebrados. A competição intraespecífica por recursos, intensificada pela vida social em grupo, levou ao surgimento de comportamentos agonísticos nos animais. As interações agonísticas intragrupo resultam na formação de hierarquias de dominância, com o surgimento de relações dominantes-submissos. Por meio de sinalizações intraespecíficas (químicas, auditivas ou visuais), os indivíduos podem indicar seu *status* social aos coespecíficos, com potencial para estabilizar os conflitos individuais. Essas relações comportamentais devem ser levadas em consideração quando animais sociais são mantidos em cativeiro, pois podem impactar negativamente o bem-estar dos grupos. Nesse contexto, o capítulo 1 desta dissertação investigou a possível estabilização de uma hierarquia social em cardumes de *Serrapinnus notomelas*, um caracídeo Neotropical, bem como se ocorre sinalização visual de dominância através do escurecimento dos olhos dos indivíduos. Não verificamos uma estabilização hierárquica nos grupos sociais analisados, como também não encontramos evidências de que os olhos escurecidos são uma sinalização de dominância. Nossos resultados indicaram que os olhos escurecidos não são utilizados na comunicação de dominância intragrupo em *S. notomelas*. No capítulo 2, nós avaliamos o bem-estar da espécie em laboratório, por meio da mensuração de interações agonísticas e do forrageamento dos animais. Mensuramos esses aspectos comportamentais dos animais em aquários contendo diferentes níveis de enriquecimento ambiental em comparação com um aquário sem enriquecimento. Os mesmos comportamentos foram quantificados em grupos de diferentes tamanhos. Não encontramos influência do enriquecimento ambiental sobre o comportamento agonístico e alimentar da espécie. O aumento do tamanho do grupo também não teve efeito sobre a agressividade dos indivíduos, porém o aumento do tamanho do cardume promoveu uma maior intensidade de forrageamento. Nossos resultados reforçam que as respostas comportamentais dos peixes cativos, seja em relação ao enriquecimento ambiental ou ao tamanho do grupo, são espécie-específicas.

**Palavras-chave:** Comportamento animal. Socialidade. Interações agonísticas. Hierarquia de dominância. Sinalização animal. Etologia aplicada.

SILVA, Alexandre da. **Social behavior of *Serrapinnus notomelas* and evaluation of their welfare in captivity.** 2018. 99p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Animal social biology is a fundamental attribute of the behavior of many vertebrate species. Intraspecific competition for resources, increased by social life, caused the emergence of agonistic behaviors in animals. The agonistic interactions among group members result in the formation of dominance hierarchies, with the advent of dominant-submissive relations. Through intraspecific signaling (including chemical, acoustic and visual), individuals can demonstrate their social status to conspecifics, with the potential of stabilizing individual conflicts. These behavioral relationships must be taken into consideration when social animals are housed in captivity, because they can negatively impact the well-being of animal groups. In this context, chapter 1 of this dissertation investigated the possible stabilization of a social hierarchy in shoals of *Serrapinnus notomelas*, a Neotropical characid, as well as if occurs visual sign of dominance through the darkening of the eyes of the individuals. We did not find a hierarchical stabilization in the analyzed social groups, nor did we find evidence that darkened eyes as a sign of dominance. Our results indicated that darkened eyes are not used for intragroup dominance communication in *S. notomelas*. In chapter 2, we evaluated the well-being of the species in the laboratory, by measuring agonistic interactions and foraging activity of animals. We measure these behavioral aspects of animals in tanks containing different levels of environmental enrichment compared to a tank without enrichment. The same behaviors were quantified in groups of different sizes. Environmental enrichment did not influence the agonistic and feeding behavior of the species. Also, group size had no effect on the aggressiveness of the individuals, however, the larger shoal size promoted a greater intensity of foraging activity. Our results reinforce that the behavioral responses of captive fish, whether in relation to environmental enrichment or group size, are species-specific.

**Keywords:** Animal behaviour. Sociality. Agonistic interactions. Dominance hierarchy. Animal signaling. Applied ethology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1** - Exemplares de *Serrapinnus notomelas*, fêmea (acima) e macho (abaixo). Observe o dimorfismo sexual na espécie: a base da nadadeira anal é convexa em sua região anterior nos machos e retilínea nas fêmeas, cujos corpos são mais altos, tendendo a um formato oval, enquanto o macho possui um corpo que tende a ser mais alongado. Barra de escala = 5 mm ..... 34
- Figura 1.2** - Materiais adicionados aos aquários experimentais I e II, criando uma área estruturada com o propósito de incentivar a disputa por recursos entre os indivíduos de *S. notomelas*, levando ao surgimento de relações dominantes-submissos. Em segundo plano, exemplares envasados da macrófita *Vallisneria gigantea* e bandeja contendo areia, em primeiro plano uma bandeja contendo cascalho e outra bandeja contendo folhas secas/folhíço..... 37
- Figura 1.3** - Exemplo de olho escurecido em *Serrapinnus notomelas* (esquerda). Note a mancha escura na região que compreende a íris/esclera. A imagem do centro mostra um indivíduo com ausência dessa característica. À direita, indicação das diferentes regiões apresentadas pela área exposta do globo ocular nessa espécie: (1) pupila; (2) íris e esclera. O número (3) indica a margem do olho ..... 38
- Figura 1.4** - Um *frame* de uma das filmagens realizadas para investigar se os olhos escurecidos em *S. notomelas* sinalizam dominância. O aquário foi setorizado em três partes iguais de 26,6 cm cada (note as faixas pretas fixadas na região externa do vidro anterior, delimitando-as). A região central foi considerada neutra, e ambos os lados opostos do aquário continham os potes de vidro transparente no quais eram colocados um animal com olho escurecido (Tratamento “OP”) ou sem escurecimento (Tratamento “ON”). A água do aquário não ultrapassava 21 cm de altura, impedindo o contato com a água presente nos potes ..... 42
- Figura 1.5** - Os baldes de plástico, que isolavam visualmente os potes de vidro transparente, utilizados durante o período de aclimação do experimento de investigação de sinalização de dominância por meio dos olhos escurecidos em *S. notomelas*. Após 3 h de aclimação, os baldes eram retirados e esperava-se 15 min antes de se iniciar a filmagem ..... 43

- Figura 1.6 -** As manchas cujas proporções (em %) foram calculadas nos indivíduos de *S. notomelas*: (1) mancha da nadadeira dorsal (proporção calculada em relação à própria nadadeira) e (2) mancha da base da nadadeira caudal (proporção calculada em relação ao corpo do peixe, excluindo-se as nadadeiras e a mandíbula). Escala da barra = 5 mm..... 46
- Figura 1.7 -** (A) Número de investidas registradas para os quatro cardumes de *S. notomelas* (A, B, C e D). É mostrada também as investidas realizadas somente pelos peixes com olhos escurecidos (OP, dados agrupados) e as investidas realizadas pelos animais dos quatro cardumes em conjunto. (B) Número de investidas agrupadas e discriminadas por sexo (macho = M, fêmea = F) e olhos escurecidos (machos com olhos escurecidos = MOP, fêmeas com olhos escurecidos = FOP). O tamanho amostral foi de quatro cardumes compostos por 12 peixes (razão sexual de 1:1)..... 50
- Figura 1.8 -** (A) Tempo médio de permanência na primeira posição dos grupos de *S. notomelas* para os machos (M), fêmeas (F), machos com olhos escurecidos (MOP) e fêmeas com olhos escurecidos (FOP). (B) Tempo médio de permanência na segunda posição dos grupos de *S. notomelas* para os mesmos tratamentos. A barra acima de cada coluna, em ambas as figuras, indica o desvio padrão. O tamanho amostral foi de quatro cardumes compostos por 12 peixes (razão sexual de 1:1)..... 52
- Figura 1.9 -** Tempo de permanência (média + DP), em cada tratamento, dos indivíduos de *S. notomelas* que transitavam livremente no aquário experimental. Os tratamentos consistiam de um peixe com ausência de olhos escurecidos (ON), um peixe com os olhos escurecidos (OP) e a área central do aquário, neutra (NE). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (\*\*\*)  $P < 0,001$ ) ..... 54
- Figura 1.10 -** Índice de dominância (i.e., a diferença entre investidas realizadas e recebidas, média  $\pm$  DP), calculado para os indivíduos de *S. notomelas* em nosso aquário experimental. Os tratamentos consistem de indivíduos com olhos escurecidos (OP), fêmeas (F) e machos (M). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas de Nemenyi (\*\*  $P < 0,01$ ) ..... 56

- Figura 2.1** - Aquário experimental com enriquecimento ambiental (A): (1) exemplares envasados de *Vallisneria gigantea*; (2) aglomerados suspensos de lã e (3) pequeno pedaço de tronco de madeira. Abaixo (B) o mesmo aquário sem adição de enriquecimento ambiental.....77
- Figura 2.2** - Materiais acrescentados ao enriquecimento ambiental inicial (experimento 1, Fig. 2.1A), tornando o tratamento altamente enriquecido utilizado no experimento 2: (1) dois galhos de árvore ramificados; (2) cano de PVC de coloração branca e (3) exemplar envasado da macrófita *Echinodorus* sp..... 80
- Figura 2.3** - Número médio de investidas registradas nos oito grupos de *S. notomelas* nos aquários enriquecidos e sem enriquecimento (A, experimento 1) e nos oito grupos nos aquários altamente enriquecidos e sem enriquecimento (B, experimento 2). A barra acima de cada coluna, em ambas as figuras, indica o desvio padrão..... 83
- Figura 2.4** - Média dos eventos de alimentação realizados pelos indivíduos de *S. notomelas* a partir do substrato, durante 3 min, nos aquários enriquecidos e sem enriquecimento (A, experimento 1), e nos aquários altamente enriquecidos e sem enriquecimento (B, experimento 2). A barra acima de cada coluna, em ambas as figuras, indica o desvio padrão ..... 84
- Figura 2.5** - Média da proporção *per capita* de investidas realizadas pelos indivíduos de *S. notomelas* compondo dois grupos de tamanhos distintos: seis e 12 animais. A barra acima de cada coluna indica o desvio padrão..... 85
- Figura 2.6** - Média da proporção *per capita* da contagem de tomadas de alimento a partir do substrato, durante 3 min, pelos indivíduos de *S. notomelas* compondo dois grupos de tamanhos distintos: seis e 12 animais. A barra acima de cada coluna indica o desvio padrão ..... 86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I</b> – Níveis de análise no estudo do comportamento animal .....	17
<b>Tabela II</b> – Exemplos de custos e benefícios potenciais da vida social.....	18
<b>Tabela 1.1</b> – Médias $\pm$ desvio padrão e resultados do teste $t$ (grau de liberdade = 22 para todos os testes) para os valores da concentração de O <sub>2</sub> , pH, condutividade e temperatura (variáveis medidas semanalmente, n = 12) registradas nos aquários experimentais I e II .....	48
<b>Tabela 1.2</b> – Médias $\pm$ desvio padrão das investidas registradas para os cardumes de <i>S. notomelas</i> para as diferentes categorias analisadas (olhos escurecidos = OP; fêmeas = F; machos = M; fêmeas com olhos escurecidos = FOP; machos com olhos escurecidos = MOP) semanalmente (n = 4) nos aquários experimentais. Para cada grupo e categoria, é mostrado também o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ , correlação entre a passagem do tempo e a agressividade dos animais), $t$ calculado (o grau de liberdade é igual a 2 para todas as análises) e $P$ -valor dos testes de correlação .....	48
<b>Tabela 1.3</b> – Médias $\pm$ desvio padrão para os valores da concentração de O <sub>2</sub> , pH, condutividade e temperatura (variáveis medidas semanalmente, aquário I, n = 7; aquário II, n = 9) registradas nos aquários experimentais .....	53
<b>Tabela 1.4</b> – Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão Beta. A variável resposta é a proporção da área escurecida da íris/esclera dos indivíduos de <i>S. notomelas</i> (n = 56), enquanto as variáveis preditoras são o sexo dos animais, o comprimento padrão, a maturação das gônadas, e as proporções das manchas da nadadeira dorsal e da base da nadadeira caudal .....	57
<b>Tabela 1.5</b> – Estimativa do parâmetro do modelo de regressão Beta. A variável resposta é a proporção da área escurecida da íris/esclera dos indivíduos machos de <i>S. notomelas</i> (n = 25), enquanto a variável preditora é o número de raios da nadadeira anal possuindo ganchos.....	57
<b>Tabela 2.1</b> – Médias, seguidas dos desvios padrões, e resultados do teste $t$ para os valores da concentração de O <sub>2</sub> , pH, condutividade e temperatura (variáveis medidas semanalmente, n = 5) registradas nos aquários experimentais I e II durante o PERÍODO DE ESTUDO.....	82

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	15
1.1	O ESTUDO DO COMPORTAMENTO ANIMAL .....	15
1.2	COMPORTAMENTO SOCIAL EM VERTEBRADOS .....	18
1.3	HIERARQUIAS E SINAIS DE DOMINÂNCIA EM VERTEBRADOS .....	20
1.4	BEM-ESTAR ANIMAL .....	22
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	30
	<b>RESUMO</b> .....	30
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1	Animais experimentais, condições em laboratório e registros comportamentais .....	33
3.2	Estabilização da hierarquia .....	36
3.3	Estruturação espacial e dominância .....	39
3.4	Escurecimento dos olhos, sinalização de dominância e agressividade .....	40
3.5	Escurecimento dos olhos e possível relação com características anatômicas, sexo e maturação de gônadas .....	44
3.6	Análises estatísticas .....	47
3.7	Aprovação ética .....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	47
4.1	Agressividade ao longo do tempo .....	47
4.2	Domínio sobre os recursos .....	51
4.3	Sinalização de dominância .....	53
4.4	Agressividade .....	54
4.5	Características anatômicas, sexo e maturação de gônadas .....	55
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	70
	<b>RESUMO</b> .....	70
<b>6</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	71
<b>7</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	75

7.1	Animais experimentais, condições em laboratório e registros comportamentais ....	75
7.2	Experimento 1: enriquecimento ambiental, comportamento agonístico e forrageamento .....	76
7.3	Experimento 2: maior nível de enriquecimento ambiental .....	78
7.4	Experimento 3: tamanho do grupo, comportamento agonístico e forrageamento ...	80
7.5	Análises estatísticas.....	81
7.6	Validação ética.....	81
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>82</b>
8.1	Parâmetros da água .....	82
8.2	Enriquecimento ambiental e agressividade.....	82
8.3	Enriquecimento ambiental e forrageamento .....	83
8.4	Tamanho do grupo, agressividade e forrageamento .....	85
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>92</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL<sup>1</sup>

## 1.1 O ESTUDO DO COMPORTAMENTO ANIMAL

O interesse dos seres humanos em estudar o comportamento dos animais ocorre desde tempos pré-históricos, a princípio para atender necessidades básicas para a sobrevivência, como defesa e alimentação, para domesticá-los ou simplesmente por curiosidade (Del-Claro, 2004). Esta área da ciência teve um crescimento acentuado no fim do século XIX, quando passou a ter uma perspectiva evolutiva após a publicação de *A Origem das Espécies* por Charles Darwin em 1859, e se consolidou ao longo do século XX, quando surgiram novos conceitos para se explicar a evolução do comportamento, como a seleção de parentesco, a aptidão abrangente e a teoria dos jogos (Yamamoto, 2007). Realizando uma ligação entre a fisiologia e a ecologia, o estudo do comportamento animal também contribuiu e trouxe aplicações ao estudo do comportamento humano, à neurociência, ao manejo do meio ambiente e dos recursos naturais e para o estudo do bem-estar animal, mostrando-se um campo científico com importância além de suas próprias fronteiras, vital e em crescimento (Snowdon, 1999).

Em um contexto biológico, comportamento pode ser definido como “respostas internamente coordenadas (ações ou ausência de ações) de organismos vivos inteiros (indivíduos ou grupos) para estímulos internos e/ou externos<sup>2</sup>” (Levitis et al., 2009). O desenvolvimento do comportamento nos animais é resultante de interações gene-ambiente, ou seja, o comportamento é uma característica fenotípica (Alcock, 2011). Uma importante abordagem no estudo do comportamento animal, em termos evolutivos, é a de relação custo-benefício: se

---

<sup>1</sup> Redigida parcialmente segundo as normas para submissão de artigo na revista *Applied Animal Behaviour Science*. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/applied-animal-behaviour-science/0168-1591/guide-for-authors>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

<sup>2</sup> Tradução própria do original “*the internally coordinated responses (actions or inactions) of whole living organisms (individuals or groups) to internal and/or external stimuli*”.

um comportamento for adaptativo, os benefícios de tal comportamento devem exceder os custos (Ha, 2010). “Benefícios” são mensurações de ganho energético, sobrevivência e reprodução, enquanto “custos” estão relacionados à reduções de energia e tempo disponível para a realização de comportamentos alternativos (Ha, 2010).

Analisar os aspectos comportamentais das diversas espécies animais implica em um conhecimento útil para conservação destas espécies na natureza (Blumstein e Fernández-Juricic, 2004). Sutherland (1998) enumera diversas áreas referentes à conservação nas quais o entendimento do comportamento animal pode contribuir diretamente para a resolução de problemas (e.g., comportamento de dispersão em habitats fragmentados, sexagem correta e tamanho ótimo de grupos em esquemas de reintrodução, técnicas de censo populacional baseadas na vocalização das espécies), incluindo a compreensão de comportamentos sociais e o manejo correto de animais em cativeiro. Segundo Berger-Tal et al. (2011), dentro do contexto da ecologia comportamental, há três classes de comportamentos que são fundamentais para a obtenção de alta aptidão em indivíduos de todas as espécies: (1) locomoção e padrões de uso espacial; (2) forrageamento e interações predador-presa e (3) comportamentos sociais e relacionados à reprodução. Devido à esses comportamentos influenciarem diretamente a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos, eles consequentemente fornecem informações valiosas sobre a dinâmica das populações e comunidades biológicas (Berger-Tal et al., 2011).

O biólogo holandês Nikolaas Tinbergen dividiu o estudo do comportamento animal em duas principais categorias (Tabela I), agrupadas em quatro questões principais. As duas primeiras são relacionadas às causas proximais do comportamento (abordam aspectos responsáveis pela forma e funcionamento de um animal que o tornam capaz de se comportar de determinado modo) e as outras duas relacionadas às causas distais (causas evolutivas de um

comportamento) (Alcock, 2011).

As quatro questões proposta por Tinbergen são: 1) como um animal usa suas habilidades sensoriais e motoras para ativar e modificar seus padrões comportamentais? 2) como o comportamento de um animal muda à medida que ele cresce, em resposta, principalmente, às experiências que teve durante seu amadurecimento? 3) como o comportamento possibilita que um animal sobreviva e se reproduza? 4) como o comportamento de um animal se compara ao comportamento de espécies proximamente aparentadas, e o que isso nos diz sobre as origens de seu comportamento e as mudanças que ocorreram durante a história da espécie?

**Tabela I.** Níveis de análise no estudo do comportamento animal.

<b>Causas proximais</b>	<b>Causas distais</b>
<p>1. Mecanismos genético-ontogenéticos</p> <p>Efeitos da hereditariedade no comportamento</p> <p>Desenvolvimento de sistemas sensorio-motores via interações gene-ambiente</p> <p>2. Mecanismos sensorio-motores</p> <p>Sistema nervoso para a detecção de estímulos ambientais</p> <p>Sistema endócrino para ajustar a resposta aos estímulos ambientais</p> <p>Sistema esquelético-muscular para executar as respostas</p>	<p>1. Caminhos evolutivos que levaram ao comportamento atual</p> <p>Eventos ocorridos durante a evolução, desde a origem do comportamento até o presente</p> <p>2. Processos seletivos que moldaram a história do comportamento</p> <p>Função anterior e atual do comportamento em promover o sucesso reprodutivo do indivíduo</p>

Fonte: citação direta da Tabela 1.1, do capítulo 1 de Alcock (2011).

## 1.2 COMPORTAMENTO SOCIAL EM VERTEBRADOS

O comportamento social dos animais é qualquer interação entre dois ou mais coespecíficos, ou todo comportamento de um indivíduo que exerça influência no comportamento de outros da mesma espécie (Tinbergen, 1953). Animais sociais vivem em grupo, os chamados grupos sociais, onde invariavelmente haverá custos e benefícios aos integrantes do agrupamento (Mendl e Held, 2001; Tabela II). Excetuando-se indivíduos geneticamente iguais, os interesses dos animais dentro dos grupos nunca são idênticos aos do grupo como um todo (Alexander, 1974). Portanto, o comportamento social evolui intragrupo quando há benefícios à aptidão individual (Hamilton, 1964a, 1964b, 1971; Smith, 1964; Trivers, 1971).

**Tabela II.** Exemplos de custos e benefícios potenciais da vida social.

<b>Custos</b>	<b>Benefícios</b>
Maior visibilidade dos indivíduos aos predadores	Defesa antipredatória via efeito de diluição ou via defesa mútua
Maior transmissão de doenças e parasitas entre os membros do grupo	Oportunidades de receber assistência de coespecíficos ao tratar dos patógenos
Maior competição por alimento entre os membros do grupo	Maior eficiência em forrageamento
Maior vulnerabilidade do macho ao adultério	Oportunidade para alguns machos tentarem adultério
Maior vulnerabilidade das fêmeas de sofrerem interferência em seu sucesso reprodutivo por outros indivíduos (e.g., infanticídio)	Oportunidade para ejetar ovos alheios, parasitar ninhos e interferir na reprodução de rivais

Fonte: adaptado da Tabela 13.1, do capítulo 13 de Alcock (2011).

Embora nem todas as formas de interação social sejam complexas ou de difícil interpretação, o comportamento social é um atributo fundamental da biologia de muitas espécies e tem sido o foco de extensas pesquisas (Blumstein et al., 2010). Nos peixes, a forma mais óbvia de

comportamento social é a formação de cardumes, que por definição é um grupo de peixes unidos por atração mútua (Shaw, 1978). Cardumes podem ser não-polarizados, quando os membros ocupam posições randômicas e movem-se em várias direções (mas permanecem juntos), ou polarizados, quando todos os membros se movem na mesma direção, nadam na mesma velocidade, espaçam-se entre si uniformemente e agem em concordância (Shaw, 1978). As principais funções dos cardumes são reduzir o sucesso de predadores, aumentar o sucesso de forrageamento, sincronizar o comportamento reprodutivo e aumentar a eficiência hidrodinâmica (Helfman et al., 2009). Muitas espécies de peixes não vivem em cardumes e formam territórios, que são defendidos de invasão por coespecíficos (Nelson, 2006). Em relação à comunicação intraespecífica, esta pode ser visual, acústica, química, tátil ou elétrica (Helfman et al., 2009).

Em anfíbios e répteis, estão presentes interações sociais que ocorrem por meio visual (movimentos dos membros e da cabeça, deslocamentos rápidos, exibição de coloração corporal e ameaças com a boca aberta), acústico (em especial sons vocais), químico (através de odores derivados de secreções glandulares) ou tátil (contato direto entre os indivíduos) (Vitt e Caldwell, 2014). Anfíbios geralmente formam agregações sociais apenas em períodos reprodutivos (Wells, 2007), mas essa característica parece estar presente em grande parte das espécies durante o estágio larval (Ferrari et al., 2007; Pizzatto et al., 2016). Répteis podem apresentar agregações sociais complexas, como espécies de lagartos do gênero *Egernia*. Esses lagartos formam núcleos familiares em que os indivíduos parecem utilizar sinais químicos para reconhecimento intragrupo (Gardner et al., 2001; O'connor e Shine, 2006). Gardner et al. (2016) revisaram a evolução da socialidade em Squamata e verificaram que sete famílias de répteis nessa ordem possuem espécies que formam grupos estáveis de longo prazo ou sazonais, e uma análise filogenética sugere que essa característica comportamental evoluiu diversas vezes nesse táxon.

As aves e os mamíferos são os dois grupos de animais vertebrados que mais demonstram comportamentos sociais complexos (Anacker e Beery, 2013; Nomura e Izawa, 2017). Dentre as interações sociais existentes nesses grupos, a comunicação vocal e visual foram e são extensivamente estudadas em ambos (Hollén e Radford, 2009; Penteriani e Delgado, 2017), e sabe-se que a comunicação química é largamente difundida entre os mamíferos (Brennan e Kendrick, 2006). Apesar de ter sido negligenciada por décadas nos estudos comportamentais de aves, essa última forma de interação social provavelmente também é relevante na vida social desses animais, segundo pesquisas recentes (e.g., Fracasso et al., 2018; Leclaire et al., 2017). O modo de desenvolvimento da prole parece ter tido importante influência na evolução da complexidade dos sistemas sociais encontrados em aves e mamíferos, onde um desenvolvimento altricial — jovens dependem de cuidado de adultos por um longo período, algo que demanda uma cognição social complexa — é a forma mais comum de desenvolvimento (Scheiber et al., 2017). Entretanto, um vínculo entre essa característica e o desenvolvimento da socialidade observada nesses vertebrados ainda não foi completamente estabelecido (Scheiber et al., 2017).

### 1.3 HIERARQUIAS E SINAIS DE DOMINÂNCIA EM VERTEBRADOS

A vida em grupo — e as constantes interações entre os coespecíficos que ela ocasiona — levou à evolução de comportamentos agressivos intraespecíficos associados à disputas por recursos (Holekamp e Strauss, 2016). O termo “comportamento agonístico” melhor define essas interações: ele aborda especificamente o equilíbrio de forças para atacar e fugir e comporta todas as instâncias de ataque e ameaça (comportamento agonístico ofensivo), bem como fuga e submissão (comportamento agonístico defensivo) (Huber e Brennan, 2011). Interações agonísticas que geram lesões ou outros danos físicos relevantes aos indivíduos envolvidos são relativamente raras no reino animal e, em geral, o ataque e a fuga são

“ritualizados” e incluem intimidações, blefes, exibições ou posturas de dominação, submissão e paralisação (Gottier, 1972; Lorenz, 2002; Nelson, 1974). As repetidas interações agonísticas entre membros de um grupo social resultam em relações assimétricas estáveis entre os indivíduos; sendo que uma propriedade emergente dessas interações repetidas é a formação de uma hierarquia de dominância que estrutura toda a sociedade (Holekamp e Strauss, 2016).

Quando as hierarquias de dominância são estabelecidas, a frequência de comportamentos agonísticos é reduzida entre indivíduos dominantes e subordinados (Kudryavtseva, 2000). Os animais com um alto *status* dentro da hierarquia obtêm prioridade no acesso a recursos críticos como abrigo, alimento e parceiros sexuais (Drews, 1993; Sloman e Armstrong, 2002). Desse modo, as funções adaptativas das hierarquias de dominância estáveis são principalmente a economia energética gerada aos membros do grupo e o desenvolvimento de estabilidade social (Holekamp e Strauss, 2016). Essa estruturação social é encontrada em todas as classes de vertebrados: peixes (e.g., Paull et al., 2010; Whiteman e Côté, 2004), anfíbios (e.g., Sacchi et al., 2015; Tobias et al., 2010), répteis (e.g., Brien et al., 2013; Bush et al., 2016), aves (e.g., Liker e Barta, 2002; Paz-y-Miño-C, 2004) e mamíferos (e.g., Anderson et al., 2016; Wittemyer e Getz, 2007).

O *status* social de dominância de um animal pode ser sinalizado para os demais membros do grupo, sendo um dos aspectos mais importantes da comunicação animal. Os sinais são transmitidos por uma diversidade de categorias de sinais, incluindo química, visual, auditiva e postural (Fernald, 2014). Se a sinalização é efetivamente realizada por um remetente com um *status* de dominância alto, e apropriadamente interpretada por um receptor que possui um grau mais baixo na hierarquia, essa interação será sutil e talvez imperceptível para um observador externo (van Staaden et al., 2011). Alternativamente, se o remetente e o receptor interpretam que a diferença competitiva entre eles é tênue, a interação social é prolongada,

umenta em intensidade e pode, em última instância, culminar em níveis de conflito aberto com sérias consequências físicas a um ou ambos os envolvidos (van Staaden et al., 2011). Por fim, hierarquias de dominância podem ser classificadas como lineares ou não-lineares. Uma hierarquia linear é caracterizada por um indivíduo que domina todos os outros indivíduos do grupo, um segundo indivíduo que é dominante sobre todos os demais, exceto o primeiro, e assim por diante, até o último indivíduo que é dominado por todos os outros (Chase et al., 2002). Se as relações dominante-submisso não obedecem a esse padrão, a hierarquia é classificada como não-linear (Chase et al., 2002). Um exemplo desta última forma de organização hierárquica é observado entre os machos do lagarto *Uta stansburiana* (Gray e McKinnon, 2007): indivíduos exibindo uma coloração laranja do pescoço usurpam e expulsam os machos com uma coloração azul de seus territórios reprodutivos. Estes, por sua vez, dominam os machos de pescoço amarelo na disputa por fêmeas. Já os machos amarelos conseguem invadir o território dos machos laranjas e se acasalar com as fêmeas presentes, sem ser notado pelo indivíduo dominante.

#### 1.4 BEM-ESTAR ANIMAL

Bem-estar é definido como “o estado do organismo durante as suas tentativas de se ajustar com o seu ambiente<sup>3</sup>” (Broom, 1986). Se tal ajuste é obtido com pouco gasto energético, o bem-estar do animal é satisfatório. Em contrapartida, se a adequação demandar muito tempo e energia, o bem-estar é considerado pobre. Esse conceito não tem sentido se aplicado aos animais em estado selvagem, mas apenas quando fatores antropogênicos influenciam a qualidade de vida dos animais (Oliveira e Galhardo, 2007). Exemplos de indicativos que caracterizam um bem-estar pobre são baixa expectativa de vida e de reprodução, alta taxa de

---

<sup>3</sup> Tradução própria do original “*The welfare of an individual is its state as regards its attempts to cope with its environment*”.

mortalidade juvenil e de infecções oportunistas e comportamentos estereotipados anormais (Clubb e Mason, 2003; Mason, 2010). Logo, nota-se que o bem-estar animal pode ser mensurado por medidas fisiológicas ou comportamentais (Broom, 1991).

A agressividade dos animais direcionada aos seus coespecíficos, bem como a atividade alimentar, também são indicadores comportamentais úteis para se determinar o nível de bem-estar, com uma baixa intensidade de comportamentos agonísticos e uma maior frequência de alimentação como parâmetros de um bem-estar elevado (Blaney e Wells, 2004; Devries et al., 2004; Hughes et al., 1997; Morimura e Ueno, 1999). Em animais sociais, tanto o forrageamento quanto a agressividade dos indivíduos podem sofrer influência do tamanho do grupo, portanto, deve se atentar à densidade de animais alocados em cativeiro, pois ela pode impactar negativamente o bem-estar (Estevez et al., 2007; Penning et al., 1993, Van Loo et al., 2001).

Um método comumente utilizado para incrementar o bem-estar em animais cativos é o enriquecimento ambiental, definido como uma melhoria no funcionamento biológico de tais animais resultante de modificações no seu ambiente (Newberry, 1995). Um ambiente mais semelhante ao encontrado na natureza (i.e., um ambiente heterogêneo) proporciona privacidade (dando a oportunidade do animal se esconder), promove o comportamento territorial em animais que apresentam tal característica e proporciona rotas de fuga levando, deste modo, a uma melhora nas relações sociais (Mason et al., 2007; Swaisgood e Shepherdson, 2005). As diversas técnicas de enriquecimento ambiental incluem a colocação de objetos (troncos, rochas, folhas, cordas, entre outros), vegetação, oferta diferenciada da alimentação (escondida, suspensa, itens novos) e estimulação dos sentidos (sons, cheiros de animais, brinquedos) (Almeida et al., 2008). O objetivo principal do enriquecimento é proporcionar ao animal em cativeiro condições que estimulem seu comportamento natural

(Frajblat et al., 2008), e tem sido largamente utilizado para melhorar o bem-estar de animais em sistemas de criação, em zoológicos e em laboratórios (Hoy et al., 2010; Newberry, 1995; Olsson e Dahlborn, 2002; Van de Weerd e Day, 2009).

Dentro do contexto das informações aqui apresentadas, o capítulo 1 da presente dissertação aborda a possível formação de uma hierarquia de dominância em grupos sociais da espécie de peixe Neotropical *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915) (Characiformes, Characidae), com a hipótese de sinalização de dominância através de escurecimento dos olhos dos indivíduos. No capítulo 2, é proposta a utilização da espécie em pesquisa laboratorial e, desse modo, o bem-estar da espécie foi mensurado em aquário, utilizando-se medidas comportamentais: interações agonísticas e forrageamento. A hipótese de um bem-estar aprimorado pelo método do enriquecimento ambiental foi avaliada, assim como a influência de variação no tamanho do grupo sobre a qualidade de vida da espécie em cativeiro.

## REFERÊNCIAS

- Alcock, J., 2011. Comportamento animal: uma abordagem evolutiva, nona ed. Artmed, Porto Alegre.
- Alexander, R.D., 1974. The evolution of social behavior. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5, 325–383.
- Almeida, A.M.R., Margarido, T.C.C., Monteiro Filho, E.L.A., 2008. Influência do enriquecimento ambiental no comportamento de primatas do gênero *Ateles* em cativeiro. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar* 11, 97–102.
- Anacker, A.M.J., Beery, A.K., 2013. Life in groups: the roles of oxytocin in mammalian sociality. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 1–10.
- Anderson, E.J., Weladji, R.B., Paré, P. 2016. Changes in the dominance hierarchy of captive female Japanese macaques as a consequence of merging two previously established groups. *Zoo Biol.* 35, 505–512.

- Berger-Tal, O., Polak, T., Oron, A., Lubin, Y., Kotler, B.P., Saltz, D., 2011. Integrating animal behavior and conservation biology: a conceptual framework. *Behav. Ecol.* 22, 236–239.
- Blaney, E.C., Wells, D.L., 2004. The influence of a camouflage net barrier on the behaviour, welfare and public perceptions of zoo-housed gorillas. *Anim. Welf.* 13, 111–118.
- Blumstein, D.T., Ebensperger, L.A., Hayes, L.D., Vásquez, R.A., Ahern, T.H., Burger, J.R., Dolezal, A.G., Dosmann, A., González-Mariscal, G., Harris, B.N., Herrera, E. A., Lacey, E. A., Mateo, J., McGraw, L.A., Olazábal, D., Ramenofsky, M., Rubenstein, D.R., Sakhai, S.A., Saltzman, W., Sainz-Borgo, C., Soto-Gamboa, M., Stewart, M.L., Wey, T.W., Wingfield, J.C., Young, L.J., 2010. Towards an integrative understanding of social behavior: new models and new opportunities. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 1–9.
- Blumstein, D.T., Fernández-Juricic, E., 2004. The emergence of conservation behavior. *Conserv. Biol.* 18, 1175–1177.
- Brennan, P.A., Kendrick, K.M., 2006. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 361, 2061–2078.
- Brien, M.L., Webb, G.J., Lang, J.W., McGuinness, K.A., Christian, K.A., 2013. Born to be bad: agonistic behaviour in hatchling saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Behaviour* 150, 737–762.
- Broom, D.M., 1986. Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.* 142, 524–526.
- Broom, D.M., 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* 69, 4167–4175.
- Bush, J.M., Quinn, M.M., Balreira, E.C., Johnson, M.A., 2016. How do lizards determine dominance? Applying ranking algorithms to animal social behaviour. *Anim. Behav.* 118, 65–74.
- Chase, I.D., Tovey, C., Spangler-Martin, D., Manfredonia, M., 2002. Individual differences versus social dynamics in the formation of animal dominance hierarchies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5744–5749.
- Clubb, R., Mason, G., 2003. Animal welfare: captivity effects on wide-ranging carnivores. *Nature* 425, 473–474.
- Del-Claro, K., 2004. *Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental*. Livraria Conceito, Jundiáí.

- Devries, T.J., Von Keyserlingk, M.A.G., Weary, D.M., 2004. Effect of feeding space on the inter-cow distance, aggression, and feeding behavior of free-stall housed lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 1432–1438.
- Drews, C., 1993. The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125, 283–313.
- Estevez, I., Andersen, I.L., Nævdal, E., 2007. Group size, density and social dynamics in farm animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 103, 185–204.
- Fernald, R.D., 2014. Communication about social status. *Curr. Opin. Neurobiol.* 28, 1–4.
- Ferrari, M.C., Messier, F., Chivers, D.P., 2007. First documentation of cultural transmission of predator recognition by larval amphibians. *Ethology* 113, 621–627.
- Fracasso, G., Tuliozi, B., Hoi, H., Griggio, M., 2018. Can house sparrows recognise familiar or kin-related individuals by scent?. *Curr. Zool.*, *in press*.
- Frajblat, M., Amaral, V.L.L., Rivera, E.A.B., 2008. Ciência em animais de laboratório. *Cienc. Cult.* 60, 44–46.
- Gardner, M.G., Bull, C.M., Cooper, S.J.B., Duffield, G.A., 2001. Genetic evidence for a family structure in stable social aggregations of the Australian lizard *Egernia stokesii*. *Mol. Ecol.* 10, 175–183.
- Gardner, M.G., Pearson, S.K., Johnston, G.R., Schwarz, M.P., 2016. Group living in squamate reptiles: a review of evidence for stable aggregations. *Biol. Rev.* 91, 925–936.
- Gottier, R.F., 1972. Factors affecting agonistic behavior in several subhuman species. *Genet. Psychol. Monogr.* 86, 177–218.
- Gray, S.M., McKinnon, J.S., 2007. Linking color polymorphism maintenance and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 71–79.
- Ha, R.R., 2010. Cost–Benefit Analysis, in: Breed, M.D., Moore, J. (Eds.), *Encyclopedia of Animal Behavior*, volume 1. Academic Press, Oxford, pp. 402–405.
- Hamilton, W.D., 1964a. The Genetical Evolution of Social Behaviour. I. *J. Theor. Biol.* 7, 1–16.
- Hamilton, W.D., 1964b. The Genetical Evolution of Social Behaviour. II. *J. Theor. Biol.* 7, 17–52.
- Hamilton, W.D., 1971. Geometry for the selfish herd. *J. Theor. Biol.* 31, 295–311.
- Helfman, G.S., Collette, B.B., Facey, D.E., Bowen, B.W., 2009. *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*, segunda ed. Wiley-Blackwell, Chichester.

- Holekamp, K.E., Strauss, E.D., 2016. Aggression and dominance: an interdisciplinary overview. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 12, 44–51.
- Hollén, L.I., Radford, A.N., 2009. The development of alarm call behaviour in mammals and birds. *Anim. Behav.* 78, 791–800.
- Hoy, J.M., Murray, P.J., Tribe, A., 2010. Thirty years later: enrichment practices for captive mammals. *Zoo Biol.* 29, 303–316.
- Huber, R., Brennan, P.A., 2011. Aggression, in: Huber, R., Bannasch, D.L., Brennan, P. (Eds.), *Aggression, Advances in Genetics*, v. 75. Academic Press, Boston, pp. 1–6.
- Hughes, B.O., Carmichael, N.L., Walker, A.W., Grigor, P.N., 1997. Low incidence of aggression in large flocks of laying hens. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 54, 215–234.
- Kudryavtseva, N.N., 2000. Agonistic behavior: a model, experimental studies, and perspectives. *Neurosci. Behav. Physiol.* 30, 293–305.
- Leclaire, S., Strandh, M., Mardon, J., Westerdahl, H. Bonadonna, F., 2017. Odour-based discrimination of similarity at the major histocompatibility complex in birds. *Proc. R. Soc. B* 284, 20162466.
- Levitis, D.A., Lidicker Jr., W.Z., Freund, G., 2009. Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour. *Anim. Behav.* 78, 103–110.
- Liker, A., Barta, Z., 2002. The effects of dominance on social foraging tactic use in house sparrows. *Behaviour* 139, 1061–1076.
- Lorenz, K., 2002. *On aggression*. Taylor & Francis Group, Londres.
- Mason, G.J., 2010. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. *Trends Ecol. Evol.* 25, 713–721.
- Mason, G., Clubb, R., Latham, N., Vickery, S., 2007. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102, 163–188.
- Mendl, M., Held, S., 2001. Living in Groups: an Evolutionary Perspective, in: Keeling, L.J., Gonyou, H.W. (Eds.), *Social Behaviour in Farm Animals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 7–36.
- Morimura, N., Ueno, Y., 1999. Influences on the feeding behavior of three mammals in the Maruyama Zoo: bears, elephants, and chimpanzees. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 2, 169–186.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, quarta ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Nelson, S.D., 1974. Review Section: Nature/Nurture Revisited I: A Review of the Biological Bases of Conflict. *J. Confl. Resolut.* 18, 285–335.

- Newberry, R.C., 1995. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 44, 229–243.
- Nomura, T., Izawa, E.I., 2017. Avian brains: Insights from development, behaviors and evolution. *Dev. Growth Differ.* 59, 244–257.
- O'connor, D.E., Shine, R., 2006. Kin discrimination in the social lizard *Egernia saxatilis* (Scincidae). *Behav. Ecol.* 17, 206–211.
- Oliveira, R.F., Galhardo, L., 2007. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. *R. Bras. Zootec.* 36, 77–86.
- Olsson, I.A.S., Dahlborn, K., 2002. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab. Anim.* 36, 243–270.
- Paull, G.C., Filby, A.L., Giddins, H.G., Coe, T.S., Hamilton, P.B., Tyler, C.R., 2010. Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. *Zebrafish* 7, 109–117.
- Paz-y-Miño-C, G., Bond, A.B., Kamil, A.C., Balda, R.P., 2004. Pinyon jays use transitive inference to predict social dominance. *Nature* 430, 778–781.
- Penning, P.D., Parsons, A.J., Newman, J.A., Orr, R.J., Harvey, A., 1993. The effects of group size on grazing time in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 37, 101–109.
- Penteriani, V., Delgado, M.M., 2017. Living in the dark does not mean a blind life: bird and mammal visual communication in dim light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 372, 20160064.
- Pizzatto, L., Stockwell, M., Clulow, S., Clulow, J., Mahony, M., 2016. How to form a group: effects of heterospecifics, kinship and familiarity in the grouping preference of green and golden bell frog tadpoles. *Herpetol. J.* 26, 157–164.
- Sacchi, R., Cigognini, R., Gazzola, A., Bernini, F., Razzetti, E., 2015. Male calling activity in syntopic populations of *Rana latastei* and *Rana dalmatina* (Amphibia: Anura). *Ital. J. Zool.* 82, 124–132.
- Scheiber, I.B., Weiß, B.M., Kingma, S.A., Komdeur, J., 2017. The importance of the altricial–precocial spectrum for social complexity in mammals and birds – a review. *Front. Zool.* 14, 1–20.
- Shaw, E., 1978. Schooling fishes: the school, a truly egalitarian form of organization in which all members of the group are alike in influence, offers substantial benefits to its participants. *Am. Scient.* 66, 166–175.
- Sloman, K.A., Armstrong, J.D., 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena?. *J. Fish Biol.* 61, 1–23.

- Smith, J.M., 1964. Group selection and kin selection. *Nature* 201, 1145–1147.
- Snowdon, C.T., 1999. O significado da pesquisa em Comportamento Animal. *Estud. Psicol. (Natal)* 4, 365–373.
- Sutherland, W.J., 1998. The importance of behavioural studies in conservation biology. *Anim. Behav.* 56, 801–809.
- Swaisgood, R.R., Shepherdson, D.J., 2005. Scientific approaches to enrichment and stereotypies in zoo animals: what's been done and where should we go next? *Zoo Biol.* 24, 499–518.
- Tinbergen, N., 1953. *Social behaviour in animals*. Methuen, London.
- Tobias, M.L., Corke, A., Korsh, J., Yin, D., Kelley, D.B., 2010. Vocal competition in male *Xenopus laevis* frogs. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 1791–1803.
- Trivers, R.L., 1971. The evolution of reciprocal altruism. *Quart. Rev. Bio.* 46, 35–57.
- Van de Weerd, H.A., Day, J.E.L., 2009. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 1–20.
- Van Loo, P.L., Mol, J.A., Koolhaas, J.M., Van Zutphen, B.F., Baumans, V., 2001. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol. Behav.* 72, 675–683.
- van Staaden, M.J., Searcy, W.A., Hanlon, R.T., 2011. Signaling Aggression, in: Huber, R., Bannasch, D.L., Brennan, P. (Eds.), *Aggression, Advances in Genetics*, v. 75. Academic Press, Boston, pp. 23–49.
- Vitt, L.J., Caldwell, J.P., 2014. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*, quarta ed. Academic Press, San Diego.
- Wells, K.D., 2007. *The ecology and behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Whiteman, E.A., Côté, I.M., 2004. Dominance hierarchies in group-living cleaning gobies: causes and foraging consequences. *Anim. Behav.* 67, 239–247.
- Wittemyer, G., Getz, W.M., 2007. Hierarchical dominance structure and social organization in African elephants, *Loxodonta africana*. *Anim. Behav.* 73, 671–681.
- Yamamoto, M.E., 2007. Percorrendo a história do estudo do comportamento animal: origens e influências, in: Yamamoto, M.E., Volpato, G.L. (Org.), *Comportamento Animal*, segunda ed. Editora UFRN, Natal, pp. 10–23.

## CAPÍTULO 1<sup>4</sup>

### **Olhos escurecidos sinalizam dominância em um caracídeo Neotropical?**

#### **RESUMO**

Em *Serrapinnus notomelas*, um caracídeo Neotropical, ambos os sexos podem desenvolver um escurecimento na íris/esclera, cuja função é atualmente desconhecida. O objetivo desse estudo foi investigar se essa característica é uma sinalização de dominância na espécie. Realizamos experimentos para verificar a estabilização hierárquica de cardumes ao longo do tempo (i.e., redução da agressividade), e quais indivíduos ocupavam as primeiras posições dos grupos. Em seguida, verificamos se um indivíduo com escurecimento dos olhos era identificado como dominante por um coespecífico sem essa característica. Para isso, mensuramos o tempo permanecido por um indivíduo sem olhos escurecidos próximo a um indivíduo com esta característica e próximo a outro animal sem olhos escurecidos. Em seguida, os mesmos animais foram alocados juntos em um aquário, e então contabilizamos os atos agonísticos realizados e recebidos (cuja diferença formou um índice de dominância) para cada indivíduo, verificando o sexo e se os olhos estavam ou não escurecidos nos animais. Por fim, analisamos se os olhos escurecidos possuem interação com o sexo, maturação gonadal, tamanho corporal e proporção de outras manchas corporais dos animais, além de uma característica dos machos: raios da nadadeira anal contendo ganchos. Não verificamos uma estabilidade hierárquica nos grupos, e nem relações dominantes-submissos estabelecidas nas primeiras posições. Não encontramos evidências de que os olhos escurecidos são uma sinalização de dominância. Os indivíduos com olhos escurecidos (sejam machos ou fêmeas) obtiveram um índice de dominância maior que os machos, entretanto são tão dominantes quanto as fêmeas; logo, não dominam sobre todos os coespecíficos. Em relação as nossas

---

<sup>4</sup> Redigido parcialmente segundo as normas para submissão de artigo na revista *Acta Ethologica*. Disponível em: <<http://www.springer.com/life+sciences/behavioural/journal/10211>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

análises de possível interação dos olhos escurecidos com outras características morfológicas, não encontramos interação de nenhuma variável. Novas pesquisas são necessárias para se esclarecer a função do escurecimento dos olhos em *S. notomelas*, sem descartar uma eventual forma de comunicação interespecífica ou mesmo que seja simplesmente não-adaptativo.

**Palavras-chave:** Coloração dos olhos. Pigmento. Comportamento agonístico. Hierarquia. Interação intraespecífica. *Serrapinnus notomelas*.

## 2 INTRODUÇÃO

Uma das mais notáveis características apresentadas pelos animais sociais é a formação de hierarquias de dominância (Sapolsky 2004; van der Kooij e Sandi 2015). Essa organização social é formada e mantida por intermédio de interações agonísticas entre os membros do grupo, estabelecendo assim relações dominantes/submissos (Holekamp e Strauss 2016). Os indivíduos dominantes possuem prioridade no acesso à recursos valiosos, tais como alimentos e parceiros sexuais (Drews 1993). Essa estruturação resultará, a longo prazo, na divisão desigual dos benefícios e custos da vida em grupo para os animais com diferentes *status* dentro da hierarquia e, portanto, gera significativas consequências para a aptidão individual dos integrantes do grupo (Ang e Manica 2010). As hierarquias de dominância estão presentes em muitas espécies de peixes teleósteos, e são observadas tanto na natureza quanto em laboratório (revisado em Sloman e Armstrong 2002).

Animais sociais transmitem sinais aos seus coespecíficos que informam sobre atributos inerentes do sinalizador e, nesse contexto, o *status* social é uma característica universal de informação na comunicação animal (Clark e Kimbrough 2017; Fernald 2014; Sheehan e Bergman 2015). O *status* de dominância é transmitido de vários modos (e.g., sinalização

química, auditiva e visual), que podem ocorrer em combinação para aumentar a intensidade da informação (Fernald 2014). Dentre os diversos tipos de sinalização visual, as informações transmitidas através de coloração encontram-se amplamente difundidas entre os animais (Pérez-Rodríguez et al. 2017; Protas e Patel 2008). Nos peixes, a coloração advém de pigmentos como melanina, carotenoides, ácido úrico, purinas e outros (que podem ser encontrados em células especiais chamadas de cromatóforos em muitas espécies, veja Sköld et al. 2016 para detalhes da pigmentação em peixes). Exemplos de coloração incluem listras corporais verticais (Papadakis et al. 2016) ou horizontais (Kelley et al. 2016), e manchas no corpo (Backström et al. 2015; Evans e Norris 1996) ou nas nadadeiras (Theis et al. 2012). As distintas regiões coloridas do corpo, bem como a mudança de cores (de modo súbito ou lentamente), podem ser utilizadas como sinalizações de dominância (Sefc et al. 2014; Sköld et al. 2016) em contextos como na escolha de parceiros sexuais pelas fêmeas (Kodric-Brown 1998) ou em disputas por territórios entre os machos (Maruska e Fernald 2013).

Algumas espécies de peixes apresentam coloração nos olhos, com função tanto de sinalizar dominância intragrupo em algumas espécies (Martin e Hengstebeck 1981; Maruska e Fernald 2013) quanto submissão em outras (O'Connor et al. 1999; Miyai et al. 2011). No entanto, tal coloração nesse órgão também pode exercer finalidades tão diversas quanto auxiliar na camuflagem dos animais no ambiente (Marshall e Vorobyev 2003) ou sinalizar o estado fisiológico do indivíduo (e.g., nível de estresse em *Oreochromis niloticus*, Freitas et al. 2014; proximidade do momento da desova nas fêmeas de *Pomatoschistus minutus*, Olsson et al. 2017).

Nesse contexto, o presente estudo investigou a possível função da pigmentação presente nos olhos do peixe Neotropical *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann 1915) (Characidae: Cheirodontinae). As espécies dessa subfamília são abundantes em ambientes de águas lênticas

e planícies costeiras, e habitam a maioria das bacias hidrográficas da América do Sul e Central (Malabarba 1998). *Serrapinnus notomelas* ocorre especialmente em ambientes com pouca profundidade da água, ou seja, ambientes com baixa turbidez e boa visibilidade aquática (Ferreira e Casatti 2006; Suárez et al. 2007). A espécie possui atividade alimentar diurna e vive em cardumes, geralmente encontrados próximos a macrófitas (Carniatto et al. 2012; Casatti et al. 2003; Hahn e Loureiro-Crippa 2006; Pelicice e Agostinho 2006). Os machos maduros do gênero *Serrapinnus* apresentam raios da nadadeira anal que possuem ganchos hipertrofiados, ausentes nas fêmeas, cujas funções são desconhecidas e caracterizam um dimorfismo sexual no grupo (Malabarba e Jerep, 2014). Entretanto, tanto os machos quanto as fêmeas podem desenvolver um escurecimento dos olhos, na região que compreende a íris e a esclera, cuja possível finalidade é atualmente desconhecida. Nossa hipótese é que tal escurecimento seja utilizado em comunicação intraespecífica, sinalizando dominância no grupo social. Logo, esperamos que indivíduos com tal característica sejam mais agressivos e dominem os recursos presentes no meio em relação aos seus coespecíficos sem olhos escurecidos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais experimentais, condições em laboratório e registros comportamentais**

No dia 21 de junho de 2016 nós fizemos uma coleta de indivíduos de *S. notomelas* (Fig. 1.1) (Sisbio IBAMA nº 42829-1) em uma lagoa artificial, sob influência de alagamento do Rio Tibagi, na cidade de Sertanópolis, estado do Paraná, Brasil (23°00'13.6''S, 50°58'21.4''O). Os animais foram transportados em sacos plásticos oxigenados até a Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL), localizada no campus da instituição, e tornaram-se a nossa população estoque. Dispúnhamos de três

aquários com capacidade total de 150L cada, os quais estavam equipados com bombas para circulação e filtragem mecânica e biológica internas, aquecedores, termostatos (ajustados para manter a temperatura da água em 28° C), iluminação para fotoperíodos de 14 horas claro/10 horas escuro e alimentadores automáticos. Os animais eram alimentados com ração própria para peixes ornamentais duas vezes ao dia (08:30 h e 17:00 h).



**Fig. 1.1** Exemplos de *Serrapinnus notomelas*, fêmea (acima) e macho (abaixo). Observe o dimorfismo sexual na espécie: a base da nadadeira anal é convexa em sua região anterior nos machos e retilínea nas fêmeas, cujos corpos são mais altos, tendendo a um formato oval, enquanto o macho possui um corpo que tende a ser mais alongado. Barra de escala = 5 mm.

Um dos três aquários foi destinado à população estoque, o qual continha exemplares envasados das plantas aquáticas *Vallisneria gigantea* e *Echinodorus* sp., e os demais à realização dos experimentos (denominados de aquário experimental I e II). A troca parcial de água e limpeza dos aquários foram realizadas semanalmente durante o período de estudo. Toda manipulação dos animais foi realizada, cuidadosamente, com o auxílio de uma rede de mão.

Utilizamos um medidor multiparâmetros (modelo *YSI Professional Plus*) para verificar a concentração de oxigênio dissolvido (mg/L), pH, temperatura (°C) e condutividade da água ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) dos aquários experimentais semanalmente. Os valores obtidos para cada variável foram submetidos a um teste *t* para verificação de possível diferença entre os aquários I e II, o que poderia influenciar nos experimentos de avaliação da hierarquia. Já para os experimentos investigando o escurecimento dos olhos como sinal de dominância e de agressividade, as variáveis também foram monitoradas semanalmente, mas não foi necessário compará-las entre os aquários I e II, visto que os aquários experimentais estavam diferentemente estruturados, cada qual com a realização de um experimento próprio (veja subtópico 3.4).

O comportamento agonístico escolhido para análise da agressividade dos animais foi baseado em observações prévias da população estoque. Nós o denominamos de “investida” e ele consiste de um deslocamento rápido e de curta duração do agressor em direção a outro indivíduo, induzindo este a deslocar-se de sua posição e afastar-se do animal que iniciou a interação. Com a finalidade de reduzir interferências externas no comportamento dos animais, os aquários experimentais foram revestidos com cartolina de coloração preta nas laterais e vidro posterior e, durante a realização dos experimentos,

uma cortina de coloração preta era estendida em frente aos aquários, isolando visualmente os animais do experimentador.

Todas as amostragens experimentais foram registradas por meio de filmagens. Os equipamentos utilizados foram duas câmeras de alta resolução, modelo *HD Pro Webcam C920 Logitech®*, acopladas cada uma em um tripé e ambas conectadas a um computador contendo um programa de captura de vídeo (*ContaCam - Video Surveillance software*. Endereço eletrônico: <https://www.contaware.com/contacam.html>).

### **3.2 Estabilização da hierarquia**

A fim de verificarmos uma possível estabilização hierárquica, bem como se a hierarquia apresenta linearidade (i.e., uma sequência clara nas relações de dominância-submissão entre os membros do grupo) em *S. notomelas*, indivíduos foram retirados da população estoque e acondicionados em cardumes (denominados de A, B, C e D) nos aquários experimentais. Os grupos eram compostos por 12 animais cada; logo, 48 peixes foram utilizados no total. Como a espécie ocorre naturalmente na proporção sexual de 1:1 (Andrade et al. 2008), mantivemos esse padrão. A sexagem dos animais era realizada através da observação visual da base da nadadeira anal dos indivíduos, visto que ela é distintamente convexa em sua região anterior em machos maduros e tipicamente retilínea nas fêmeas (Fig. 1.1), assim como ocorre em outras espécies do gênero (Malabarba e Jerep 2014). A fêmea de *S. notomelas* é mais alta que o macho e possui um corpo em formato oval, enquanto o macho possui um corpo que tende a ser mais alongado (Fig. 1.1), características que facilitavam a diferenciação sexual em vídeo. Não houve marcação individual dos animais. Dois cardumes permaneceram nos aquários experimentais entre os dias 14 de março e 26 de abril e outros dois grupos entre os dias

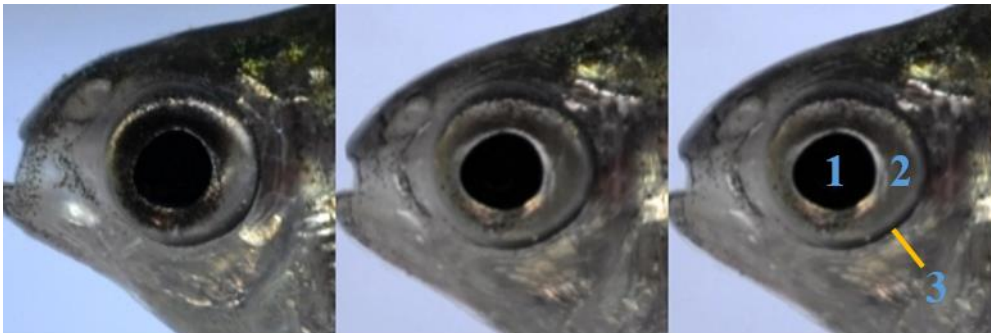
26 de abril e 08 de junho de 2017. Desse modo, cada cardume esteve 43 dias em aclimação.

Cada aquário experimental foi estruturado com exemplares envasados da macrófita *Vallisneria gigantea* (dimensões dos vasos: 9,5 cm de altura x 7 cm de diâmetro) e três materiais em bandejas de plástico (16,5 cm de comprimento x 12,5 cm de largura x 3 cm de altura): areia, cascalho e folhas secas/folhiço (Fig. 1.2). O objetivo da adição desses materiais foi criar uma área enriquecida com oportunidades de abrigo (vegetação) e alimentação (indivíduos foram eventualmente observados forrageando na areia e folhiço), ou seja, proporcionar recursos aos animais.



**Fig. 1.2** Materiais adicionados aos aquários experimentais I e II, criando uma área estruturada com o propósito de incentivar a disputa por recursos entre os indivíduos de *S. notomelas*, levando ao surgimento de relações dominantes-submissos. Em segundo plano, exemplares envasados da macrófita *Vallisneria gigantea* e bandeja contendo areia, em primeiro plano uma bandeja contendo cascalho e outra bandeja contendo folhas secas/folhiço.

Para verificar se de fato uma hierarquia foi estabelecida nos grupos, filmagens foram realizadas uma vez por semana durante quatro semanas consecutivas, englobando um período de 20 a 40 dias de aclimação para cada cardume, e as investidas realizadas por todos os membros do grupo foram posteriormente contabilizadas. Uma característica das hierarquias de dominância é que quando elas são estabelecidas, a frequência de comportamentos agonísticos é reduzida no grupo social (Kudryavtseva 2000). As câmeras eram dispostas de modo a enquadrar a região enriquecida dos aquários, e as investidas foram avaliadas por um período de 15 min sempre entre às 09:00 h e 09:30 h, para padronizar o período de atividade dos peixes. Registramos também o sexo e o escurecimento dos olhos (escurecidos ou não, Fig. 1.3) dos indivíduos que realizavam as investidas, a fim de analisar a relação dessas características com a agressividade em cardumes a longo prazo. Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar a relação entre as variáveis: passagem do tempo (as quatro semanas) e a agressividade dos peixes.



**Fig. 1.3** Exemplo de olho escurecido em *Serrapinnus notomelas* (esquerda). Note a mancha escura na região que compreende a íris/esclera. A imagem do centro mostra um indivíduo com ausência dessa característica. À direita, indicação das diferentes regiões apresentadas pela área exposta do globo ocular nessa espécie: (1) pupila; (2) íris e esclera. O número (3) indica a margem do olho.

### 3.3 Estruturação espacial e dominância

Quando os quatro cardumes estavam entre um período de 27 a 35 dias de aclimatação (entre a segunda e terceira semana do experimento anterior) nós investigamos quais animais (discriminados pelo sexo e escurecimento dos olhos) estavam ocupando a primeira e segunda posição nos grupos, isto é, quais peixes estavam tendo controle sobre os recursos presentes nos aquários. Além dessas posições não foi possível estabelecer visualmente nenhuma outra estruturação espacial (posição) dentro do cardume. Nós assumimos que os animais que não permaneciam na área com recursos eram submissos em relação aos que permaneciam, metodologia semelhante a utilizada em outros estudos sobre dominância em peixes (Sloman e Armstrong 2002).

Foram realizadas filmagens entre às 09:00 h e 17:00 h, durante cinco dias entre 10 e 18 de abril para os cardumes A e B, e entre 23 e 31 de maio para os cardumes C e D. Os vídeos eram analisados até o ponto em que a ordenação dos animais era clara para se realizar a análise proposta (i.e., primeira e segunda posição possíveis de se determinar nos grupos), primeiramente a partir do início das filmagens (09:00 h) e em seguida a partir da última hora filmada no dia, em retrocesso (17:00 h). Desse modo, obtivemos análises dos peixes dominantes nos dois momentos mais distantes entre si para cada dia. O primeiro minuto analisado nunca ultrapassou as 11:00 h, enquanto o segundo minuto diário nunca foi analisado antes das 15:30 h. Os animais que ocupavam as duas primeiras posições tinham então o sexo anotado, bem como se estavam com os olhos escurecidos. O tempo dos indivíduos em cada posição era registrado durante 1 min. Os dados obtidos para cada minuto distinto de análises diárias ( $n = 5$  dias para cada um dos quatro grupos) foram somados para cada cardume por tratamento. Em seguida, foi realizada uma média das amostragens para todos os grupos. Os valores obtidos foram submetidos a uma ANOVA para verificar se havia diferença

significativa entre os tratamentos (sexo e olho escurecido), tanto para a primeira quanto para a segunda posição.

### **3.4 Escurecimento dos olhos, sinalização de dominância e agressividade**

Com o objetivo de verificarmos se o escurecimento dos olhos por si só é um sinal de dominância em *S. notomelas*, realizamos um experimento onde um indivíduo que não apresentava escurecimento dos olhos poderia escolher permanecer próximo de um indivíduo com os olhos escurecidos ou próximo a outro coespecífico sem essa característica. Nossa metodologia foi adaptada de McRobert e Bradner (1998) e Sathyan e Couldridge (2013). Quando um indivíduo dominante é identificado, peixes submissos preferem ficar próximos a indivíduos que também são subordinados (Candolin 2000) ou simplesmente se afastar (Nakano 1994; Zubizarreta et al. 2015).

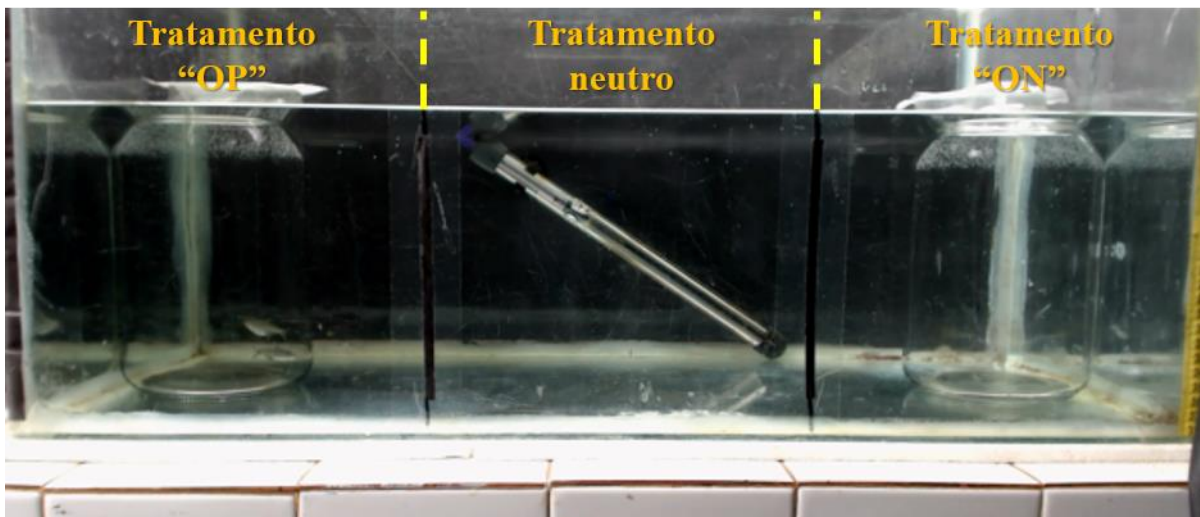
O tamanho corporal é um conhecido fator que determina a dominância em muitas espécies de peixes (e.g., Chen e Fernald 2011; Järvi 1990; Whiteman e Côté 2004), por isso padronizamos o comprimento dos animais com uma diferença máxima de 5 mm (comprimento padrão) entre os indivíduos utilizados em cada repetição (média  $\pm$  DP:  $33,21 \pm 2,09$ ; n = 60). Os animais eram retirados da população estoque e dispostos lateralmente em uma placa de Petri contendo uma pequena quantidade de água, proveniente do aquário estoque. A placa estava disposta sobre um papel milimetrado, e os peixes eram então fotografados sempre a partir do mesmo ângulo, com a câmera logo acima da placa de Petri. Em seguida, o comprimento era medido em um computador usando a fotografia digital. Enquanto a análise era realizada, o animal permanecia em um balde contendo água proveniente do aquário estoque. Esse procedimento era realizado, em geral, em menos de 5

min desde a retirada do peixe do estoque até a mensuração do comprimento corporal, a fim de minimizar a indução de estresse nos peixes.

O aquário experimental II foi utilizado nesse experimento. Dois potes de vidro transparente (25 cm de altura x 15 cm de diâmetro, capacidade de 3L) eram dispostos em lados opostos do aquário. Água era adicionada no aquário até 21 cm de altura, o que representava cerca de 60L. Os potes eram preenchidos com a água do aquário até completar 23 cm de altura, impedindo, desse modo, que a água do aquário entrasse em contato com a água dos potes (Fig. 1.4). Esse procedimento inviabilizou qualquer comunicação química entre os peixes, algo que poderia influenciar nos resultados (Plenderleith et al. 2005).

Em um dos potes era colocado um indivíduo com o olho escurecido e no outro um animal sem tal característica, mas do mesmo sexo (a escolha dos lados era alternada em cada repetição experimental). O aquário foi setorizado em três partes iguais de 26,6 cm de comprimento cada, que configuraram nossos tratamentos: presença de um indivíduo com os olhos escurecidos, região neutra (o centro do aquário) e presença de um indivíduo sem olhos escurecidos (Fig. 1.4). Um terceiro peixe, do sexo oposto àqueles presentes nos potes, era então colocado no aquário. Esse indivíduo não possuía os olhos escurecidos e era livre para transitar entre os tratamentos. Desse modo, também testamos se o escurecimento dos olhos é utilizado na preferência de parceiros. Os peixes passavam por um período de aclimação de 3 h, durante o qual os potes eram isolados visualmente de qualquer observador externo através da cobertura de baldes de plástico que tiveram seu fundo removido (Fig. 1.5). Após a aclimação, os baldes eram removidos e esperava-se um intervalo de 15 minutos antes de se iniciar uma filmagem com 1 h de duração. A câmera era disposta de modo a centralizar o aquário, garantindo uma simetria visual entre os três tratamentos. O tempo que o peixe livre permanecia em cada tratamento foi então mensurado nos vídeos registrados.

Todo o procedimento de escolha dos três indivíduos da população estoque, medida do comprimento padrão de cada animal e sua colocação no aquário experimental era efetuado entre às 09:00 h e 11:00 h. A bomba de circulação e filtragem da água foi removida durante esses experimentos a fim de padronizar estruturalmente os dois lados do aquário, já o termostato foi posicionado na região central. O experimento foi realizado independentemente 20 vezes (60 indivíduos utilizados no total) entre os dias 31 de julho e 01 de novembro de 2017. A média de tempo de permanência do peixe livre em cada tratamento foi submetida a uma ANOVA de dois fatores, para verificarmos também a possível interação do sexo nos resultados obtidos.



**Fig. 1.4** Um *frame* de uma das filmagens realizadas para investigar se os olhos escurecidos em *S. notomelas* sinalizam dominância. O aquário foi setorizado em três partes iguais de 26,6 cm cada (note as faixas pretas fixadas na região externa do vidro anterior, delimitando-as). A região central foi considerada neutra, e ambos os lados opostos do aquário continham os potes de vidro transparente no quais eram colocados um animal com olho escurecido (Tratamento “OP”) ou sem escurecimento (Tratamento “ON”). A água do aquário não ultrapassava 21 cm de altura, impedindo o contato com a água presente nos potes.



**Fig. 1.5** Os baldes de plástico, que isolavam visualmente os potes de vidro transparente, utilizados durante o período de aclimação do experimento de investigação de sinalização de dominância por meio dos olhos escurecidos em *S. notomelas*. Após 3 h de aclimação, os baldes eram retirados e esperava-se 15 min antes de se iniciar a filmagem.

Ao fim da filmagem do experimento anterior, os peixes eram retirados dos potes e do aquário experimental II e transportados ao aquário experimental I. Este aquário continha os mesmos materiais utilizados no experimento descrito no subtópico 3.2 (Fig. 1.2), e os três indivíduos podiam circular livremente. Como agora tínhamos a diferenciação individual dos peixes, possível de se determinar visualmente através do sexo e dos olhos escurecidos, verificamos se o animal apresentando escurecimento dos olhos era mais agressivo ou menos alvo de agressões dos seus coespecíficos (i.e., se ele era dominante sobre os demais). Para tal propósito, o total de três horas de filmagens eram realizadas no dia seguinte, com filmagens de 1 h de duração intercaladas por 1 h de intervalo (início às 09:00 h e término às 14:00 h). As investidas realizadas e recebidas pelos peixes foram mensuradas através dos vídeos obtidos, e a diferença entre elas (investidas efetuadas – investidas recebidas) formou um índice de dominância (quanto mais positivo o valor obtido, mais dominante pode ser considerado o indivíduo). Esse experimento foi repetido 12 vezes, com 36 indivíduos utilizados no total: nove machos e três fêmeas com olhos escurecidos nos potes, nove machos e três fêmeas sem

essas características nos potes opostos, e três machos e nove fêmeas livres, sem escurecimento dos olhos. O período de experimentação foi entre os dias 01 de agosto e 05 de outubro de 2017, em conjunto com o experimento anterior. Os valores obtidos foram submetidos a um teste de Kruskal-Wallis para verificar possíveis diferenças significativas.

### **3.5 Escurecimento dos olhos e possível relação com características anatômicas, sexo e maturação de gônadas**

Com o objetivo de verificar se o escurecimento dos olhos em *S. notomelas* tem relação com outras características dos animais, no dia 01 de dezembro de 2017 nós tiramos fotografias individuais dos animais restantes na população estoque (n = 56). Os peixes foram previamente anestesiados com superexposição ao anestésico óleo de cravo (Eugenol) diluído em água, e em seguida colocados individualmente em um pequeno aquário de vidro, onde permaneceram imóveis, e fotografias digitais foram efetuadas com uma numeração identificando cada indivíduo. A iluminação do ambiente foi mantida igual para todas as fotografias efetuadas. Após esse procedimento, os animais eram eutanasiados em outra solução de Eugenol concentrado, e colocados individualmente, juntamente com a sua numeração, em sacos plásticos em um recipiente contendo formol.

Os peixes foram posteriormente analisados em laboratório, onde o comprimento padrão de cada animal foi medido com o auxílio de um paquímetro digital (marca *Digimess*), o sexo foi identificado, e o número de raios contendo ganchos presentes na nadadeira anal dos machos foi contabilizado (com o auxílio de microscópio estereoscópico), já que esta é uma característica exclusiva deles. A maturação das gônadas foi verificada macroscopicamente (com o auxílio de um bisturi e microscópio estereoscópico) para cada indivíduo, com base na classificação proposta por Lampert et al. (2004): imaturo (Estágio

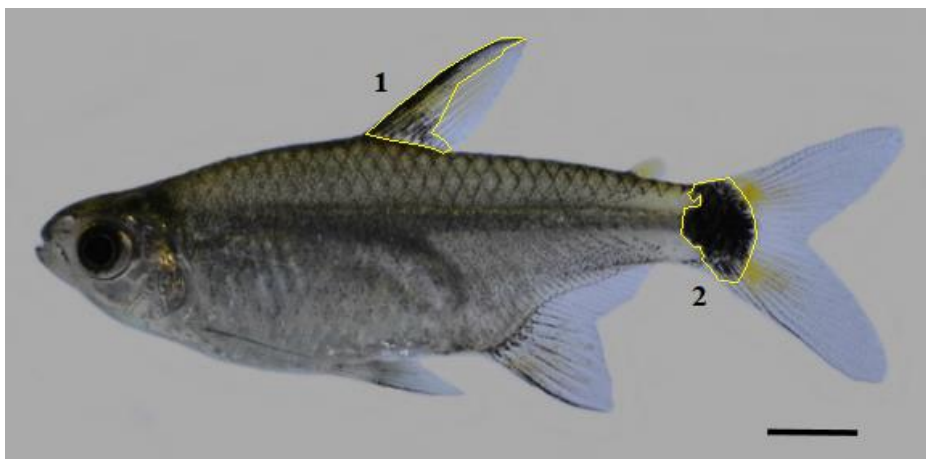
I), em maturação (Estágio II), maduro (Estágio III), em desova (Estágio IV, não válido para machos) e pós-desova (Estágio V).

As fotografias foram utilizadas para classificar os peixes com olho escurecido “presente” ou “ausente”. O critério utilizado para escurecimento presente era se a área escura da íris/esclera circulava completamente a pupila. Se isso não era observado, incluindo ausência de escurecimento, escurecimento isolado ou sem circular completamente a pupila, o peixe era classificado como com escurecimento ausente. Para os animais com os olhos escurecidos (conforme critério descrito), a proporção da área escura foi medida utilizando o programa *NIH Image J* (endereço eletrônico: <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Utilizando a medida do comprimento padrão de cada animal, a escala do programa era calibrada (em mm) na própria imagem. Então a área da pupila e a área total do globo ocular exposto, com base na margem do olho como limite, eram medidas (mm<sup>2</sup>). Subtraindo a área total pela área da pupila, a área que compreende a íris/esclera era calculada (veja as delimitações de cada região na Fig. 1.3). A área escurecida era então medida juntamente com a área da pupila, que era posteriormente subtraída para se obter a área escurecida da íris/esclera (mm<sup>2</sup>). Através de uma regra de três simples entre a área total da íris/esclera e a área escurecida, a proporção (%) do olho escurecido era calculada.

Também com o auxílio do *NIH Image J*, a proporção ocupada pela mancha da nadadeira dorsal de cada animal foi calculada: primeiramente a área total da nadadeira dorsal era medida, em seguida a área ocupada pela mancha (ambas em mm<sup>2</sup>) e então a proporção (%) era calculada através de uma regra de três simples. Procedimento semelhante foi realizado para se calcular a proporção (%) da mancha presente na base da nadadeira caudal dos animais (Fig. 1.6), mas nesse caso a proporção foi em relação ao corpo do peixe, excluindo-se as nadadeiras e a mandíbula, já que em algumas fotografias os

animais estavam com a boca aberta e, desse modo, haveria um erro nas medidas já que o fundo da imagem seria incluído no cálculo.

Foi ajustado um modelo de regressão Beta (apropriado para dados de proporção, Cribari-Neto e Zeileis 2010) para testar a interação da proporção do olho escurecido com o sexo, o comprimento padrão, a maturação das gônadas e a proporção das manchas da nadadeira dorsal e base da nadadeira caudal em *S. notomelas*. Para os peixes que não possuíam olhos escurecidos, a proporção foi assumida como sendo de 0% (i.e., escurecimento ausente).



**Fig. 1.6** As manchas cujas proporções (em %) foram calculadas nos indivíduos de *S. notomelas*: (1) mancha da nadadeira dorsal (proporção calculada em relação à própria nadadeira) e (2) mancha da base da nadadeira caudal (proporção calculada em relação ao corpo do peixe, excluindo-se as nadadeiras e a mandíbula). Escala da barra = 5 mm.

Um modelo, também de regressão Beta, foi ajustado separadamente para testar a interação entre a proporção escurecida dos olhos dos machos e o número de raios da nadadeira anal contendo ganchos.

### **3.6 Análises estatísticas**

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias antes de se aplicar o teste estatístico adequado (paramétrico ou não-paramétrico). Para essa finalidade, o teste de Shapiro-Wilk (normalidade) e o teste F ou o teste de Bartlett (homogeneidade de variâncias) foram utilizados. Todos os testes realizados foram bicaudais, utilizando-se um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R, versão 3.4.1 (R Core Team 2017).

### **3.7 Aprovação ética**

Esta pesquisa obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina – CEUA UEL (processo nº 11662.2016.70).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Agressividade ao longo do tempo**

Não houveram diferenças nas médias da concentração de oxigênio dissolvido na água, pH, condutividade e temperatura nos aquários experimentais I e II (Tabela 1.1). Logo, os aspectos físicos e químicos da água não tiveram influência entre os grupos analisados nos diferentes aquários.

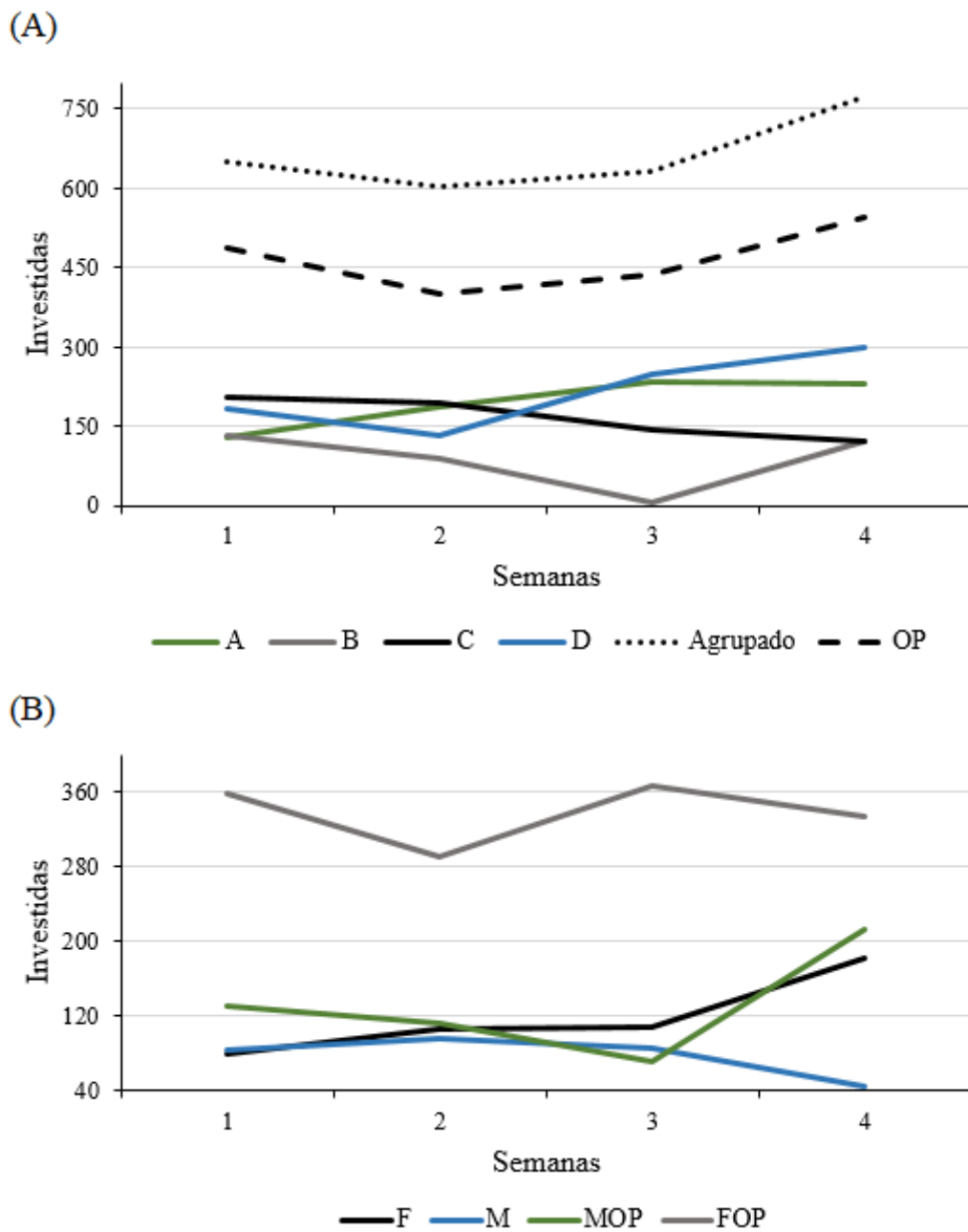
**Tabela 1.1** Médias  $\pm$  desvio padrão e resultados do teste  $t$  (grau de liberdade = 22 para todos os testes) para os valores da concentração de O<sub>2</sub>, pH, condutividade e temperatura (variáveis medidas semanalmente, n = 12) registradas nos aquários experimentais I e II.

Variáveis	Aquário I	Aquário II	$t$ calculado	$P$ -valor
Concentração de O <sub>2</sub> (mg/L)	5,3 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,7	1,88	0,072
pH	8,4 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,2	0,53	0,596
Condutividade ( $\mu$ S/cm)	106,6 $\pm$ 2,7	105,2 $\pm$ 2,3	1,31	0,203
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	27,2 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,1	1,11	0,278

**Tabela 1.2** Médias  $\pm$  desvio padrão das investidas registradas para os cardumes de *S. notomelas* para as diferentes categorias analisadas (olhos escurecidos = OP; fêmeas = F; machos = M; fêmeas com olhos escurecidos = FOP; machos com olhos escurecidos = MOP) semanalmente (n = 4) nos aquários experimentais. Para cada grupo e categoria, é mostrado também o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ , correlação entre a passagem do tempo e a agressividade dos animais),  $t$  calculado (o grau de liberdade é igual a 2 para todas as análises) e  $P$ -valor dos testes de correlação.

Cardumes/Sexo/OP	Média $\pm$ DP	$r$	$t$ calculado	$P$ -valor
Cardumes agrupados	665,5 $\pm$ 74,1	0,68	1,33	0,313
Agrupados OP	468,5 $\pm$ 62,5	0,43	0,68	0,566
Agrupado F	119,2 $\pm$ 44,0	0,91	3,14	0,087
Agrupado M	77,7 $\pm$ 22,4	- 0,73	- 1,51	0,269
Agrupados FOP	337,0 $\pm$ 34,1	0,01	0,02	0,984
Agrupados MOP	131,5 $\pm$ 58,8	0,45	0,71	0,548

Foram realizadas 2.662 investidas ao todo nos quatro cardumes. O cardume A apresentou um total de 783 (Média  $\pm$  DP:  $195,7 \pm 48,5$ ) investidas durante as amostragens semanais, o cardume B um total de 350 ( $87,5 \pm 57,2$ ), já no cardume C registramos ao todo 666 ( $166,5 \pm 40,5$ ) investidas e para o cardume D um total de 863 ( $215,7 \pm 72,5$ ). Os indivíduos com olhos escurecidos foram responsáveis por 70,40% de todos os comportamentos agonísticos observados (1.874 investidas; Fig. 1.7A; Tabela 1.2). Fêmeas com ausência de olhos escurecidos realizaram ao todo 477 investidas, já os machos 311 investidas. As fêmeas com olhos escurecidos totalizaram 1.348 investidas (50,64% do total), já os machos com a mesma característica, um total de 526 atos agonísticos (19,76% do total; Fig. 1.7B; Tabela 1.2). O número de investidas não diminuiu durante as semanas analisadas, o que indica que a hierarquia nos grupos de *S. notomelas* não se estabilizou ao longo do tempo (Tabela 1.2).



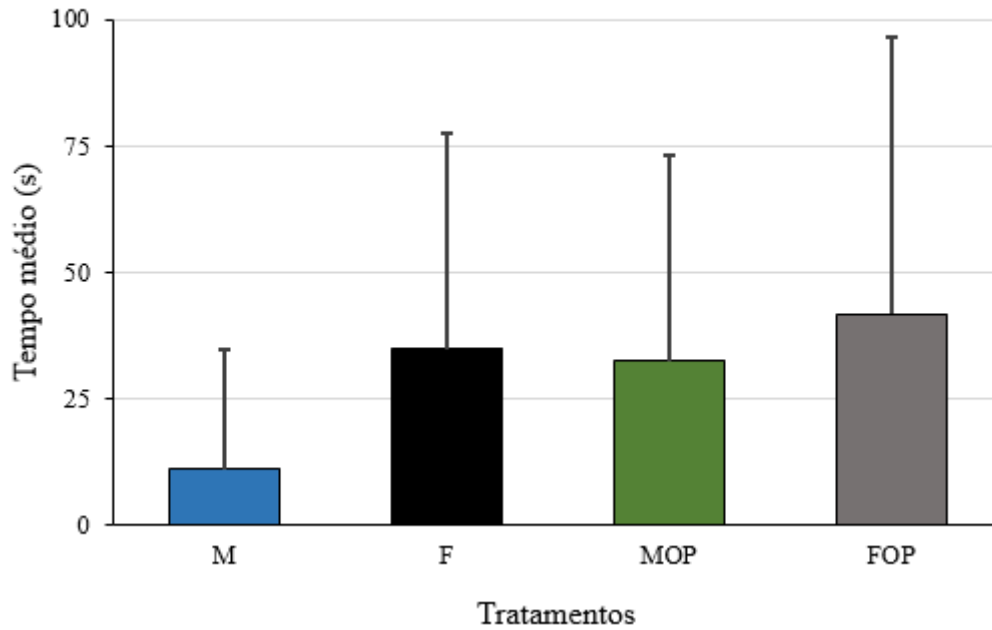
**Fig. 1.7** (A) Número de investidas registradas para os quatro cardumes de *S. notomelas* (A, B, C e D). É mostrada também as investidas realizadas somente pelos peixes com olhos escurecidos (OP, dados agrupados) e as investidas realizadas pelos animais dos quatro cardumes em conjunto. (B) Número de investidas agrupadas e discriminadas por sexo (macho = M, fêmea = F) e olhos escurecidos (machos com olhos escurecidos = MOP, fêmeas com olhos escurecidos = FOP). O tamanho amostral foi de quatro cardumes compostos por 12 peixes (razão sexual de 1:1).

## 4.2 Domínio sobre os recursos

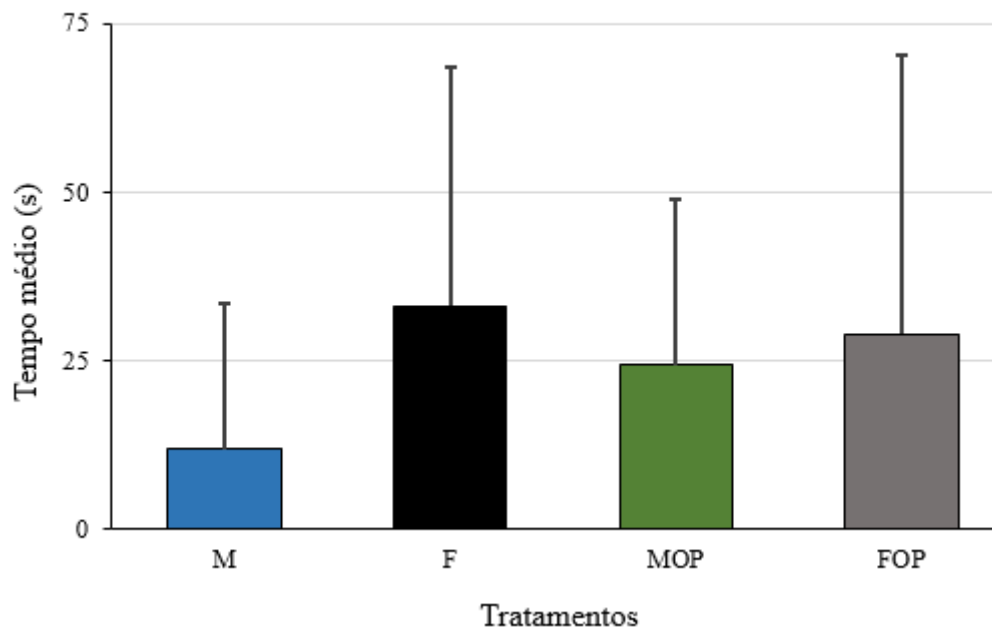
O escurecimento do olho e o sexo não influenciaram no tempo que os peixes ocuparam a primeira posição do cardume ( $F = 0,539$ ; g.l. = 12;  $P = 0,664$ ). O tempo total que machos permaneceram na primeira posição do grupo, em todos os quatro cardumes, foi de 220 segundos (Média  $\pm$  DP:  $11 \pm 23,57$ ), enquanto o tempo total das fêmeas foi de 694 segundos ( $34,70 \pm 48,83$ ). Já os machos com olhos escurecidos ocuparam a primeira posição durante 647 segundos ( $32,35 \pm 40,91$ ), e as fêmeas com a mesma característica, um total de 833 segundos ( $41,65 \pm 54,89$ ; Fig. 1.8A).

O escurecimento do olho e o sexo também não influenciaram no tempo que os peixes permaneceram na segunda posição dos grupos ( $F = 0,443$ ; g.l. = 12;  $P = 0,726$ ). O tempo total que machos permaneceram na segunda posição do grupo, em todos os quatro cardumes, foi de 236 segundos ( $11,80 \pm 21,62$ ), enquanto o tempo total das fêmeas foi de 662 segundos ( $33,10 \pm 35,55$ ). Os machos com olhos escurecidos ocuparam a segunda posição um tempo total de 487 segundos ( $24,35 \pm 24,41$ ), enquanto as fêmeas com a mesma característica, um total de 578 segundos ( $28,90 \pm 41,47$ ; Fig. 1.8B).

(A)



(B)



**Fig. 1.8** (A) Tempo médio de permanência na primeira posição dos grupos de *S. notomelas* para os machos (M), fêmeas (F), machos com olhos escurecidos (MOP) e fêmeas com olhos escurecidos (FOP). (B) Tempo médio de permanência na segunda posição dos grupos de *S. notomelas* para os mesmos tratamentos. A barra acima de cada coluna, em ambas as figuras, indica o desvio padrão. O tamanho amostral foi de quatro cardumes compostos por 12 peixes (razão sexual de 1:1).

### 4.3 Sinalização de dominância

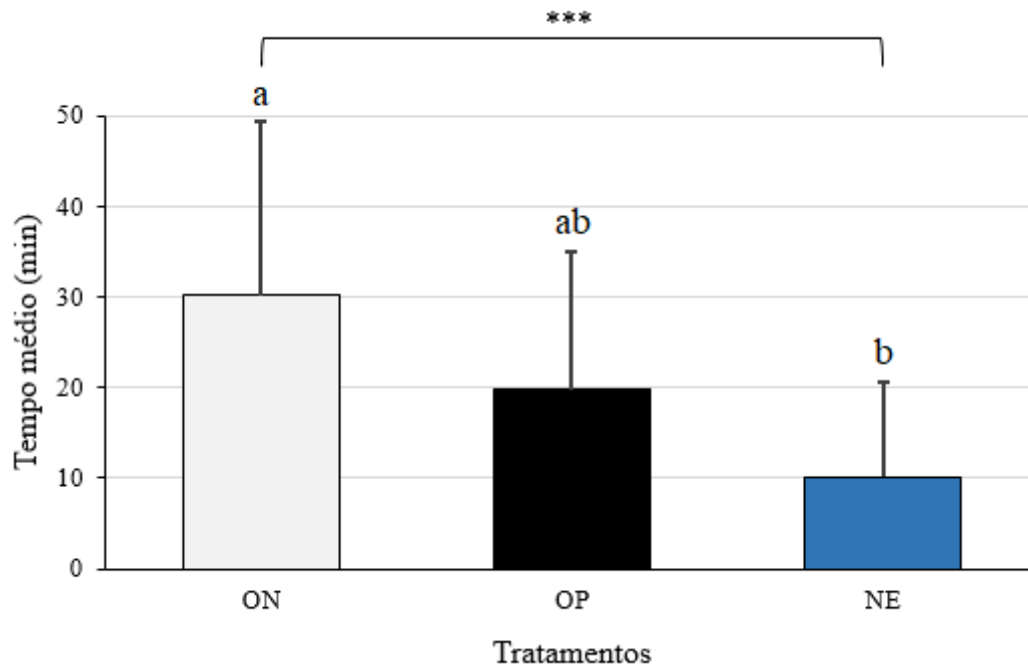
Os valores dos parâmetros da água dos aquários experimentais I e II (concentração de oxigênio dissolvido na água, pH, condutividade e temperatura) são mostrados na tabela 1.3. Essas medidas compreendem o período dos experimentos cujos resultados são aqui descritos, bem como dos experimentos do subtópico 4.4.

**Tabela 1.3** Médias  $\pm$  desvio padrão para os valores da concentração de O<sub>2</sub>, pH, condutividade e temperatura (variáveis medidas semanalmente, aquário I, n = 7; aquário II, n = 9) registradas nos aquários experimentais.

Variáveis	Aquário I	Aquário II
Concentração de O <sub>2</sub> (mg/L)	8,4 $\pm$ 3,2	5,1 $\pm$ 0,7
pH	8,8 $\pm$ 0,1	8,5 $\pm$ 0,1
Condutividade ( $\mu$ S/cm)	102,4 $\pm$ 8,8	103,1 $\pm$ 2,5
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	26,0 $\pm$ 0,6	26,8 $\pm$ 0,9

Do total de 20 peixes com olhos escurecidos utilizados nesse experimento, 12 eram machos e oito eram fêmeas. Como foi mantido o mesmo sexo para o tratamento com ausência de olhos escurecidos, também foram usados 12 machos e oito fêmeas. Já como os peixes que faziam a escolha entre os tratamentos e não possuíam olhos escurecidos eram do sexo oposto aos presentes nos potes, foram utilizados 12 fêmeas e oito machos. O tempo total que os peixes livres permaneceram no tratamento neutro foi de 202,47 minutos (Média  $\pm$  DP: 10,12  $\pm$  10,57), enquanto no tratamento contendo indivíduos com olhos escurecidos foi de 394,55 minutos (19,73  $\pm$  15,33). Já para o tratamento dos indivíduos sem olhos escurecidos, os peixes permaneceram um tempo total de 602,98 minutos (30,15  $\pm$  19,16; Fig. 1.9). Houve diferença de tempo permanecido pelo peixe livre entre os tratamentos (F = 8,109; g.l. = 54; P < 0,001; Fig. 1.9), sendo que os indivíduos livres permaneceram mais tempo próximos a um indivíduo

sem escurecimento dos olhos do que em relação à área neutra do aquário; porém não houve interação entre o sexo do indivíduo com o olho escurecido no tempo permanecido entre os tratamentos pelo peixe livre ( $F = 0,420$ ; g.l. = 2;  $P = 0,658$ ).



**Fig. 1.9** Tempo de permanência (média + DP), em cada tratamento, dos indivíduos de *S. notomelas* que transitavam livremente no aquário experimental. Os tratamentos consistiam de um peixe com ausência de olhos escurecidos (ON), um peixe com os olhos escurecidos (OP) e a área central do aquário, neutra (NE). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

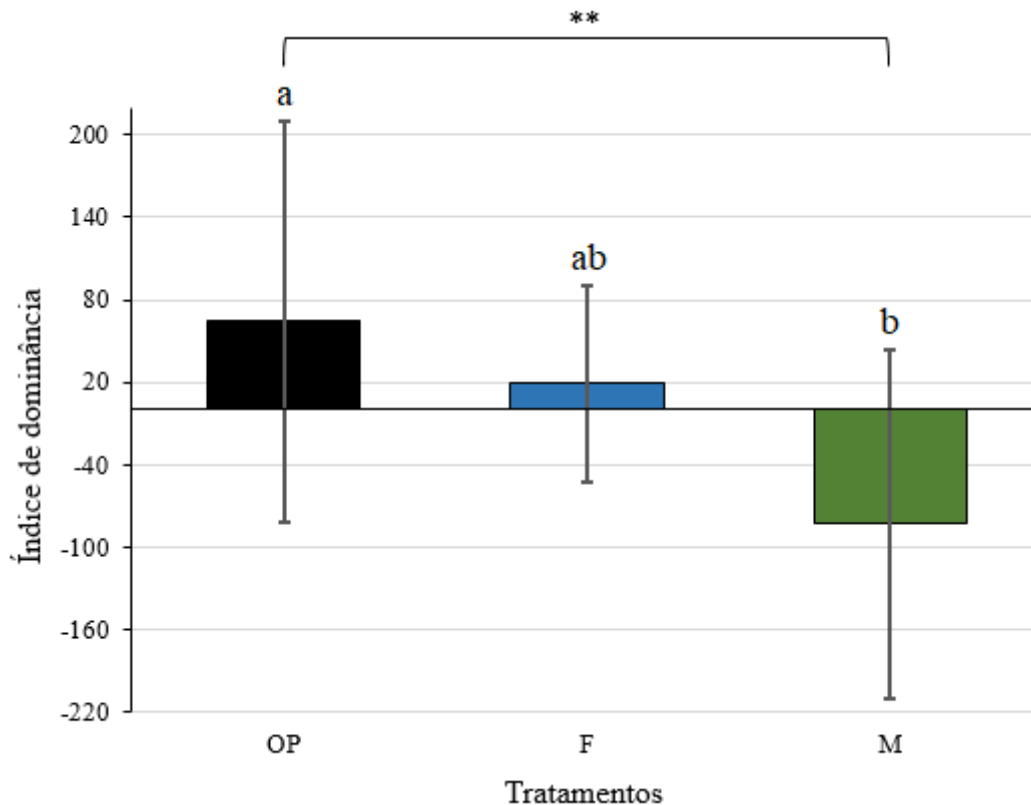
#### 4.4 Agressividade

Os indivíduos com os olhos escurecidos realizaram um total de 955 investidas (Média  $\pm$  DP:  $79,58 \pm 142,80$ ); os machos totalizaram 83 investidas realizadas ( $6,92 \pm 13,24$ ), e as fêmeas contabilizaram um total de 757 atos agonísticos ( $63,08 \pm 77,29$ ). Já em relação a ser o alvo das agressões, os peixes com olhos escurecidos receberam ao todo 183 investidas ( $15,25 \pm 22,14$ ), os machos 1.082 investidas ( $90,17 \pm 129,90$ ), e as fêmeas totalizaram 530 investidas

recebidas ( $44,17 \pm 68,05$ ). A diferença entre investidas realizadas e recebidas determinou o nosso índice de dominância, considerando que quanto mais positivo o índice, mais dominante é o indivíduo. A soma dos índices de todos os indivíduos com olhos escurecidos foi de 772 ( $64,33 \pm 146,06$ ), enquanto os machos totalizaram um valor de  $-999$  ( $-83,25 \pm 126,64$ ); já as fêmeas ficaram com um índice total de 227 ( $18,92 \pm 71,92$ ; Fig. 1.10). Foi constatada diferença do índice de dominância obtido entre os tratamentos ( $\chi^2 = 10,446$ ; g.l. = 2;  $P = 0,005$ ; Fig. 1.10), sendo que os animais com olhos escurecidos foram mais dominantes do que os machos.

#### **4.5 Características anatômicas, sexo e maturação de gônadas**

A população estoque utilizada para estas análises consistia de 25 machos e 31 fêmeas ( $n = 56$ ). O comprimento padrão (em mm) médio dos animais foi de  $31,10 \pm 1,90$ . Em relação à maturação das gônadas, 42 peixes as apresentavam no estágio II (em maturação), 12 no estágio I (imaturas) e apenas dois machos apresentavam as gônadas em estágio III (gônadas maduras). Nenhuma fêmea estava com as gônadas em estágio IV (em desova) e nenhum peixe estava em Estágio V (pós-desova). Esses resultados sugerem que a população não estava em época reprodutiva. A média da proporção da mancha da nadadeira dorsal dos indivíduos, em relação a própria nadadeira, foi de  $71,63\% \pm 12,04\%$ . Já a média da proporção da mancha da base da nadadeira caudal dos animais, em relação ao próprio corpo (excluindo-se as nadadeiras e a mandíbula) foi de  $3,57\% \pm 0,57\%$ . Dentre os 56 peixes da população, 23 (41%) foram classificados como tendo os olhos escurecidos: nove machos e 14 fêmeas. A média da proporção da área da íris/esclera escurecida desses indivíduos foi de  $54,61\% \pm 3,89\%$ . A tabela 1.4 apresenta os coeficientes estimados, erros-padrão e  $P$ -valores do modelo de regressão Beta para os indivíduos de *S. notomelas* analisados. Não houve interação da proporção dos olhos escurecidos dos animais com nenhuma variável.



**Fig. 1.10** Índice de dominância (i.e., a diferença entre investidas realizadas e recebidas, média  $\pm$  DP), calculado para os indivíduos de *S. notomelas* em nosso aquário experimental. Os tratamentos consistem de indivíduos com olhos escurecidos (OP), fêmeas (F) e machos (M). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas de Nemenyi (\*\*  $P < 0,01$ ).

Em relação ao número de raios da nadadeira anal possuindo ganchos, característica exclusiva dos machos, a média foi de  $5,88 \pm 1,30$  raios. A tabela 1.5 mostra o coeficiente estimado, erro-padrão e  $P$ -valor do modelo de regressão Beta para esta característica. Não houve interação da proporção dos olhos escurecidos com o número de raios com ganchos. As funções de ligação utilizadas para os modelos apresentados foi *logit* para a média.

**Tabela 1.4** Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão Beta. A variável resposta é a proporção da área escurecida da íris/esclera dos indivíduos de *S. notomelas* (n = 56), enquanto as variáveis preditoras são o sexo dos animais, o comprimento padrão, a maturação das gônadas e as proporções das manchas da nadadeira dorsal e da base da nadadeira caudal.

<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Erro-Padrão</b>	<b>P-valor</b>
(Intercept)	- 0,971	3,153	0,758
Sexo M	- 0,203	0,337	0,546
Comprimento	- 0,015	0,084	0,852
Maturação Estágio II	0,310	0,376	0,409
Maturação Estágio III	- 0,250	0,886	0,778
Mancha dorsal	- 0,661	1,297	0,610
Mancha caudal	13,625	31,000	0,660
Pseudo-R <sup>2</sup>	0,055		
<i>N</i>	63		

**Tabela 1.5** Estimativa do parâmetro do modelo de regressão Beta. A variável resposta é a proporção da área escurecida da íris/esclera dos indivíduos machos de *S. notomelas* (n = 25), enquanto a variável preditora é o número de raios da nadadeira anal possuindo ganchos.

<b>Variável</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Erro-Padrão</b>	<b>P-valor</b>
(Intercept)	- 1,599	1,031	0,121
Raios	0,043	0,168	0,796
Pseudo-R <sup>2</sup>	0,005		
<i>N</i>	12		

## 5 DISCUSSÃO

A proporção da área escurecida da íris/esclera nos indivíduos de *S. notomelas* não está relacionada com o período reprodutivo da espécie (maturação das gônadas) nem com o sexo dos animais ou com o número de ganchos presentes nos raios da nadadeira anal dos machos, ou seja, não é uma característica exclusiva de nenhum dos sexos e parece não ser determinada por influência da seleção sexual (i.e., na escolha de parceiros para a reprodução). Em algumas espécies de peixes ocorre sinalização de dominância, por meio de coloração corporal, apenas em um dos sexos (Maruska e Fernald 2013; Sedláček et al. 2014) ou somente em época reprodutiva (Kodric-Brown 1998; Morrongiello et al. 2010), por isso foi importante excluirmos essas relações. O escurecimento dos olhos também não está associado ao comprimento padrão dos animais e nem ao tamanho proporcional das manchas presentes na nadadeira dorsal e na base da nadadeira caudal, logo, essa característica não se apresenta em conjunto com alguma outra possível sinalização de dominância visual (proporção de manchas) ou física (tamanho do corpo) dos indivíduos.

A agressividade da espécie não diminuiu ao longo do tempo, considerando-se os quatro cardumes que permaneceram mais de 40 dias em aclimatação. Esse resultado sugere que uma potencial estabilidade hierárquica é efêmera nos grupos sociais de *S. notomelas*, e os animais competem entre si constantemente por um *status* dominante. Uma estruturação hierárquica semelhante foi relatada para a espécie *Oreochromis mossambicus*, com a dominância intragrupo perdurando instável por semanas (Oliveira e Almada 1996). Porém, a estabilidade social pode ter ocorrido em *S. notomelas* entre os indivíduos com um alto *status* dentro da hierarquia, mas a instabilidade ter predominado entre os animais submissos, cujas disputas sociais podem ter continuado constantes entre as semanas analisadas e impactado na agressividade geral observada nos grupos. Tal característica foi relatada para grupos sociais

de *Lepomis macrochirus*, com uma definida hierarquia de dominância estável entre os peixes dominantes, mas indistinta entre os animais submissos (Dugatkin e Wilson 1992). Apesar de machos e fêmeas terem permanecido agressivos ao longo das semanas, nota-se que os animais com olhos escurecidos, em especial as fêmeas, foram responsáveis pela maior parte das investidas observadas, um indício de que tendem a ser mais agressivos que seus coespecíficos sem olhos escurecidos.

Machos ou fêmeas de *S. notomelas*, estando ou não com os olhos escurecidos, não diferiram entre si no tempo de permanência tanto na primeira quanto na segunda posições dos grupos. Tal resultado sugere que a espécie apresenta uma hierarquia não-linear, e que os indivíduos dominantes permaneceram defendendo a área com recursos, expulsando os indivíduos submissos dela. Esta organização social já foi observada em outras espécies de peixes (Clifton 1990; Nakano 1995). Em uma hierarquia que não apresenta linearidade, não há uma distinção clara na escala entre animais dominantes e submissos (Chase et al., 2002), ou seja, sem posições estabelecidas no grupo, sendo considerados como dominantes os animais que ocupam a área com recursos (Sloman e Armstrong 2002). Importante salientar que a identificação de uma forma de hierarquia nos grupos de *S. notomelas* é uma característica social nunca antes relatada para a família Characidae, sendo um registro comportamental inédito para esse grupo.

Em nosso experimento investigando a possível função de sinalização dos olhos escurecidos em *S. notomelas*, não houve interação do sexo do indivíduo com o olho escurecido no tempo permanecido pelo peixe livre entre os tratamentos, um resultado que corrobora a conclusão de que o escurecimento dos olhos não é um sinal utilizado para a escolha de parceiros reprodutivos na espécie. O peixe livre permaneceu significativamente mais tempo próximo ao peixe sem escurecimento dos olhos do que em relação a área neutra do aquário, o que era

esperado pelo fato de *S. notomelas* ser uma espécie social que naturalmente vive em cardumes e não de modo solitário (Carniatto et al. 2012; Pelicice e Agostinho 2006). De fato, raramente os peixes que transitavam entre os tratamentos permaneciam na área central do aquário experimental, e sim simplesmente trafegavam por ela em direção a algum dos animais presentes nos demais tratamentos. Não houve diferença estatística de tempo permanecido pelo peixe livre próximo a um indivíduo com os olhos escurecidos em relação a outro animal com ausência dessa característica, o que vai contra a hipótese de o escurecimento dos olhos ser utilizado como sinalização de dominância na espécie. Se o peixe livre identificasse o indivíduo com olhos escurecidos como dominante, era esperado que ele não permanecesse próximo a ele (Candolin 2000; Nakano 1994; Zubizarreta et al. 2015). No entanto, é importante ressaltar que, devido a separação física existente entre os animais, as investidas realizadas pelos indivíduos não atingiam o coespecífico diretamente, o que pode ter interferido no comportamento social do peixe livre (i.e., o peixe com olho escurecido, mesmo que demonstrasse ser agressivo, não conseguia demonstrar efetivamente tal comportamento).

Um critério metodológico desse experimento pode ter influenciado no resultado obtido: a escolha de indivíduos com tamanho corporal semelhante. Ao realizarmos esse procedimento, nós neutralizamos o efeito do tamanho corporal como possível fator de dominância em *S. notomelas*; porém, uma característica observada em muitas espécies de peixes é a escolha exibida pelos indivíduos de se juntarem à grupos de tamanho corporal similar como uma estratégia antipredatória (e.g., Krause e Godin 1994; Rodgers et al. 2011; Svensson et al. 2000; Ward e Krause 2001). Um indivíduo que se destaque fenotipicamente dos demais membros do grupo está em maior risco de ser o alvo de um predador visual, uma característica apresentada por grupos de presas, chamada de “efeito da estranheza” (“*oddity effect*”: Landeau e Terborgh 1986; Peuhkuri 1997; Theodorakis

1989). Como *S. notomelas* é uma presa comum nos ambientes onde se encontra (Benitez e Suárez 2009; Lourenço et al. 2008), o “efeito da estranheza” pode ter influenciado na escolha do peixe livre no tempo permanecido próximo aos dois coespecíficos. Visto que ambos tinham tamanho similar ao seu, uma provável escolha impulsionada por comportamento antipredatório era irrelevante, não tendo vantagem permanecer próximo a um indivíduo em específico, portanto, sem preferência entre os tratamentos contendo coespecíficos. Mesmo que a cor dos olhos tenha alguma função de comunicação na espécie, ela pode ter sido atenuada pelo comportamento antipredatório dos animais, uma classe comportamental sob forte pressão seletiva em razão de afetar diretamente a aptidão individual (Lima 1998; Lind e Cresswell 2005).

Em nosso experimento de análise de dominância mensurando a agressividade entre três indivíduos de *S. notomelas* — um macho e uma fêmea sem escurecimento dos olhos, e um indivíduo com olhos escurecidos — tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram o mesmo nível médio de dominância. Em uma primeira análise, esse resultado é contrário ao geralmente encontrado em estudos de dominância em peixes, onde os machos são mais agressivos que as fêmeas (e.g., Holder et al. 1991; McGhee e Travis 2010; Ramallo et al. 2015). Porém, isso pode ser resultado de competição intrasexual dos machos em época reprodutiva, onde as fêmeas são disputadas como um recurso pelos machos (Magellan et al. 2012; Nagaoka e Karino 2015). Nossa população estoque não estava em período reprodutivo ao final dos experimentos, portanto não havia competição intrasexual. Ademais, resultados semelhantes ao nosso também foram encontrados em outros estudos com peixes, sem diferenciação de dominância entre os sexos (Dahlbom et al. 2012; Draud et al. 2004).

Os indivíduos com olhos escurecidos apresentaram um índice de dominância médio maior que os machos, entretanto são tão dominantes quanto as fêmeas (i.e., são tão agressivos quanto as fêmeas). Esse resultado sugere que os peixes com olhos escurecidos são mais agressivos que seus coespecíficos nas populações de *S. notomelas* em um certo grau, mas não são de todo dominantes, o que não corrobora nossa hipótese inicial.

Embora em algumas espécies de peixes a coloração escura dos olhos esteja relacionada à dominância (Burmeister et al. 2005; Magurran e Seghers 1991), em outras espécies ela está associada à diferentes características individuais. Em *Oreochromis niloticus*, por exemplo, está ligada ao nível de estresse dos animais, pois indivíduos que sofreram exposição aérea desenvolveram um escurecimento da íris/esclera (Freitas et al. 2014). Apresentar alta agressividade também está correlacionado com um alto nível de estresse, não somente nos peixes, mas em todos os vertebrados (Summers e Winberg 2006; Winberg e Nilsson 1993), e isso pode explicar parcialmente nossos resultados. No entanto, essa explicação só seria confirmada se as tríades de *S. notomelas* permanecessem mais tempo em convívio social, e se, nesse caso, as fêmeas também desenvolvessem olhos escurecidos, já que foram tão agressivas quanto os indivíduos com tal característica. Curiosamente, olhos escurecidos foram relatados como um sinal de submissão em salmonídeos (O'Connor et al. 1999, Suter e Huntingford 2002) e em ciclídeos (Miyai et al. 2011; Volpato et al. 2003), uma associação que não encontra suporte para *S. notomelas* em nosso estudo, pois os animais com olhos escurecidos obtiveram um índice de dominância elevado.

Em conclusão, nossos resultados não relacionaram a coloração escura da íris/esclera de indivíduos de *S. notomelas* como uma característica reprodutiva ou de competição intrasexual, e nem como algo que se apresenta em conjunto com outras possíveis sinalizações sociais (proporção de manchas em outras regiões do corpo e comprimento dos animais). Não verificamos o surgimento de uma estabilidade hierárquica intragrupo ao longo do tempo na

espécie, e nem evidências de uma organização linear nas relações dominantes-submissos, porém, é um registro novo para Characidae a observação de uma hierarquia em grupos sociais. Os olhos escurecidos não sinalizam dominância em *S. notomelas*, mas os indivíduos com essa característica tendem a ser mais agressivos que os demais membros do grupo. Essa intrigante coloração escurecida dos olhos também é encontrada em outras espécies da família Characidae (e.g., veja a Fig. 5C em Dagosta et al. 2016; Fig. 5 em Ota et al. 2014; e Fig. 5C, 6B, 7B e outras em Silva et al. 2016), mas este estudo é o primeiro a começar uma investigação de sua provável função nos caracídeos. Os resultados indicaram que os olhos escurecidos não são utilizados na comunicação de dominância intragrupo, abrindo outras possibilidades de estudo, (e.g., utilização em comunicação interespecífica). Entretanto, não se pode descartar que essa característica seja simplesmente não-adaptativa.

## REFERÊNCIAS

- Andrade VXL, Campos FFS, Langeani F, Romagosa E (2008) Reproductive dynamics of the main species of fish in the municipal reservoir of São José do Rio Preto. *B Inst Pesca* 34:365–373.
- Ang TZ, Manica A (2010) Benefits and costs of dominance in the angelfish *Centropyge bicolor*. *Ethology* 116:855–865.
- Backström T, Heynen M, Brännäs E, Nilsson J, Magnhagen C (2015) Dominance and stress signaling of carotenoid pigmentation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): Lateralization effects?. *Physiol Behav* 138:52–57.
- Benitez RS, Suárez YR (2009) Biologia populacional de *Serrapinnus notomelas* (Eingenmann, 1915) (Characiformes, Cheirodontinae) em um riacho de primeira ordem na bacia do rio Dourados, Alto rio Paraná. *Pan-Amer J Aquat Sci* 4:271–278.
- Burmeister SS, Jarvis ED, Fernald RD (2005) Rapid behavioral and genomic responses to social opportunity. *PLOS Biol* 3:e363.
- Candolin U (2000) Male-male competition ensures honest signaling of male parental ability in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Behav Ecol Sociobiol* 49:57–61.

- Carniatto N, Fugli R, Cantanhêde G, Gubiani ÉA, Hahn NS (2012) Effects of flooding regime and diel cycle on diet of a small sized fish associated to macrophytes. *Acta Limnol Bras* 24:363–372.
- Casatti L, Mendes HF, Ferreira KM (2003) Aquatic macrophytes as feeding site for small fishes in the Rosana Reservoir, Paranapanema River, Southeastern Brazil. *Braz J Biol* 63:213–222.
- Chase ID, Tovey C, Spangler-Martin D, Manfredonia M (2002) Individual differences versus social dynamics in the formation of animal dominance hierarchies. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5744–5749.
- Chen CC, Fernald RD (2011) Visual information alone changes behavior and physiology during social interactions in a cichlid fish (*Astatotilapia burtoni*). *PloS ONE* 6:e20313.
- Clark R, Kimbrough SO (2017) Social structure, opportunistic punishment and the evolution of honest signaling. *PloS ONE* 12:e0188249.
- Clifton KE (1990) The costs and benefits of territory sharing for the Caribbean coral reef fish, *Scarus iserti*. *Behav Ecol Sociobiol* 26:139–147.
- Cribari-Neto F, Zeileis A (2010) Beta regression in R. *J Stat Softw* 34:1–24.
- Dagosta FCP, Marinho MMF, Camelier P, Lima FCT (2016) A new species of *Hyphessobrycon* (Characiformes: Characidae) from the upper Rio Juruena basin, central Brazil, with a redescription of *H. cyanotaenia*. *Copeia* 104:250–259.
- Dahlbom SJ, Backström T, Lundstedt-Enkel K, Winberg S (2012) Aggression and monoamines: effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 228:333–338.
- Draud M, Macías-Ordóñez R, Verga J, Itzkowitz M (2004) Female and male Texas cichlids (*Herichthys cyanoguttatum*) do not fight by the same rules. *Behav Ecol* 15:102–108.
- Drews C (1993) The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125:283–313.
- Dugatkin LA, Wilson DS (1992) The prerequisites for strategic behaviour in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Anim Behav* 44:223–230.
- Evans MR, Norris K (1996) The importance of carotenoids in signaling during aggressive interactions between male firemouth cichlids (*Cichlasoma meeki*). *Behav Ecol* 7:1–6.
- Fernald RD (2014) Communication about social status. *Curr Opin Neurobiol* 28:1–4.
- Ferreira CDP, Casatti L (2006) Influência da estrutura do hábitat sobre a ictiofauna de um riacho em uma micro-bacia de pastagem, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Zool* 23:642–651.

- Freitas RHA, Negrão, CA, Felício, AKC, Volpato GL (2014) Eye darkening as a reliable, easy and inexpensive indicator of stress in fish. *Zoology* 117:179–184.
- Hahn NS, Loureiro-Crippa VE (2006) Estudo comparativo da dieta, hábitos alimentares e morfologia trófica de duas espécies simpátricas, de peixes de pequeno porte, associados à macrófitas aquáticas. *Acta Sci Biol Sci* 28:359–364.
- Holder JL, Barlow GW, Francis RC (1991) Differences in aggressiveness in the Midas cichlid fish (*Cichlasoma citrinellum*) in relation to sex, reproductive state and the individual. *Ethology* 88:297–306.
- Holekamp KE, Strauss ED (2016) Aggression and dominance: an interdisciplinary overview. *Curr Opin Behav Sci* 12:44–51.
- Järvi T (1990) The effects of male dominance, secondary sexual characteristics and female mate choice on the mating success of male Atlantic salmon *Salmo salar*. *Ethology* 84:123–132.
- Kelley JL, Rodgers GM, Morrell LJ (2016) Conflict between background matching and social signalling in a colour-changing freshwater fish. *R Soc Open Sci* 3:160040.
- Kodric-Brown A (1998) Sexual dichromatism and temporary color changes in the reproduction of fishes. *Amer Zoo* 38:70–81.
- van der Kooij MA, Sandi C (2015) The genetics of social hierarchies. *Curr Opin Behav Sci* 2:52–57.
- Krause J, Godin JGJ (1994) Shoal choice in the banded killifish (*Fundulus diaphanus*, Teleostei, Cyprinodontidae): effects of predation risk, fish size, species composition and size of shoals. *Ethology* 98:128–136.
- Kudryavtseva NN (2000) Agonistic behavior: a model, experimental studies, and perspectives. *Neurosci Behav Physiol* 30:293–305.
- Lampert VR, Azevedo MA, Fialho CB (2004) Reproductive biology of *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) from rio Vacacaí, RS, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 2:209–215.
- Landeau L, Terborgh J (1986) Oddity and the ‘confusion effect’ in predation. *Anim Behav* 34:1372–1380.
- Lima SL (1998) Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Adv Stud Behav* 27:215–290
- Lind J, Cresswell W (2005) Determining the fitness consequences of antipredation behavior. *Behav Ecol* 16:945–956.

- Lourenço LS, Suárez YR, Florentino AC (2008) Aspectos populacionais de *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915) e *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, 1908 (Characiformes: Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná. *Biota Neotrop* 8:43–49.
- Magellan K, Johnson A, Williamson L, Richardson M, Watt W, Kaiser H (2012) Alteration of tank dimensions reduces male aggression in the swordtail. *J Appl Ichthyol* 28:91–94.
- Magurran AE, Seghers BH (1991) Variation in schooling and aggression amongst guppy (*Poecilia reticulata*) populations in Trinidad. *Behaviour* 118:214–234.
- Malabarba LR, Jerep FC (2014) Review of the species of the genus *Serrapinnus* Malabarba, 1998 (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from the rio Tocantins-Araguaia basin, with description of three new species. *Zootaxa* 3847:57–79.
- Malabarba LR (1998) Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS (eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, pp 193–233.
- Marshall NJ, Vorobyev M (2003) The design of color signals and color vision in fishes. In: Collin SP, Marshall, NJ (eds) *Sensory processing in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York, pp 194–222.
- Martin FD, Hengstebeck MF (1981) Eye colour and aggression in juvenile guppies, *Poecilia reticulata* peters (Pisces: Poeciliidae). *Anim Behav* 29:325–331.
- Maruska KP, Fernald RD (2013) Social regulation of male reproductive plasticity in an African cichlid fish. *Integr Comp Biol* 53:938–950.
- McGhee KE, Travis J (2010) Repeatable behavioural type and stable dominance rank in the bluefin killifish. *Anim Behav* 79:497–507.
- McRobert SP, Bradner J (1998) The influence of body coloration on shoaling preferences in fish. *Anim Behav* 56:611–615.
- Miyai CA, Sanches FHC, Costa TM, Colpo KD, Volpato GL, Barreto RE (2011) The correlation between subordinate fish eye colour and received attacks: a negative social feedback mechanism for the reduction of aggression during the formation of dominance hierarchies. *Zoology* 114:335–339.
- Morrongiello JR, Bond NR, Crook DA, Wong BBM (2010) Nuptial coloration varies with ambient light environment in a freshwater fish. *J Evol Biol* 23:2718–2725.

- Nagaoka E, Karino K (2015) Female presence promotes male–male aggression among *Tanichthys albonubes*, a fish species without intense combat. *J Ethol* 33:189–195.
- Nakano S (1994) Variation in agonistic encounters in a dominance hierarchy of freely interacting red-spotted masu salmon (*Oncorhynchus masou ishikawai*). *Ecol Freshw Fish* 3:153–158.
- Nakano S (1995) Competitive interactions for foraging microhabitats in a size-structured interspecific dominance hierarchy of two sympatric stream salmonids in a natural habitat. *Can J Zool* 73:1845–1854.
- O'Connor, KI, Metcalfe NB, Taylor AC (1999) Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*?. *Anim Behav* 58:1269–1276.
- Oliveira RF, Almada VC (1996) On the (in)stability of dominance hierarchies in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Aggress Behav* 22:37–45.
- Olsson KH, Johansson S, Blom EL, Lindström K, Svensson O, Sköld HN, Kvarnemo C (2017) Dark eyes in female sand gobies indicate readiness to spawn. *PloS ONE* 12:e0177714.
- Ota RP, Lima FCT, Pavanelli CS (2014) A new species of *Hemigrammus* Gill, 1858 (Characiformes: Characidae) from the rio Madeira and rio Paraguai basins, with a redescription of *H. lunatus*. *Neotrop Ichthyol* 12:265–279.
- Papadakis VM, Glaropoulos A, Alvanopoulou M, Kentouri M (2016) A behavioural approach of dominance establishment in tank-held sea bream (*Sparus aurata* L.) under different feeding conditions. *Aquacult Res* 47:4015–4023.
- Pelicice FM, Agostinho AA (2006) Feeding ecology of fishes associated with *Egeria* spp. patches in a tropical reservoir, Brazil. *Ecol Freshw Fish* 15:10–19.
- Pérez-Rodríguez L, Jovani R, Stevens M (2017) Shape matters: animal colour patterns as signals of individual quality. *Proc R Soc B* 284:20162446.
- Peuhkuri, N (1997) Size-assortative shoaling in fish: the effect of oddity on foraging behaviour. *Anim Behav* 54:271–278.
- Plenderleith M, Van Oosterhout C, Robinson RL, Turner GF (2005) Female preference for conspecific males based on olfactory cues in a Lake Malawi cichlid fish. *Biol Lett* 1:411–414.
- Protas ME, Patel NH (2008) Evolution of coloration patterns. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:425–446.

- Ramallo MR, Birba A, Honji RM, Morandini L, Moreira RG, Somoza GM, Pandolfi M (2015) A multidisciplinary study on social status and the relationship between inter-individual variation in hormone levels and agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish. *Horm Behav* 69:139–151.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rodgers GM, Ward JR, Askwith B, Morrell LJ (2011) Balancing the dilution and oddity effects: decisions depend on body size. *PLoS ONE* 6:e14819.
- Sapolsky RM (2004) Social status and health in humans and other animals. *Annu Rev Anthropol* 33:393–418.
- Sathyan R, Couldridge VCK (2013) Female preference for blue in Japan blue guppies (*Poecilia reticulata*). *Environ Biol Fish* 96:953–959.
- Sedláček O, Baciaková B, Kratochvíl L (2014) Evolution of body colouration in killifishes (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae, Nothobranchiidae, Rivulidae): Is male ornamentation constrained by intersexual genetic correlation?. *Zool Anz* 253:207–215.
- Sefc KM, Brown AC, Clotfelter ED (2014) Carotenoid-based coloration in cichlid fishes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 173:42–51.
- Sheehan MJ, Bergman TJ (2015) Is there an evolutionary trade-off between quality signaling and social recognition?. *Behav Ecol* 27:2–13.
- Silva GSC, Melo BF, Oliveira C, Benine RC (2016) Revision of the South American genus *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Teleostei: Characidae) with description of four new species. *Zootaxa* 4200:1–46.
- Sköld HN, Aspögren S, Cheney KL, Wallin M (2016) Fish chromatophores—from molecular motors to animal behavior. *Int Rev Cell Mol Biol* 321:171–219.
- Sloman KA, Armstrong JD (2002) Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena?. *J Fish Biol* 61:1–23.
- Suárez YR, Valério SB, Tondato KK, Ximenes LQL, Felipe TRA (2007) Determinantes ambientais da ocorrência de espécies de peixes em riachos de cabeceira da bacia do rio Ivinhema, alto rio Paraná. *Acta Sci Biol Sci* 29:145–150.
- Summers CH, Winberg S (2006) Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *J Exp Biol* 209:4581–4589.

- Suter HC, Huntingford FA (2002) Eye colour in juvenile Atlantic salmon: effects of social status, aggression and foraging success. *J Fish Biol* 61:606–614.
- Svensson PA, Barber I, Forsgren E (2000) Shoaling behaviour of the two-spotted goby. *J Fish Biol* 56:1477–1487.
- Theis A, Salzburger W, Egger B (2012) The function of anal fin egg-spots in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *PLoS ONE* 7:e29878.
- Theodorakis CW (1989) Size segregation and the effects of oddity on predation risk in minnow schools. *Anim. Behav* 38:496–502.
- Volpato GL, Luchiari AC, Duarte CRA, Barreto RE, Ramanzini GC (2003) Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Braz J Med Bio Res* 36:1659–1663.
- Ward AJ, Krause J (2001) Body length assortative shoaling in the European minnow, *Phoxinus phoxinus*. *Anim Behav* 62:617–621.
- Whiteman EA, Côté IM (2004) Dominance hierarchies in group-living cleaning gobies: causes and foraging consequences. *Anim Behav* 67:239–247.
- Winberg S, Nilsson GE (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 106:597–614.
- Zubizarreta L, Stoddard PK, Silva A (2015) Aggression levels affect social interaction in the non-breeding territorial aggression of the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *Ethology* 121:8–16.

## CAPÍTULO 2<sup>5</sup>

### ***Serrapinnus notomelas* como um modelo animal para pesquisas laboratoriais: investigações sobre seu bem-estar em cativeiro**

#### **RESUMO**

Os peixes são utilizados cada vez mais como espécies modelo em investigações científicas, sendo o peixe-zebra (*Danio rerio*), originário da Ásia, a espécie mais comumente utilizada. Porém, ao se estudar a dinâmica das populações e comunidades inerentes à regiões específicas, incluindo influências antrópicas, há necessidade do uso de espécies nativas. Desse modo, propomos a escolha de *Serrapinnus notomelas*, um caracídeo Neotropical, para pesquisas laboratoriais, principalmente no Brasil. Justificamos a escolha da espécie baseando-se nas características que o organismo-teste ideal deve possuir para pesquisas em Toxicologia comportamental: ampla distribuição geográfica, porte pequeno, não migrador, grande abundância nos habitats que ocorre, relevância ecológica e alta resistência em condições de laboratório. Ao propormos *S. notomelas* como espécie modelo em estudos laboratoriais, realizamos experimentos com o objetivo de verificar possíveis diferenças comportamentais ocasionadas pelo ambiente em cativeiro ou pelo tamanho do cardume, nos quais aspectos do bem-estar da espécie foram considerados. Mensuramos a agressividade e o forrageamento dos animais em aquários contendo diferentes níveis de enriquecimento ambiental em comparação com um aquário sem enriquecimento. Os mesmos aspectos comportamentais foram quantificados em grupos de diferentes tamanhos. Não encontramos influência do enriquecimento ambiental sobre o comportamento agonístico e alimentar da espécie, o que é um resultado favorável para a utilização da espécie em Toxicologia pois, neste tipo de estudo,

---

<sup>5</sup> Redigido parcialmente segundo as normas para submissão de artigo na revista *Applied Animal Behaviour Science*. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/applied-animal-behaviour-science/0168-1591/guide-for-authors>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

a presença de estruturas pode interferir nos resultados obtidos. O aumento do tamanho do grupo também não teve efeito sobre a agressividade dos indivíduos, porém o aumento do tamanho do cardume promoveu uma maior intensidade de forrageamento. Nossos resultados reforçam a necessidade de investigações espécie-específicas em relação tanto ao enriquecimento quanto ao tamanho do cardume quando se deseja aprimorar o bem-estar de peixes cativos.

**Palavras-chave:** Espécie-teste. Toxicologia comportamental. Agressividade. Forrageamento. Enriquecimento ambiental. Tamanho do grupo.

## 6 INTRODUÇÃO

A utilização de peixes na pesquisa científica internacional tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Schaeck et al., 2013). Esses animais são utilizados tanto em estudos de pesquisa básica quanto aplicada (Lin et al., 2016; Romano et al., 2014). A ampla diversidade no uso dos peixes na investigação científica se deve por esses animais compartilharem muitas características em comum com os demais vertebrados, como o funcionamento de muitos órgãos e sistemas, além de uma alta capacidade adaptativa, utilização de uma grande variedade de habitats e baixo custo de criação e manutenção em cativeiro em relação aos mamíferos (Bolis et al., 2001; Schaeck et al., 2013). A espécie de peixe modelo mais utilizada na ciência é o peixe-zebra (*Danio rerio*) (Ribas e Piferrer, 2014), cuja distribuição geográfica natural é a região do Himalaia (Sul da Ásia) e Myanmar (Arunachalam et al., 2013). No entanto, há a necessidade da utilização de espécies nativas quando se deseja investigar características próprias de cada região, como a dinâmica das populações e comunidades locais, incluindo aqui influências antrópicas (Sax e Gaines, 2003).

Nesse contexto, nós propomos a espécie de peixe Neotropical *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915) (Characidae: Cheirodontinae) como uma espécie de peixe modelo a ser utilizada em pesquisas laboratoriais. Justificamos a nossa escolha fundamentando-se nas características ideais que o organismo-teste deve possuir para ser utilizado na Toxicologia comportamental — o estudo das alterações no comportamento de uma espécie resultantes de exposições subletais a estressores químicos (Kane et al., 2005) —, listadas por Kane et al. (2005): (1) alta relevância ecológica; (2) susceptibilidade aos fatores de estresse de interesse do pesquisador; (3) ampla distribuição geográfica; (4) fácil de ser mantido em condições de laboratório; (5) taxa de reprodução relativamente elevada, maturação relativamente precoce e fertilização fácil; (6) relevância ambiental para exposições potenciais (foi exposto ao contaminante de teste na natureza); e (7) capacidade de gerar dados reprodutíveis em condições laboratoriais controladas.

Não restringimos a utilização laboratorial de *S. notomelas* somente à testes toxicológicos comportamentais, mas nos baseamos nessa área de pesquisa pelo fato dela ser promissora na inferência de efeitos toxicológicos em níveis populacionais e da própria comunidade dos organismos aquáticos (Peterson et al., 2017; Pyle e Ford, 2017; Weis et al., 2011). Ademais, testes toxicológicos dessa natureza são relativamente rápidos e simples de realizar, não invasivos e possuem baixo custo, além do comportamento ser altamente sensível a uma ampla gama de contaminantes (Hellou, 2011; Melvin e Wilson, 2013). As características favoráveis e as limitações de *S. notomelas* como espécie-teste em Toxicologia comportamental são descritas a seguir, com exceção do item (2), cuja objetividade irá variar dependendo do interesse dos pesquisadores ou das substâncias químicas antropogênicas relevantes para a localidade específica dos estudos, o que demandará testes empíricos para testar sua validade com *S. notomelas*. Entretanto, testes toxicológicos com o herbicida de amplo espectro

Roundup® e com a cafeína (um contaminante aquático emergente) foram realizados utilizando a espécie, com bons resultados (P. Meletti, dados não publicados).

Primeiramente, as espécies de Cheirodontinae geralmente são abundantes nos ambientes que ocorrem (Malabarba, 1998), algo que facilita sua captura em campo. *Serrapinnus notomelas* possui porte pequeno, raramente excede 40 mm de comprimento total (Piana et al., 2006), e está presente na bacia hidrográfica do Alto rio Paraná (Malabarba, 2003) e Amazônica (Ohara et al., 2017; Palacios e Ortega, 2008). É uma espécie intermediária na cadeia alimentar, pois *S. notomelas* alimenta-se de organismos produtores (especialmente algas) e outros de níveis tróficos inferiores (pequenos invertebrados) e ao mesmo tempo é uma presa comum nos locais que habita (Benitez e Suárez, 2009; Carniatto et al., 2012; Casatti et al., 2003; Lourenço et al., 2008). Assim, é evidente sua relevância ecológica devido à sua função de transportador de energia de níveis tróficos inferiores à altos, uma característica compartilhada com muitas outras espécies de peixes (Van der Oost et al., 2003). Adicionando o fato que *S. notomelas* é uma espécie não migratória (Suzuki et al., 2004), o que assegura que será presumivelmente exposta em contaminações ambientais locais, os itens (1), (3) e (6) são satisfatoriamente atendidos.

Em relação ao item (4), o porte pequeno e nenhuma necessidade alimentar específica facilita a manutenção de *S. notomelas* em cativeiro, além do fato que o gênero *Serrapinnus* é de utilização comum entre os aquarofilistas (Malabarba, 2003), o que reforça sua capacidade de adaptação a ambientes cativos. A espécie já foi eventualmente utilizada em pesquisas laboratoriais (Figueiredo et al., 2015; Meletti et al., 2003), o que demonstra que atende à exigência do item (7). A característica (5) é a única que *S. notomelas* contempla, até o momento, parcialmente. Na natureza, pelo fato de ser altamente predada, a espécie possui uma taxa de crescimento alta como estratégia de maximização do sucesso reprodutivo

(Lourenço et al., 2008), ou seja, atinge a maturação sexual relativamente rápido e possui uma taxa reprodutiva elevada. No entanto, não há estudos na literatura científica sobre a reprodução em cativeiro de *S. notomelas*, o que pode ser um indicativo da dificuldade da espécie se reproduzir em ambientes cativos. Porém, consideramos que isso não é um impedimento para a utilização da espécie em Toxicologia comportamental devido à todas as vantagens aqui apresentadas.

Em relação à manutenção de populações de peixes em cativeiro, é necessário aos pesquisadores se atentarem à questão da qualidade de vida dos animais (i.e., o bem-estar) sob sua responsabilidade, uma preocupação crescente nos últimos anos para esse grupo de animais (Walker et al., 2014). Garantir uma elevada qualidade de vida aos animais utilizados em estudos laboratoriais, além de uma obrigação ética do pesquisador, é fundamental para a qualidade da pesquisa (Jackson, 2003). Em testes de Toxicologia, a manutenção de populações de peixes saudáveis é fundamental para fornecer dados de toxicidade cientificamente robustos e válidos (Williams et al., 2009). Portanto, realizamos experimentos com o objetivo de verificar o bem-estar de *S. notomelas* quando a espécie é mantida em aquário. Há muitas formas de se mensurar o bem-estar, tanto de maneira fisiológica quanto comportamental (Broom, 1991). Neste estudo, focamos na análise da agressividade e do forrageamento dos animais, pois uma alta intensidade de comportamentos agonísticos e uma baixa atividade alimentar promovem uma baixa qualidade de vida aos peixes em cativeiro (Ashley, 2007; Conte, 2004).

Testamos o método do enriquecimento ambiental, comumente utilizado para se elevar o bem-estar de peixes cativos, como um possível redutor da agressividade e incrementador do forrageamento (Näslund e Johnsson, 2016). Também verificamos as consequências do aumento do tamanho do grupo sobre essas características comportamentais de *S. notomelas*,

visto que o tamanho do grupo influencia diretamente na taxa de alimentação e pode influenciar a agressividade em peixes que vivem em cardume (Milinski, 1993; Saxby et al., 2010).

## **7 MATERIAL E MÉTODOS**

### *7.1 Animais experimentais, condições em laboratório e registros comportamentais*

A coleta dos indivíduos de *S. notomelas* (Fig. 1.1, capítulo 1), manutenção dos animais e dos aquários em laboratório, bem como a descrição dos aquários experimentais (I e II) são descritas no subtópico 3.1 do capítulo 1 da presente dissertação. Porém, durante a realização dos experimentos descritos a seguir, somente o aquário estoque estava equipado com um alimentador automático, contendo ração comercial em pó para peixes ornamentais, que era repostada conforme a necessidade. O monitoramento dos parâmetros da água dos aquários experimentais (concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e condutividade da água) foi igualmente realizado semanalmente durante o período experimental. Os valores obtidos para cada variável foram submetidos a um teste *t* para verificação de possível diferença significativa entre os aquários I e II.

O comportamento agonístico analisado (“investida”) e o cuidado para não interferir no comportamento dos animais, durante a experimentação, são também relatados no subtópico 3.1 do capítulo anterior. Entretanto, na realização das análises descritas neste capítulo, somente uma câmera foi utilizada, e o programa de captura de vídeo era do próprio equipamento (*Logitech® Webcam Software*).

### 7.2 Experimento 1: enriquecimento ambiental, comportamento agonístico e forrageamento

O enriquecimento ambiental utilizado foi do tipo físico, produzindo complexidade ambiental aos aquários: exemplares envasados de *Vallisneria gigantea* (dimensões do vaso: 34 cm de comprimento x 11 cm de altura x 13 cm de largura), dois aglomerados suspensos de lã de coloração azul-escuro e um pequeno pedaço de tronco de madeira (21 cm de comprimento, diâmetro irregular) (Fig. 2.1A). Em contraposição ao aquário enriquecido, o outro aquário experimental era mantido sem nenhum tipo de enriquecimento (Fig. 2.1B). Os grupos de *S. notomelas* consistiam de seis indivíduos com razão sexual de 1:1, uma vez que essa é a razão sexual comumente encontrada em cardumes na natureza (Andrade et al., 2008). Manter cativos grupos sociais que geralmente não ocorrem naturalmente é um conhecido fator estressante para animais sociais (Morgan e Tromborg, 2007). O método utilizado para se diferenciar machos e fêmeas é descrito no subtópico 3.2 do capítulo 1.

Os peixes eram retirados do aquário estoque e conduzidos aos aquários experimentais. As filmagens eram iniciadas no dia seguinte, portanto os animais passavam por uma aclimação de cerca de 16 h. Toda manipulação em peixes utilizados em laboratório causa algum nível de estresse (Brydges et al., 2009), mas a emersão aérea, em específico, geralmente produz um pico do cortisol (o hormônio do estresse) no organismo do animal entre 30 min e 1 h após a manipulação, e então tende a normalizar novamente (Barton, 2002). Em peixes-zebra expostos à emersão aérea com uma rede, por exemplo, o cortisol atinge um pico em 15 min, estando normalizado uma hora após a manipulação (Ramsay et al., 2009). As 16 h decorridas entre a exposição aérea dos indivíduos de *S. notomelas* e o início das nossas avaliações seguramente foram suficientes para que o efeito desse estressor fosse eliminado. As filmagens foram realizadas entre os dias 19 e 29 de setembro de 2016 e utilizou-se ao todo oito grupos de animais, totalizando 48 indivíduos.



**Fig. 2.1.** Aquário experimental com enriquecimento ambiental (A): (1) exemplares envasados de *Vallisneria gigantea*; (2) aglomerados suspensos de lã e (3) pequeno pedaço de tronco de madeira. Abaixo (B) o mesmo aquário sem adição de enriquecimento ambiental.

Foi registrado o número de investidas realizadas durante três horas de filmagens diárias, com início às 09:00 h e término às 16:15 h, alternando-se a filmagem entre os dois aquários experimentais a cada hora, com um breve intervalo de 15 min entre as gravações. Cada grupo de animais foi analisado em um ambiente enriquecido e sem enriquecimento; para tal, ao término das gravações diárias, os animais eram trocados de aquário para serem monitorados

no outro tratamento no dia seguinte. Tal delineamento pareado traz resultados mais robustos que uma avaliação de grupos independentes por manter as variações comportamentais inerentes aos próprios indivíduos, deste modo certificando-se que somente a influência do ambiente sobre os animais foi avaliada. O enriquecimento ambiental também sofreu o mesmo processo, mudando de aquário cada vez que dois grupos independentes completavam o experimento (i.e., terem passados pelo aquário enriquecido e não enriquecido).

Ao término das 3 h de filmagens diárias em cada aquário experimental, ração comercial em pó era fornecida aos peixes. A ração, antes de sua utilização, era misturada em água e sugada com uma seringa contendo 3 mL de volume, que era então liberada nos aquários. Este procedimento foi utilizado pelo fato da ração umedecida se depositar mais rapidamente no fundo do aquário em relação à ração seca, além de padronizar a quantidade de ração utilizada em cada repetição experimental. As filmagens tiveram 3 min de duração, e o número de tomadas de alimento a partir do substrato foi contabilizado para cada grupo, pois em menos de 1 min toda a ração já se encontrava nesse estrato do aquário. Para efeito de motivação alimentar, os peixes no momento da gravação estavam com cerca de 24 h sem alimentação. As médias das diferenças entre as investidas e entre as tomadas de alimento registradas para o mesmo grupo em ambos os ambientes foram submetidas a um teste *t* pareado.

### *7.3 Experimento 2: maior nível de enriquecimento ambiental*

Um alto nível de complexidade ambiental pode reduzir a agressividade em peixes enquanto um nível menor de enriquecimento pode não reduzir a agressividade (Barley e Coleman, 2010). Tal questão tem sido pouco estudada, pois a maioria dos estudos de enriquecimento ambiental em peixes compara ambientes sem adição de nenhum material com um outro ambiente enriquecido (revisado em Näslund e Johnsson, 2016). Como a vegetação submersa

fornece refúgio contra a predação para peixes de pequeno porte, além de serem áreas naturais de forrageamento (Rozas e Odum, 1988; Savino e Stein, 1989), também investigamos se o comportamento alimentar seria incrementado em um ambiente mais complexo. Para esses propósitos, realizamos um novo experimento com delineamento experimental igual ao descrito para o experimento 1 que ocorreu entre os dias 06 e 17 de fevereiro de 2017. Nesse experimento, acrescentamos outros materiais ao ambiente enriquecido do experimento 1: um vaso de plástico contendo um exemplar da macrófita *Echinodorus* sp. (dimensões do vaso: 9,5 cm de altura x 7 cm de diâmetro), um cano de PVC de coloração branca (25,5 cm de comprimento x 15 cm de diâmetro) e dois galhos de árvore com algumas ramificações finas (comprimento da maior ramificação central de cada galho: 60 cm e 58 cm, respectivamente). Consideramos esse novo ambiente como altamente estruturado (Fig. 2.2) devido ao pequeno comprimento corporal de *S. notomelas*. Assim como o experimento 1, foram usados oito grupos de seis indivíduos de *S. notomelas*, com razão sexual de 1:1, que totalizaram 48 animais. As médias das diferenças entre as investidas e entre as tomadas de alimento registradas para o mesmo grupo nos dois ambientes (altamente enriquecido e sem enriquecimento) foram submetidas a um teste *t* pareado.



**Fig. 2.2.** Materiais acrescentados ao enriquecimento ambiental inicial (experimento 1, Fig. 2.1A), tornando o tratamento altamente enriquecido utilizado no experimento 2: (1) dois galhos de árvore ramificados; (2) cano de PVC de coloração branca e (3) exemplar envasado da macrófita *Echinodorus* sp.

#### 7.4 Experimento 3: tamanho do grupo, comportamento agonístico e forrageamento

Para comparar a agressividade e a atividade alimentar entre grupos de diferentes tamanhos, o mesmo delineamento experimental utilizado no experimento 1 foi aplicado para oito grupos de 12 indivíduos com razão sexual 1:1. Entretanto, nesse experimento os peixes foram colocados apenas em aquários contendo o mesmo enriquecimento descrito no experimento 1. Um total de 96 indivíduos foram utilizados e os experimentos ocorreram entre os dias 10 e 15 de novembro de 2016.

Dividiu-se o número de investidas e de tomadas de alimento pelo número de indivíduos dos grupos, para se obter a proporção *per capita* de agressividade e de forrageamento, tanto para os dados deste experimento quanto para os dados do experimento 1 (exclusivamente dos

aquários enriquecidos, para manter a padronização). Aplicou-se um teste t de Welch para os dados de investidas e de forrageamento entre os cardumes compostos de diferentes tamanhos, uma vez que os dados eram heteroscedásticos quanto a variância (Investidas:  $F = 10,031$ ; g.l. = 7;  $P = 0,006$ . Forrageamento:  $F = 0,028$ ; g.l. = 7;  $P < 0,001$ ).

### *7.5 Análises estatísticas*

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias antes de se aplicar o teste estatístico adequado (paramétrico ou não-paramétrico). Para esse propósito, foram utilizados o teste de Shapiro-Wilk (normalidade) e o teste F (homogeneidade de variâncias). Todos os testes realizados foram bicaudais, utilizando-se um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R, versão 3.3.0 (R Core Team 2016).

### *7.6 Validação ética*

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina – CEUA UEL (processo nº 11662.2016.70). O comportamento agonístico analisado nunca gerou nenhum dano físico observável e a qualidade da água foi mantida em condições apropriadas (limpezas semanais) em todos os ambientes onde os animais foram mantidos. Os peixes não foram submetidos a nenhum método invasivo.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Parâmetros da água

Não foram encontradas diferenças nas médias da concentração de oxigênio dissolvido na água, pH, condutividade e temperatura nos aquários experimentais I e II (Tabela 2.1).

Portanto os aspectos físicos e químicos da água não tiveram influência entre os grupos analisados nos diferentes ambientes.

**Tabela 2.1.** Médias, seguidas dos desvios padrões, e resultados do teste *t* para os valores da concentração de O<sub>2</sub>, pH, condutividade e temperatura (variáveis medidas semanalmente, n = 5) registradas nos aquários experimentais I e II durante o período de estudo.

Variáveis	Aquário I	Aquário II	<i>t</i> calculado <sup>1</sup>	<i>P</i> -valor
Concentração de O <sub>2</sub> (mg/L)	5,6 ± 0,3	5,0 ± 0,5	2,14	0,064
pH	8,7 ± 0,5	8,8 ± 0,5	0,19	0,852
Condutividade (μS/cm)	105,7 ± 2,4	105,3 ± 1,9	0,31	0,763
Temperatura (°C)	26,9 ± 0,7	26,9 ± 0,4	< 0,01	1

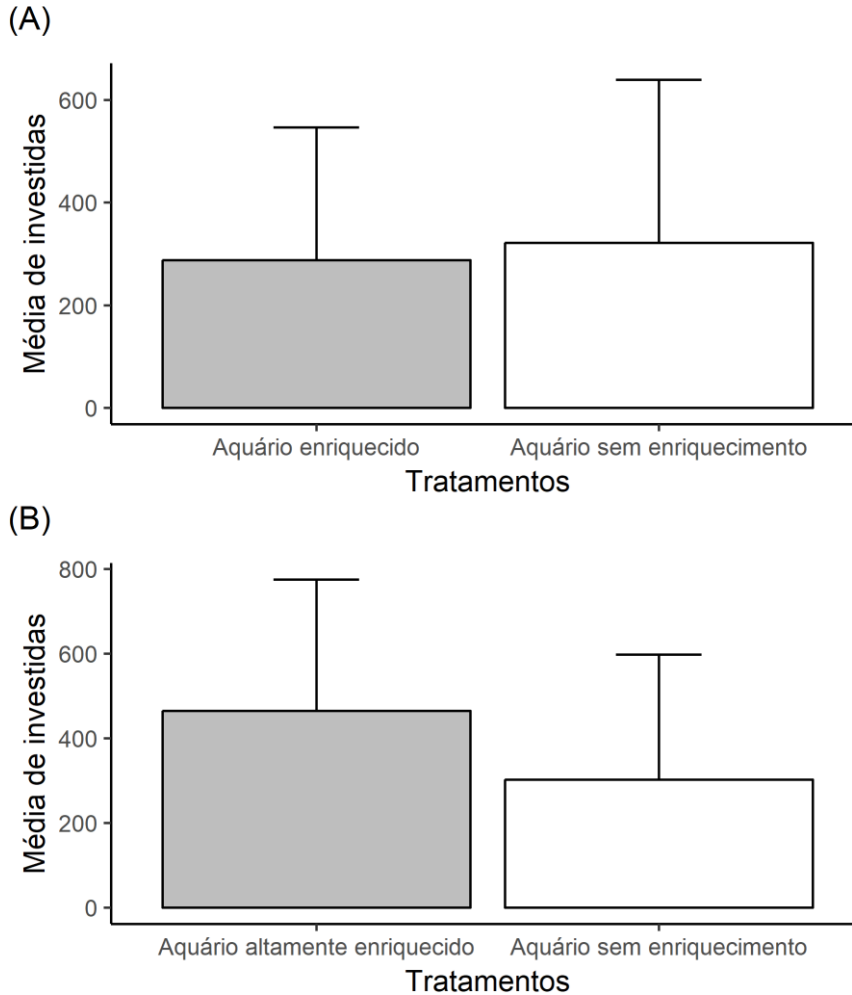
<sup>1</sup>O grau de liberdade é igual a 8 para todos os testes.

### 8.2 Enriquecimento ambiental e agressividade

No experimento 1 foram registradas 2.299 investidas (Média ± DP: 287,37 ± 258,84) nos aquários enriquecidos e 2.576 investidas (322 ± 317,23) nos aquários sem enriquecimento.

Não houve diferença na quantidade média de investidas realizadas pelos peixes entre os tratamentos (*t* pareado = 0,87; g.l. = 7, *P* = 0,412; Fig. 2.3A). No experimento 2 foram registradas 3.715 investidas (464,37 ± 310,34) nos aquários com um alto nível de enriquecimento e 2.416 investidas (302 ± 295,12) nos aquários sem enriquecimento. Não

houve diferença na quantidade média de investidas realizadas pelos peixes entre os tratamentos ( $t$  pareado = 1,52; g.l. = 7;  $P = 0,170$ ; Fig. 2.3B).



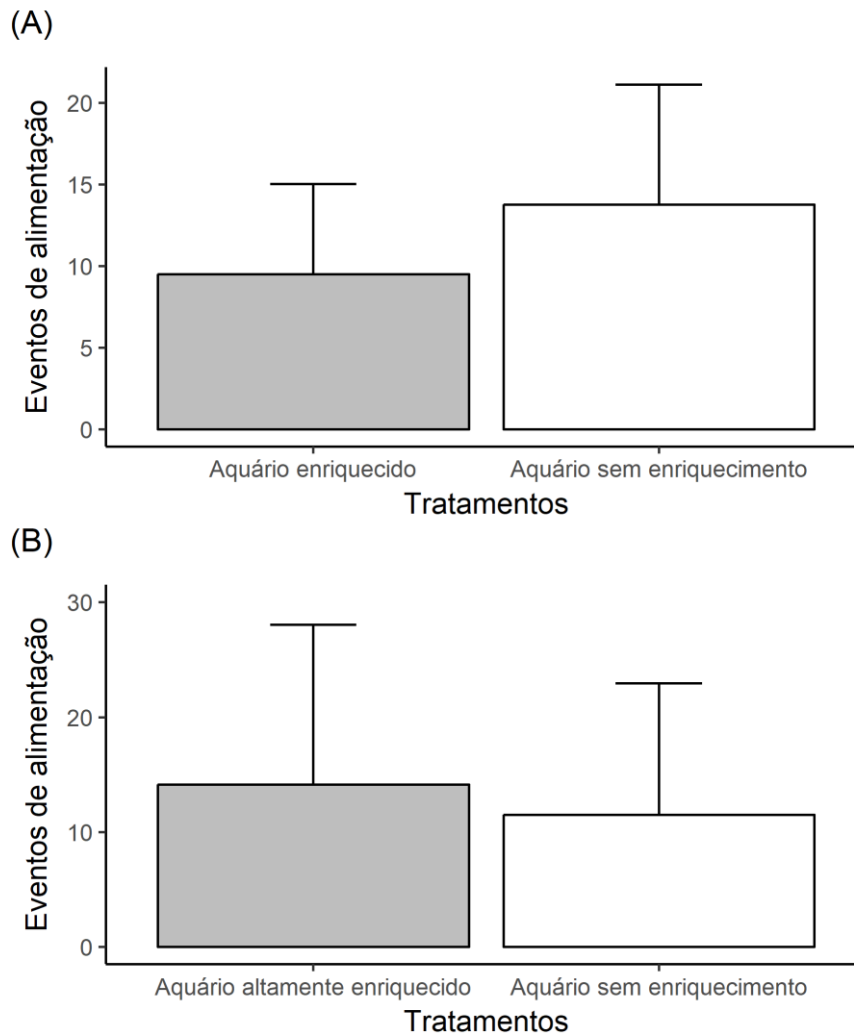
**Fig. 2.3.** Número médio de investidas registradas nos oito grupos de *S. notomelas* nos aquários enriquecidos e sem enriquecimento (A, experimento 1) e nos oito grupos nos aquários altamente enriquecidos e sem enriquecimento (B, experimento 2). A barra acima de cada coluna, em ambas as figuras, indica o desvio padrão.

### 8.3 Enriquecimento ambiental e forrageamento

No experimento 1, registramos ao todo 76 tomadas de alimento (i.e., eventos de alimentação, Média  $\pm$  DP:  $9,5 \pm 5,52$ ), a partir do substrato, quando os grupos de *S. notomelas* estavam no aquário enriquecido. Já para os aquários não enriquecidos, foram registradas um total de 110 tomadas de alimento ( $13,75 \pm 7,36$ ) desses mesmos grupos (Fig. 2.4A). Não houve diferença

significativa na atividade de forrageamento média entre os tratamentos ( $t$  pareado = 1,38; g.l. = 7;  $P = 0,208$ ).

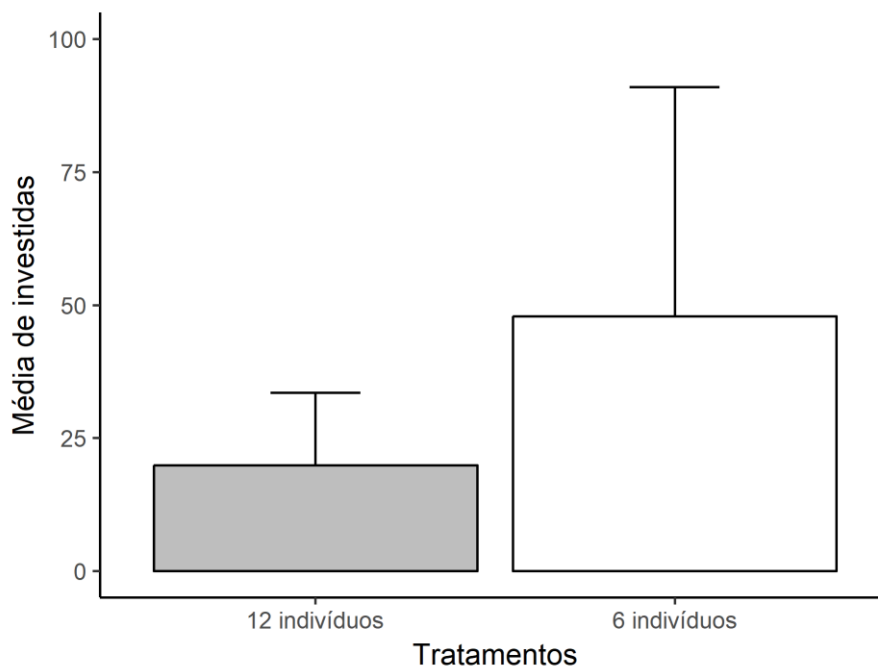
No experimento 2, contabilizamos 113 tomadas de alimento do substrato ( $14,12 \pm 13,93$ ) realizadas pelos grupos de animais no aquário altamente enriquecido, em comparação com 92 tomadas de alimento ( $11,5 \pm 11,45$ ) contabilizadas pelos mesmos grupos no aquário sem enriquecimento (Fig. 2.4B). Não houve diferença significativa do forrageamento dos animais entre os tratamentos ( $t$  pareado = 0,39; g.l. = 7;  $P = 0,701$ ).



**Fig. 2.4.** Média dos eventos de alimentação realizados pelos indivíduos de *S. notomelas* a partir do substrato, durante 3 min, nos aquários enriquecidos e sem enriquecimento (A, experimento 1), e nos aquários altamente enriquecidos e sem enriquecimento (B, experimento 2). A barra acima de cada coluna, em ambas as figuras, indica o desvio padrão.

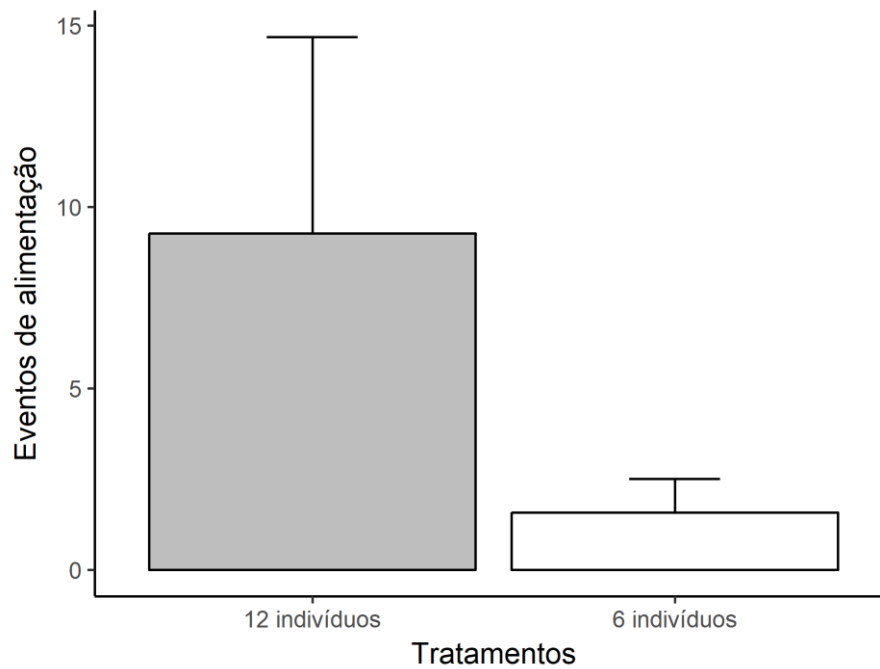
#### 8.4 Tamanho do grupo, agressividade e forrageamento

A soma das proporções *per capita* de investidas registradas nos grupos de seis e de 12 indivíduos de *S. notomelas* (experimento 3) foi de 383,14 (média  $\pm$  DP:  $47,89 \pm 43,13$ ) e 159,22 ( $19,90 \pm 13,62$ ), respectivamente (Fig. 2.5). Não foi verificada diferença significativa no número de investidas contabilizadas entre os cardumes de diferentes tamanhos ( $t = 1,75$ ; g.l. = 8,38;  $P = 0,116$ ).



**Fig. 2.5.** Média da proporção *per capita* de investidas realizadas pelos indivíduos de *S. notomelas* compondo dois grupos de tamanhos distintos: seis e 12 animais. A barra acima de cada coluna indica o desvio padrão.

A soma das proporções *per capita* da tomada de alimento a partir do substrato nos grupos compostos por seis animais foi de 12,64 ( $1,58 \pm 0,91$ ), enquanto os grupos compostos por 12 indivíduos contabilizaram 74,14 ( $9,26 \pm 5,41$ ) eventos de alimentação (Fig. 2.6). Foi constatada diferença significativa na intensidade de forrageamento entre os cardumes de diferentes tamanhos ( $t = 3,96$ ; g.l. = 7,40;  $P = 0,004$ ).



**Fig. 2.6.** Média da proporção *per capita* da contagem de tomadas de alimento a partir do substrato, durante 3 min, pelos indivíduos de *S. notomelas* compondo dois grupos de tamanhos distintos: seis e 12 animais. A barra acima de cada coluna indica o desvio padrão.

## 9 DISCUSSÃO

Os grupos de *S. notomelas* apresentaram o mesmo nível de agressividade (i.e., número de investidas) e o mesmo nível de forrageamento entre os diferentes tratamentos, o que indica que os diferentes níveis de enriquecimento ambiental não tiveram influência sobre tais aspectos comportamentais nessa espécie. Na natureza, *S. notomelas* alimenta-se tanto de algas quanto de pequenos invertebrados (Carniatto et al., 2012) e, devido ao seu pequeno comprimento corporal, é uma presa comum de peixes piscívoros (Benitez e Suárez, 2009; Lourenço et al., 2008). Tais características fazem com que os cardumes de *S. notomelas* sejam encontrados geralmente associados a macrófitas aquáticas (Carniatto et al., 2012; Casatti et al., 2003; Hahn e Loureiro-Crippa, 2006; Pelicice e Agostinho, 2006), algo compartilhado por muitas espécies de peixes de pequeno porte em águas continentais tropicais (Agostinho et al., 2007; Dibble e Pelicice, 2010; Sánchez-Botero et al., 2007).

O micro-habitat complexo proporcionado pela vegetação aquática fornece recursos alimentares e segurança para que peixes herbívoros ou generalistas forrageiem evitando seus predadores (Casatti et al., 2003; Christensen e Persson, 1993; Gotceitas e Colgan, 1989). As estruturas das folhas e caules das plantas propiciam substratos para o desenvolvimento e a fixação de perifíton e macroinvertebrados (Walker et al., 2013). A complexidade desses locais reduz as taxas de predação ao limitar o movimento e a visão dos predadores, que são maiores que suas presas, interferindo assim na taxa de encontro predador-presa (Savino e Stein, 1989). Devido à tais fatores, nós esperávamos que os indivíduos de *S. notomelas* expressassem uma maior atividade alimentar nos aquários enriquecidos em relação aos aquários vazios, além de apresentarem menor agressividade pelo fato da estruturação — nesse caso, todos os objetos adicionados e não somente a vegetação — gerar oportunidades de exploração do ambiente e ter potencial para diminuir o contato visual entre os indivíduos (Näslund e Johnsson, 2016).

A utilização do método do enriquecimento ambiental para aumentar a eficiência em forrageamento mostrou-se efetiva para algumas espécies de peixes: *Sparus aurata* (Batzina e Karakatsouli, 2012), *Salmo salar* (Brown et al., 2003) *Salvelinus confluentus* (Brignon et al., 2017) e *Gadus morhua* (Strand et al., 2010). Todavia, não teve influência sobre o forrageamento de *Oncorhynchus mykiss* (Tatara et al., 2008), e tanques de criação enriquecidos diminuíram a atividade alimentar de *Pelecus cultratus* (Tátrai e Herzig, 1995) e de *Prochilodus lineatus* (Saraiva e Pompeu, 2016). Nesses dois últimos estudos citados, o enriquecimento utilizado dificultou o acesso dos animais ao alimento, seja retendo partículas alimentares ou por limitar a própria movimentação dos indivíduos. Um experimento recente utilizando *S. notomelas* chegou em um resultado semelhante ao aqui relatado, não encontrando evidência de que a espécie aumenta sua eficiência de forrageamento conforme a complexidade do ambiente aumenta (Figueiredo et al., 2015). O alimento fornecido em tal estudo eram presas vivas, enquanto nós utilizamos ração comercial para peixes ornamentais,

provavelmente a forma de alimentação que será utilizada caso a espécie seja mantida em cativeiro para fins de estudos laboratoriais, como aqui propomos.

Em relação ao enriquecimento ambiental reduzir a agressividade de peixes cativos, há fortes evidências favoráveis para espécies territorialistas (Barley e Coleman, 2010; Kadry e Barreto, 2010; Rosengren et al., 2017), pelo fato do enriquecimento proporcionar esconderijos aos animais submissos, criar barreiras visuais e diminuir o nível de atividade geral dos peixes (Näslund e Johnsson, 2016). No entanto, tal resultado não ocorre em todos os casos (Riley et al., 2009), e outros fatores podem ser mais relevantes que o enriquecimento em si, como a densidade dos animais ser alta em relação a um número limitado de estruturas, o que promove um aumento da agressividade (Hoelzer, 1987; Mikheev et al., 2005). Já para as espécies que não apresentam uma defesa clássica de território, como *S. notomelas*, resultados discrepantes foram encontrados. Para o peixe-zebra (*D. rerio*) por exemplo, há estudos que mostram redução da agressividade em ambientes enriquecidos (Basquill e Grant, 1998; Carfagnini et al., 2009), nenhuma influência da estruturação do ambiente sobre os comportamentos agonísticos (Wilkes et al., 2012) ou um incremento desses comportamentos nos indivíduos (Bhat et al., 2015). Por que há tamanha discordância entre os resultados? Primeiramente, a utilização de diferentes tipos de enriquecimentos entre os estudos pode ter influência (Schroeder et al., 2014). Ademais, a agressividade no peixe-zebra, além de estar relacionada com o ambiente dos animais, também possui fatores genéticos (Ariyomo et al., 2013) e sociais (Ricci et al., 2013), sendo o principal deles o desenvolvimento de uma hierarquia de dominância (Larson et al., 2006).

Essas relações dominante/subordinado são encontradas em animais que vivem em grupo, com o comportamento agressivo dos indivíduos em relação aos seus coespecíficos estabelecendo o *status* dentro da hierarquia (Holekamp e Strauss, 2016). Os animais dominantes têm prioridade no acesso a recursos críticos como abrigo, alimento e parceiros sexuais (Drews,

1993). Essa estruturação social ocorre em muitas espécies de peixes teleósteos (revisado em Sloman e Armstrong, 2002) e podem ter influenciado a agressividade de *S. notomelas* em nosso estudo, pois quando a hierarquia é estabelecida, a agressividade intragrupo diminui (Kudryavtseva, 2000). O pouco tempo decorrido entre a formação dos grupos de *S. notomelas* e as análises realizadas deve ter sido insuficiente para o estabelecimento de uma hierarquia de dominância, e provavelmente explica a alta agressividade observada em alguns grupos independentemente do ambiente (entretanto, a estabilidade hierárquica parece ser instável na espécie, vide capítulo 1). É relevante considerar que as hierarquias de dominância estáveis atuam em redução de conflitos e lesões, economia energética e promoção da estabilidade social (i.e., são adaptativas); logo, um certo nível de agressividade pode estar presente em animais sociais cativos sem representar necessariamente um baixo nível de bem-estar (Holekamp e Strauss, 2016; Martins et al., 2012).

Nossos experimentos utilizando enriquecimento ambiental demonstram a importância de investigações próprias para cada espécie de peixe, sob responsabilidade de criadores ou pesquisadores, quando se deseja verificar o efeito de tal método sobre o bem-estar desses animais. Näslund e Johnsson (2016), em um artigo de revisão sobre o enriquecimento ambiental aplicado aos peixes em cativeiro, relatam que de fato muitos estudos sugerem que esse método traz efeitos sobre o comportamento e fisiologia dos animais, mas nem todos os efeitos são positivos (ou não há influência observável, como aqui demonstrado). Nós recomendamos uma meta-análise estatística para se ter uma visão mais ampla e sólida da influência do enriquecimento ambiental sobre os peixes em cativeiro, não somente para as espécies comerciais, mas também para peixes ornamentais e utilizados em pesquisa laboratorial.

Contudo, em testes toxicológicos com peixes, é recomendável que o aquário-teste seja mantido inerte para evitar crescimento microbiano excessivo, e claras observações comportamentais devem ser conduzidas para se comparar com grupos-controle (i.e., a adição de materiais é prejudicial às análises: Wilkes et al., 2012). Portanto, devido a agressividade de *S. notomelas* não diferir entre aquários enriquecidos e vazios e ser facilmente mensurada, esta espécie é um excelente modelo comportamental para ser utilizado em testes toxicológicos.

O acréscimo de indivíduos de *S. notomelas* compondo um grupo não influenciou sua agressividade em cativeiro. Na natureza, o tamanho dos cardumes de *S. notomelas* varia em quantidade, desde menos de 10 indivíduos para até dezenas de animais (F. Jerep, observação pessoal). Ashley (2007) recomenda que uma abundância elevada de peixes deve ser mantida em cativeiro se assim for a forma como os cardumes ocorrem naturalmente. Porém, o mesmo autor relata que a densidade é um fator complexo no que tange o bem-estar de peixes cativos, pois interfere em outras questões que podem prejudicar os animais. Por exemplo, uma alta densidade de peixes invariavelmente levará a uma queda da qualidade da água (Ellis et al., 2002). Portanto, o ideal é analisar parâmetros tanto dos animais, como indicativos comportamentais, quanto do ambiente, como partículas em suspensão na água, para se determinar a densidade ótima para cada espécie (Ashley, 2007; Ellis et al., 2002).

A relação do tamanho do grupo com agressividade vai depender da espécie em questão. Em experimentos utilizando peixes ornamentais, por exemplo, Saxby et al. (2010) observaram uma diminuição da agressividade nas espécies *Paracheirodon innesi* e *Tanichthys albonubes* com o aumento do grupo; um aumento da agressividade em *Pterophyllum scalare* em grupos mais densos e para *Barbus tetrazona* não houve influência do tamanho do grupo sobre a agressividade dos indivíduos.

Grupos maiores de *S. notomelas* forragearam proporcionalmente mais em relação a grupos menores. É um padrão bem estabelecido que cardumes maiores são capazes de detectar um predador com maior eficiência (i.e., “hipótese dos muitos olhos”, Lima, 1990) sem reduzir o tempo de forrageamento (Johnsson, 2003; Magurran e Pitcher; 1983, Morgan e Colgan, 1987). Além disso, a probabilidade individual de ser predado é menor em grupos maiores (i.e., o “efeito de diluição”, Roberts, 1996). O efeito de diluição foi demonstrado em muitas espécies de peixes em experimentos de escolha de cardume, onde um animal solitário escolhe se juntar a cardumes maiores em relação a menores na presença de um predador, um alarme de ameaça, ou mesmo em um ambiente não familiar, potencialmente perigoso (e.g., Gómez-Laplaza e Gerlai, 2011; Hager e Helfman, 1991; Krause et al., 1998). Entretanto, o aumento do tamanho do grupo pode promover um incremento na competição intraespecífica por recursos, e esse fator pode ter influenciado em nossos resultados (Johnsson, 2003).

O tamanho dos grupos deve ser considerado quando se deseja aprimorar o bem-estar de animais sociais mantidos em cativeiro, embora um grande número de animais em um espaço limitado possa trazer prejuízo à qualidade de vida dos mesmos, como anteriormente discutido. O benefício de alocar mais tempo em forrageamento em oposição a vigilância antipredatória certamente incrementará o bem-estar, porém pode elevar a competição intragrupo se os recursos forem limitados. Na natureza, o tamanho das agregações animais são autorregulados, com indivíduos deixando o grupo em resposta a conflitos sociais, o que não é possível de ocorrer em cativeiro e poderá impactar no bem-estar geral dos animais (veja uma revisão do assunto em Estevez et al., 2007).

## 10 CONCLUSÕES

Ao propormos a utilização de *S. notomelas* como uma espécie modelo nativa para estudos laboratoriais no Brasil, justificamos a sua escolha em características desejáveis que o organismo-teste deve possuir para a Toxicologia comportamental. Nós investigamos efeitos da manutenção em cativeiro sobre o bem-estar da espécie, visto que essa é uma preocupação que deve vir *a priori* quando qualquer animal está sob cuidado humano. Apesar do enriquecimento ambiental não ter mostrado efeito (seja positivo ou negativo) sobre a agressividade e o forrageamento da espécie, sugerimos um mínimo de enriquecimento (e.g., alguns espécimes de plantas) nos aquários onde os animais sejam mantidos previamente aos eventuais experimentos, para que desse modo possam se refugiar caso desejem, o que frequentemente ocorre em presença humana. No entanto, esse resultado é favorável à realização de testes toxicológicos, pois nesse contexto o enriquecimento pode influenciar nas análises e resultados dos experimentos. O aumento do tamanho do grupo mostrou um resultado favorável sobre a intensidade de forrageamento e não teve influência sobre a agressividade, o que deve ser considerado. Por isso, sugerimos que se mantenha a espécie em um número mínimo de 12 indivíduos, nunca inferior, e com razão sexual de 1:1. O número máximo de animais em cativeiro, sem que outras questões (e.g., a qualidade da água) interfiram negativamente o bem-estar, deve ser investigado em pesquisas futuras.

## REFERÊNCIAS

Agostinho, A.A., Thomaz, S.M., Gomes, L.C., Baltar, S.L., 2007. Influence of the macrophyte *Eichhornia azurea* on fish assemblage of the Upper Paraná River floodplain (Brazil). *Aquat. Ecol.* 41, 611–619.

- Andrade, V.X.L., Campos, F.F.S., Langeani, F., Romagosa, E., 2008. Reproductive dynamics of the main species of fish in the municipal reservoir of São José do Rio Preto. *B. Inst. Pesca* 34, 365–373.
- Ariyomo, T.O., Carter, M., Watt, P.J., 2013. Heritability of boldness and aggressiveness in the zebrafish. *Behav. Genet.* 43, 161–167.
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., Mayden, R.L., 2013. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish* 10, 1–14.
- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 199–235.
- Barley, A.J., Coleman, R.M., 2010. Habitat structure directly affects aggression in convict cichlids *Archocentrus nigrofasciatus*. *Curr. Zool.* 56, 52–56.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Basquill, S.P., Grant, J.W., 1998. An increase in habitat complexity reduces aggression and monopolization of food by zebra fish (*Danio rerio*). *Can. J. Zool.* 76, 770–772.
- Batzina, A., Karakatsouli, N., 2012. The presence of substrate as a means of environmental enrichment in intensively reared gilthead seabream *Sparus aurata*: growth and behavioral effects. *Aquaculture* 370–371, 54–60.
- Benitez, R.S., Suárez, Y.R., 2009. Biología populacional de *Serrapinnus notomelas* (Eingenmann, 1915) (Characiformes, Cheirodontinae) em um riacho de primeira ordem na bacia do rio Dourados, Alto rio Paraná. *Pan-Amer. J. Aquat. Sci.* 4, 271–278.
- Bhat, A., Greulich, M.M., Martins, E.P., 2015. Behavioral plasticity in response to environmental manipulation among zebrafish (*Danio rerio*) populations. *PloS ONE* 10, e0125097.
- Bolis, C.L., Piccolella, M., Dalla Valle, A.Z., Rankin, J.C., 2001. Fish as model in pharmacological and biological research. *Pharmacol. Res.* 44, 265–280.
- Brignon, W.R., Pike, M.M., Ebbesson, L.O.E., Schaller, H.A., Peterson, J.T., Schreck, C.B., 2017. Rearing environment influences boldness and prey acquisition behavior, and brain and lens development of bull trout. *Environ. Biol. Fish.*, 1–19.
- Broom, D.M., 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* 69, 4167–4175.
- Brown, C., Davidson, T., Laland, K., 2003. Environmental enrichment and prior experience of live prey improve foraging behaviour in hatchery-reared Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 63, 187–196.

- Brydges, N.M., Boulcott, P., Ellis, T., Braithwaite, V.A., 2009. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 295–301.
- Carfagnini, A.G., Rodd, F.H., Jeffers, K.B., Bruce, A.E., 2009. The effects of habitat complexity on aggression and fecundity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Biol. Fish.* 86, 403–409.
- Carniatto, N., Fugi, R., Cantanhêde, G., Gubiani, É.A., Hahn, N.S., 2012. Effects of flooding regime and diel cycle on diet of a small sized fish associated to macrophytes. *Acta Limnol. Bras.* 24, 363–372.
- Casatti, L., Mendes, H.F., Ferreira, K.M., 2003. Aquatic macrophytes as feeding site for small fishes in the Rosana Reservoir, Paranapanema River, Southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.* 63, 213–222.
- Christensen, B., Persson, L., 1993. Species-specific antipredatory behaviours: effects on prey choice in different habitats. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 32, 1–9.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 205–223.
- Dibble, E.D., Pelicice, F.M., 2010. Influence of aquatic plant-specific habitat on an assemblage of small neotropical floodplain fishes. *Ecol. Fresh. Fish* 19, 381–389.
- Drews, C., 1993. The concept and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour* 125, 283–313.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.* 61, 493–531.
- Estevez, I., Andersen, I.L., Nævdal, E., 2007. Group size, density and social dynamics in farm animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 103, 185–204.
- Figueiredo, B.R., Mormul, R.P., Benedito, E., 2015. Structural complexity and turbidity do not interact to influence predation rate and prey selectivity by a small visually feeding fish. *Mar. Freshwater Res.* 66, 170–176.
- Gómez-Laplaza, L.M., Gerlai, R., 2011. Can angelfish (*Pterophyllum scalare*) count? Discrimination between different shoal sizes follows Weber's law. *Anim. Cogn.* 14, 1–9.
- Gotceitas, V., Colgan, P., 1989. Predator foraging success and habitat complexity: quantitative test of the threshold hypothesis. *Oecologia* 80, 158–166.
- Hager, M.C., Helfman, G.S., 1991. Safety in numbers: shoal size choice by minnows under predatory threat. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 29, 271–276.

- Hahn, N.S., Loureiro-Crippa, V.E., 2006. Estudo comparativo da dieta, hábitos alimentares e morfologia trófica de duas espécies simpátricas, de peixes de pequeno porte, associados à macrófitas aquáticas. *Acta Sci. Biol. Sci.* 28, 359–364.
- Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 1–11.
- Hoelzer, G., 1987. The effect of early experience on aggression in two territorial scorpaenid fishes. *Environ. Biol. Fish.* 19, 183–194.
- Jackson, C., 2003. Laboratory fish: impacts of pain and stress on well-being. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 42, 62–73.
- Johnsson, J.I., 2003. Group size influences foraging effort independent of predation risk: an experimental study on rainbow trout. *J. Fish Biol.* 63, 863–870.
- Kadry, V.O., Barreto, R.E., 2010. Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, during resident-intruder interactions. *Neotrop. Ichthyol.* 8, 329–332.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., Brewer, S.K., 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives, in: Ostrander, G.K., (Ed.), *Methods in Aquatic Toxicology*, v. 2., Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 559–590.
- Krause, J., Godin, J.G.J., Rubenstein, D., 1998. Group choice as a function of group size differences and assessment time in fish: the influence of species vulnerability to predation. *Ethology* 104, 68–74.
- Kudryavtseva, N.N., 2000. Agonistic behavior: a model, experimental studies, and perspectives. *Neurosci. Behav. Physiol.* 30, 293–305.
- Larson, E.T., O’Malley, D.M., Melloni, R.H., 2006. Aggression and vasotocin are associated with dominant–subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 167, 94–102.
- Lima, S.L., 1990. The influence of models on the interpretation of vigilance, in: Bekoff, M., Jamieson, D. (Eds.), *Interpretation and Explanation in the Study of Animal Behavior: Explanation, Evolution and Adaptation*. Westview Press, Boulder, v. 2., pp. 246–267.
- Lin, C.Y., Chiang, C.Y., Tsai, H.J., 2016. Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J. Biomed. Sci.* 23, 19.
- Lourenço, L.S., Suárez, Y.R., Florentino, A.C., 2008. Aspectos populacionais de *Serrapinnus notomelas* (Eigenmann, 1915) e *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, 1908 (Characiformes: Characidae) em riachos da bacia do rio Ivinhema, Alto Rio Paraná. *Biota Neotrop.* 8, 43–49.

- Magurran, A.E., Pitcher, T.J., 1983. Foraging, timidity and shoal size in minnows and goldfish. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 12, 147–152.
- Malabarba, L.R., 1998. Monophyly of the Cheirodontinae, characters and major clades (Ostariophysi: Characidae), in: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 193–233.
- Malabarba, L.R., 2003. Subfamily Cheirodontinae (Characins, tetras), in: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. (Org.), *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp. 215–221.
- Malabarba, L.R., Jerep, F.C., 2014. Review of the species of the genus *Serrapinnus* Malabarba, 1998 (Teleostei: Characidae: Cheirodontinae) from the rio Tocantins-Araguaia basin, with description of three new species. *Zootaxa* 3847, 57–79.
- Martins, C.I.M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M.T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J.-C., Carter, T., Planellas, S.R., Kristiansen, T., 2012. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 17–41.
- Meletti, P.C., Rocha, O., Martinez, C.B.R., 2003. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes, in: Brigante, J., Espíndola, E.L.G. (Eds.), *Limnologia fluvial, um estudo no Rio Mogi-Guaçu*. Rima Editora, São Carlos, pp. 149–180.
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere* 93, 2217–2223.
- Mikheev, V.N., Pasternak, A.F., Tischler, G., Wanzenböck, J., 2005. Contestable shelters provoke aggression among 0+ perch, *Perca fluviatilis*. *Environ. Biol. Fish.* 73, 227–231.
- Milinski, M., 1993. Predation risk and feeding behaviour, in: Pitcher, T.J. (Ed.), *Behaviour of Teleost Fishes*, second ed. Chapman & Hall, London, pp. 285–306.
- Morgan, K.N., Tromborg, C.T., 2007. Sources of stress in captivity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102, 262–302.
- Morgan, M.J., Colgan, P.W., 1987. The effects of predator presence and shoal size on foraging in bluntnose minnows, *Pimephales notatus*. *Environ. Biol. Fish.* 20, 105–111.
- Näslund, J., Johnsson, J.I., 2016. Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish Fish.* 17, 1–30.
- Ohara, W.M., Lima, F.C.T., Salvador, G.N., Andrade, M.C., 2017. Peixes do Rio Teles Pires: diversidade e guia de identificação. Gráfica e Editora Amazonas, Goiânia.

- Palacios, V., Ortega, H., 2008. Diversidad ictiológica del Río Inambari, Madre de Dios, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 15, 59–64.
- Pelicice, F.M., Agostinho, A.A., 2006. Feeding ecology of fishes associated with *Egeria* spp. patches in a tropical reservoir, Brazil. *Ecol. Fresh. Fish* 15, 10–19.
- Peterson, E.K., Buchwalter, D.B., Kerby, J.L., LeFauve, M.K., Varian-Ramos, C.W., Swaddle, J.P., 2017. Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Curr. Zool.* 63, 185–194.
- Piana, P.A., Gomes, L.C., Cortez, E.M., 2006. Factors influencing *Serrapinnus notomelas* (Characiformes: Characidae) populations in upper Paraná river floodplain lagoons. *Neotrop. Ichthyol.* 4, 81–86.
- Pyle, G., Ford, A.T., 2017. Behaviour revised: contaminant effects on aquatic animal behaviour. *Aquat. Toxicol.* 182, 226–228.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L., Schreck, C.B., 2009. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. *Aquaculture* 297, 157–162.
- Ribas, L., Piferrer, F., 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev. Aquacult.* 6, 209–240.
- Ricci, L., Summers, C.H., Larson, E.T., O'Malley, D., Melloni, R.H., 2013. Development of aggressive phenotypes in zebrafish: interactions of age, experience and social status. *Anim. Behav.* 86, 245–252.
- Riley, S.C., Tatara, C.P., Berejikian, B.A., Flagg, T.A., 2009. Behavior of steelhead fry in a laboratory stream is affected by fish density but not rearing environment. *North Am. J. Fish. Manag.* 29, 1806–1818.
- Roberts, G., 1996. Why individual vigilance declines as group size increases. *Anim. Behav.* 51, 1077–1086.
- Romano, A., Barca, A., Storelli, C., Verri, T., 2014. Teleost fish models in membrane transport research: the PEPT1 (SLC15A1) H<sup>+</sup>-oligopeptide transporter as a case study. *J. Physiol.* 592, 881–897.
- Rosengren, M., Kvingedal, E., Näslund, J., Johnsson, J.I., Sundell, K., 2017. Born to be wild: effects of rearing density and environmental enrichment on stress, welfare, and smolt migration in hatchery-reared Atlantic salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 74, 396–405.

- Rozas, L.P., Odum, W.E., 1988. Occupation of submerged aquatic vegetation by fishes: testing the roles of food and refuge. *Oecologia* 77, 101–106.
- Sánchez-Botero, J.I., Leitão, R.P., Caramaschi, E.P., Garcez, D.S., 2007. The aquatic macrophytes as refuge, nursery and feeding habitats for freshwater fish from Cabiúnas Lagoon, Restinga de Jurubatiba National Park, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Limnol. Bras.* 19, 143–153.
- Saraiva, S.O., Pompeu, P.S., 2016. Structural and social enrichment: effects on the morphology of a tropical hatchery fish. *Appl. Ecol. Env. Res.* 14, 381–395.
- Savino, J.F., Stein, R.A., 1989. Behavior of fish predators and their prey: habitat choice between open water and dense vegetation. *Env. Biol. Fish.* 24, 287–293.
- Sax, D.F., Gaines, S.D., 2003. Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends Ecol. Evol.* 18, 561–566.
- Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R.W., Sloman, K.A., 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 125, 195–205.
- Schaeck, M., Van den Broeck, W., Hermans, K., Decostere, A., 2013. Fish as research tools: alternatives to in vivo experiments. *Altern. Lab. Anim.* 41, 219–229.
- Schroeder, P., Jones, S., Young, I.S., Sneddon, L.U., 2014. What do zebrafish want? Impact of social grouping, dominance and gender on preference for enrichment. *Lab. Anim.* 48, 328–337.
- Sloman, K.A., Armstrong, J.D., 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena?. *J. Fish Biol.* 61, 1–23.
- Strand, D.A., Utne-Palm, A.C., Jakobsen, P.J., Braithwaite, V.A., Jensen, K.H., Salvanes, A.G., 2010. Enrichment promotes learning in fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 412, 273–282.
- Suzuki, H.I., Pelicice, F.M., Luiz, E.A., Latini, J.D., Agostinho, A.A., 2004. Reproductive strategies of the fish community of the upper Paraná River floodplain, in: Agostinho, A.A., Rodrigues, L., Gomes, L.C., Thomaz, S.M., Miranda L.E. (Eds.), *Structure and functioning of the Paraná River and its floodplain: LTER - Site 6 (PELD - Sítio 6)*. EDUEM, Maringá, pp. 125–130.
- Tatara, C.P., Riley, S.C., Scheurer, J.A., 2008. Environmental enrichment in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) hatcheries: field evaluation of aggression, foraging, and territoriality in natural and hatchery fry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65, 744–753.

- Tátrai, I., Herzig, A., 1995. Effect of habitat structure on the feeding efficiency of young stages of razor fish (*Pelecus cultratus* (L.)): an experimental approach. *Hydrobiologia* 299, 75–81.
- Vajda, A.M., Kumar, A., Woods, M., Williams, M., Doan, H., Tolsher, P., Kookana, R.S., Barber, L.B., 2015. Integrated assessment of wastewater treatment plant effluent estrogenicity in the Upper Murray River, Australia, using the native Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1078–1087.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Walker, M., Díez-León, M., Mason, G., 2014. Animal welfare science: recent publication trends and future research priorities. *Int. J. Comp. Psychol* 27, 80–100.
- Walker, P.D., Wijnhoven, S., van der Velde, G., 2013. Macrophyte presence and growth form influence macroinvertebrate community structure. *Aquat. Bot.* 104, 80–87.
- Weis, J.S., Bergey, L., Reichmuth, J., Candelmo, A., 2011. Living in a contaminated estuary: behavioral changes and ecological consequences for five species. *BioScience* 61, 375–385.
- Wijeyaratne, W.M.D.N., Pathiratne, A., 2006. Acetylcholinesterase inhibition and gill lesions in *Rasbora caverii*, an indigenous fish inhabiting rice field associated waterbodies in Sri Lanka. *Ecotoxicology* 15, 609–619.
- Wilkes, L., Owen, S.F., Readman, G.D., Sloman, K.A., Wilson, R.W., 2012. Does structural enrichment for toxicology studies improve zebrafish welfare? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 139, 143–150.
- Williams, T.D., Readman, G.D., Owen, S.F., 2009. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Lab. Anim.* 43, 107–120.