

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COMO TRATAR O SEU PEIXE: EFEITO DO PROCEDIMENTO
EXPERIMENTAL EM MEDIDAS DE COMPORTAMENTO EM CATIVEIRO, UM
ESTUDO COM *Crenuchus spilurus*

MANAUS – AM

2018

RAQUEL LEITE DE OLIVEIRA ALVES

COMO TRATAR O SEU PEIXE: EFEITO DO PROCEDIMENTO
EXPERIMENTAL EM MEDIDAS DE COMPORTAMENTO EM CATIVEIRO, UM
ESTUDO COM *Crenuchus spilurus*

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Motta Bührnheim

Coorientador: Dr. Tiago Henrique da Silva Pires

MANAUS – AM

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

L533c

Alves, Raquel Leite de Oliveira

Como tratar seu peixe: efeito do procedimento experimental em medidas de comportamento em cativeiro, um estudo com *Crenuchus spilurus* / Raquel Leite de Oliveira Alves. Manaus: [s.n], 2018.

26 f.: color.; 29 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas -
Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas,
Manaus, 2018.

Inclui bibliografia

Orientador: Bührnheim, Cristina Motta

Coorientador: Pires, Tiago Henrique da Silva

1. protocolos experimentais. 2. experimentos comportamentais. 3. dither fish. I. Bührnheim, Cristina Motta (Orient.). II. Pires, Tiago Henrique da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Como tratar seu peixe: efeito do procedimento experimental em medidas de comportamento em cativeiro, um estudo com *Crenuchus spilurus*



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA API)

ALUNO:	RAQUEL LEITE DE OLIVEIRA ALVES
TÍTULO DO TCC:	COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS PARA REDUÇÃO DE ESTRESSE DE PEIXES EM EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS, UMA ANÁLISE COM <u>CRENUCHUS SILURUS</u> (CHARACIFORMES: CRENUCHIDAE)

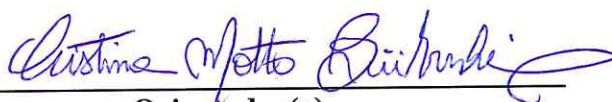
AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	10,0
b) 1º avaliador(a):	10,0
c) 2º avaliador(a):	9,5
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	9,8

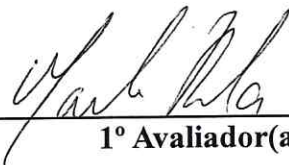
MÉDIA DA NOTA: 9,8

Manaus, 30 de NOVEMBRO de 2018

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA



Orientador(a)



1º Avaliador(a)



2º Avaliador(a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para as minhas conquistas acadêmicas, meu crescimento pessoal e profissional e estiveram comigo durante estes cinco anos. Em especial, meus agradecimentos às seguintes pessoas:

À Jansen Zuanon por todos os conselhos. À Tiago Pires por toda a boa vontade e paciência para me ajudar em toda as fases desse projeto. Aos colegas do LECE, Élio Borghezán, Kalebe Silva e Álvaro Garcia, por todo o suporte no laboratório e conversas sobre ciência.

Aos meus queridos professores da UEA, por todo o incentivo e atenção. À professora Cristina Bührnheim, pelos conselhos e pelo apoio durante o período de graduação.

À Laynah Pimenta, Ana Kezia Pimentel, Juliana Nascimento e Xaiane Martins, por todo o apoio, paciência e companheirismo. Sou grata por cada momento que estivemos juntas. Às que conheci melhor um dia desses, Julie Kenya e Rêgila Mello, obrigada por terem aparecido e tornado meus dias um pouquinho mais divertidos.

À Adriely Melo, que desde o primeiro dia de aula deixou bem claro que não iria largar do meu pé. E assim ela fez. Somos amigas há 5 anos e aparentemente vamos ficar juntas por muitos outros anos. Obrigada por todo o apoio e espero que eu continue tendo paciência.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família pelo carinho e apoio incondicional em tudo que eu planejava fazer. Meus pais sempre estiveram ao meu lado e acreditavam em mim mais do que eu mesma. Agradeço por todo o auxílio e paciência durante todos esses anos, espero que em breve eu possa retornar tudo em dobro.

“Recognize that the very molecules that make up your body, the atoms that construct the molecules, are traceable to the crucibles that were once the centers of high mass stars that exploded their chemically rich guts into the galaxy, enriching pristine gas clouds with the chemistry of life. So that we are all connected to each other biologically, to the earth chemically and to the rest of the universe atomically. That’s kinda cool! That makes me smile and I actually feel quite large at the end of that. It’s not that we are better than the universe, we are part of the universe. We are in the universe and the universe is in us.”

- Neil deGrasse Tyson

RESUMO

Todos os experimentos comportamentais com peixes em cativeiro envolvem métodos de manipulação e enriquecimento ambiental. Pesquisadores utilizam diferentes métodos com o fim de obter respostas mais confiáveis, ou porque a utilização um método alternativo e mais complexo não acarretaria em grande mudança nos resultados obtidos. Contudo, avaliações formais acerca do efeito do uso de tais métodos sobre as respostas comportamentais de peixes são raras. Nós apresentamos aqui uma avaliação do efeito do uso de quatro métodos comumente empregados em estudos experimentais sobre duas variáveis comportamentais. Indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram transferidos dos seus aquários estoque para os aquários experimentais de quatro formas diferentes, aqui denominadas: “método comum”, “não exposição ao ar”, “exposição sucessiva” e “*dither fish*”. Nós medimos o efeito dessas diferentes formas de manipulação sobre o deslocamento dos peixes no aquário experimental e o tempo em que eles se mantiveram longe de uma zona de conforto (uma medida de ousadia). Nossos resultados indicam que o método empregado influencia nas respostas às variáveis comportamentais. A simples transferência usando redes de aquários (aqui chamado de “método comum”) pode ser adequado em estudos em que o pesquisador pretende avaliar o comportamento exploratório e deslocamento no aquário. Utilizar um aparato para a transferência dos peixes (tratamento “não exposição ao ar”) pode ser indicado para estudos em que uma movimentação ativa seja indesejada. Embora amplamente utilizado para este fim, a exposição dos indivíduos ao ambiente experimental em dias consecutivos (aqui chamado de método “exposição sucessiva”) não se mostrou indicado para avaliar tempo de associação à um estímulo e exploração e a manipulação repetida provocou mortes de indivíduos. Enriquecer o aquário experimental com peixes menores (“*dither fish*”) se mostrou efetivo na redução da timidez e em estimular o comportamento exploratório dos peixes. Nós concluímos que a implementação de determinado método deve ser avaliada antes da utilização repetida em experimentos comportamentais.

Palavras-chave: protocolos experimentais, experimentos comportamentais, *dither fish*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos tratamentos “método comum” e “exposição sucessiva”, onde os peixes foram capturados com rede e expostos ao ar. A) aquário estoque; B) aquário experimental.....	15
Figura 2. Representação do procedimento de transferência dos peixes no tratamento “não exposição ao ar”, no qual os peixes permaneceram submersos na água. A) aquário estoque; B) aquário experimental..	16
Figura 3. No tratamento “ <i>dither fish</i> ” os indivíduos de <i>Crenuchus spilurus</i> foram transferidos para aquários experimentais contendo dois cardinais tetras que atuaram como <i>dither fish</i> . A) aquário estoque; B) aquário experimental.....	17
Figura 4. Representação do tempo de natação dos indivíduos de <i>Crenuchus spilurus</i> junto às bordas do aquário.....	19
Figura 5. Representação do deslocamento total dos indivíduos de <i>Crenuchus spilurus</i> no aquário experimental.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de p para as comparações par-a-par do tempo de natação de <i>Crenuchus spilurus</i> próximo à borda.....	18
Tabela 2. Valores de p para as comparações par-a-par do deslocamento total de <i>Crenuchus spilurus</i> no aquário.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO GERAL.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. <i>Crenuchus spilurus</i>	13
3.2. Coleta e Manutenção dos peixes	13
3.3. Tratamentos experimentais	13
3.3.1. Método comum e Exposição sucessiva	14
3.2.3. Não exposição ao ar	15
3.3.3. <i>Dither fish</i>	16
3.4. Análise de dados.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Tempo próximo à borda do aquário	18
4.2. Deslocamento total.	19
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

Estudos comportamentais em laboratório são necessários pois permitem o controle de variáveis biológicas ou ambientais de interesse do pesquisador. Em estudos com peixes, os indivíduos testados precisam ser manipulados (BRYDGES et al., 2009). A manipulação pode envolver a transferência dos peixes de seus aquários estoque para aquários em que há o ambiente controlado. A forma como isso é feita é bastante diversa. Além disso, o ambiente em que os peixes são inseridos pode ser ou não enriquecido com outros indivíduos ou objetos, o que tem o objetivo de reduzir o estresse dos peixes (WILLIAMS et al., 2009).

Pesquisadores utilizam diferentes métodos com base em uma potencial redução do estresse (e.g. BROWN e COLGAN, 1986; DAY et al., 2004; PINHEIRO-DA-SILVA et al., 2016; SILVEIRA, et al., 2018). O uso de determinados métodos em estudos comportamentais é justificado com base na obtenção de respostas biológicas confiáveis ou pela simplicidade, presumindo-se que a utilização de protocolos diferentes e mais complexos não acarretaria em mudanças importantes nas variáveis mensuradas. Assim, acredita-se que esses procedimentos poderão promover o bem-estar dos indivíduos para que os comportamentos não habituais não interfiram nos resultados da pesquisa.

Embora intuitivamente lógico, a relevância do uso de diferentes métodos é mais presumida do que testada, e estudos comparativos acerca de tais métodos se concentram em avaliar os potenciais prejuízos à saúde e bem-estar dos peixes mantidos em cativeiro. Poucos estudos argumentam sobre o efeito de tais tratamentos sobre as respostas avaliadas pelos pesquisadores em experimentos comportamentais.

O método de manuseio mais comumente empregado em experimentos com peixes envolve a captura e transferência dos indivíduos entre aquários utilizando pequenas redes de mão (e.g. SUSKI et al., 2007; BROWN, et al., 2007; FERNANDES et al., 2016; JONES e GODIN, 2009). Apesar de largamente utilizado, há estudos que afirmam que esse procedimento pode ser nocivo aos peixes, pois eles são expostos ao ar durante a transferência, ocasionando respostas fisiológicas ao estresse do momento da captura (BRYDGES et al., 2009; HOSHIBA, GONÇALVES e URBINATI, 2009). Visto

que a exposição dos peixes ao ar pode causar estresse nos indivíduos e, conseqüentemente, afetar a qualidade da pesquisa, a utilização de um método de manuseio que permita que os peixes permaneçam submersos na água foi indicado em favorecer na redução do estresse e, conseqüentemente, a confiabilidade dos dados (BRYDGES et al., 2009).

De fato, medo e estresse podem interferir no comportamento habitual dos indivíduos, e evitar tais efeitos é importante em estudos que avaliam diversos tipos de medidas comportamentais (BARLOW, 1968). Métodos de enriquecimento ambiental podem ser aplicados para preparar um ambiente menos estressante e promover o bem-estar dos indivíduos testados (WILLIAMS, 2009).

Um método de enriquecimento ambiental, denominado na literatura em inglês por *dither fish* (ou *companion fish* em estudos mais recentes), foi frequentemente utilizado por pesquisadores pioneiros em experimentos comportamentais (BARLOW, 1968), principalmente em experimentos com ciclídeos (YANONG, 1996). Muitos estudos justificam o uso desse método para redução de estresse do isolamento, redução da timidez do organismo focal, manter o comportamento habitual, além de diminuir comportamentos agressivos.

Este método consiste em inserir grupos de peixes de tamanhos menores nos aquários experimentais juntamente com o peixe alvo do estudo. Tais *dither fish* podem ser juvenis da espécie alvo do estudo ou indivíduos menores de outras espécies. Estes pequenos peixes aparentemente auxiliam na redução do estresse do organismo focal ao nadarem ativamente pelo aquário e, assim, transmitem segurança aos peixes que serão efetivamente testados (WILLIAMS et al., 2009). Esta técnica foi aplicada em diversos estudos comportamentais de peixes (BROWN e COLGAN, 1986; LAMANNA e EASON, 2003; DAY et al., 2004; LAMANNA e EASON 2007; VAN DER SLUIJS et al., 2008; JONES e GODIN, 2009; SLOMAN et al., 2011; PURSER e RADFORD, 2011; EVANS e GASPARINI, 2013; KELLEY, PHILLIPS e EVANS, 2013; VOELLMY et al., 2014).

Um procedimento mais recente que tem sido utilizado para que peixes respondam melhor aos estímulos ofertados envolve a exposição repetida dos

indivíduos aos aquários experimentais por alguns dias antes do procedimento experimental formal. Somente após um dado número de dias sucessivos de exposição ao ambiente experimental é que os peixes são testados. (OLIVEIRA et al., 2015). Essa exposição diária dos peixes ao ambiente experimental tem a intenção de aclimatar e familiarizar peixes ao ambiente em que o experimento ocorre (OLIVEIRA et al., 2015). Este procedimento frequentemente foi utilizado em estudos relacionados às habilidades cognitivas (OLIVEIRA et al., 2015; PINHEIRO-DA-SILVA et al., 2016).

Devido à necessidade de estudos comparativos sobre os métodos laboratoriais aplicados em estudos com peixes, o presente trabalho pretendeu avaliar os pontos negativos e positivos de cada método mencionado acima. Nós comparamos quatro métodos: o método comumente utilizado, método de transferência sem exposição ao ar, método da exposição periódica e *dither fish*. Nós avaliamos o efeito do uso de tais procedimentos sobre duas medidas comumente obtidas em estudos comportamentais: deslocamento total dentro aquário e tempo de associação à um objeto novo (estímulo). Nós utilizamos como modelo a espécie de peixe *Crenuchus spilurus* (Characiformes: Crenuchidae).

2. OBJETIVO GERAL

Determinar quais tratamentos são mais adequados para investigar determinadas respostas à estímulos durante os experimentos comportamentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Crenuchus spilurus*

Crenuchus spilurus é uma espécie peixe de pequeno porte (máximo de 6 cm de comprimento padrão) que apresenta baixa vagilidade, passando grande parte do dia estacionário e se alimentando de pequenas partículas na coluna d'água (PIRES, 2012). Essa espécie tem sido utilizada como modelo para estudos de especiação ecológica, reconhecimento intraespecífico, táticas reprodutivas alternativas, comportamento de exploração de hábitat e seleção sexual (PIRES, 2012; PIRES et al., 2016; BORGHEZAN, 2017; PIRES et al., 2018).

3.2. Coleta e manutenção dos peixes

Os indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram previamente capturados e mantidos em aquários estoques no Laboratório de Ecologia Comportamental e Evolutiva (LECE – INPA). Os indivíduos foram acondicionados nesses aquários, cuja qualidade da água foi mantida com uso de bomba submersa para aeração e circulação de água. Trocas parciais da água dos aquários foram realizadas semanalmente. Os aquários estoques foram montados de forma a simular o ambiente natural, contendo substrato de areia, plantas artificiais e diversos abrigos para os peixes. A temperatura foi mantida em 24°C com auxílio de dois condicionadores de ar, havendo iluminação natural diária de 12h claro:12h escuro. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração granulada comercial para peixes ornamentais.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), registrado sob o protocolo nº 044/2017.

3.3. Tratamentos experimentais

Os indivíduos foram submetidos a quatro tratamentos empregados em estudos comportamentais com peixes: 1) método comum; 2) não exposição ao ar; 3) exposição sucessiva; 4) *dither fish*. Os experimentos foram realizados utilizando indivíduos diferentes entre os tratamentos. Todos os tratamentos envolveram a captura e transferência dos peixes do aquário estoque para os

aquários experimentais, onde o comportamento dos indivíduos foi gravado durante 30 minutos utilizando câmeras acopladas acima dos aquários. Após cada filmagem, os indivíduos foram transferidos para um novo aquário-estoque previamente preparado.

Os aquários experimentais possuíam dimensão de 60x15x15 cm, sendo recobertos externamente com um tecido escuro. Esses aquários não tinham plantas e substrato de fundo, contendo apenas água e uma pedra de cor marrom no centro do aquário.

3.3.1. Método comum e exposição sucessiva

No tratamento “método comum”, 32 indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram capturados e transferidos do aquário estoque para os aquários experimentais com uso de rede, havendo rápida exposição ao ar durante poucos segundos (Figura 1).

No tratamento “exposição sucessiva”, 29 indivíduos foram submetidos ao procedimento de captura e transferência com rede durante cinco dias consecutivos. Esse tratamento foi o único em que houve repetição do procedimento nos dias seguintes.

No primeiro dia, os peixes foram capturados do aquário estoque com uso de rede (havendo exposição ao ar) e transferidos para aquários experimentais, onde foram individualizados e mantidos por 30 minutos (Figura 1). Em seguida, os indivíduos foram transferidos para um novo aquário estoque inabitado. Esse mesmo procedimento foi realizado durante mais quatro dias, porém o comportamento dos peixes foi filmado apenas no último dia de transferência para o aquário experimental.

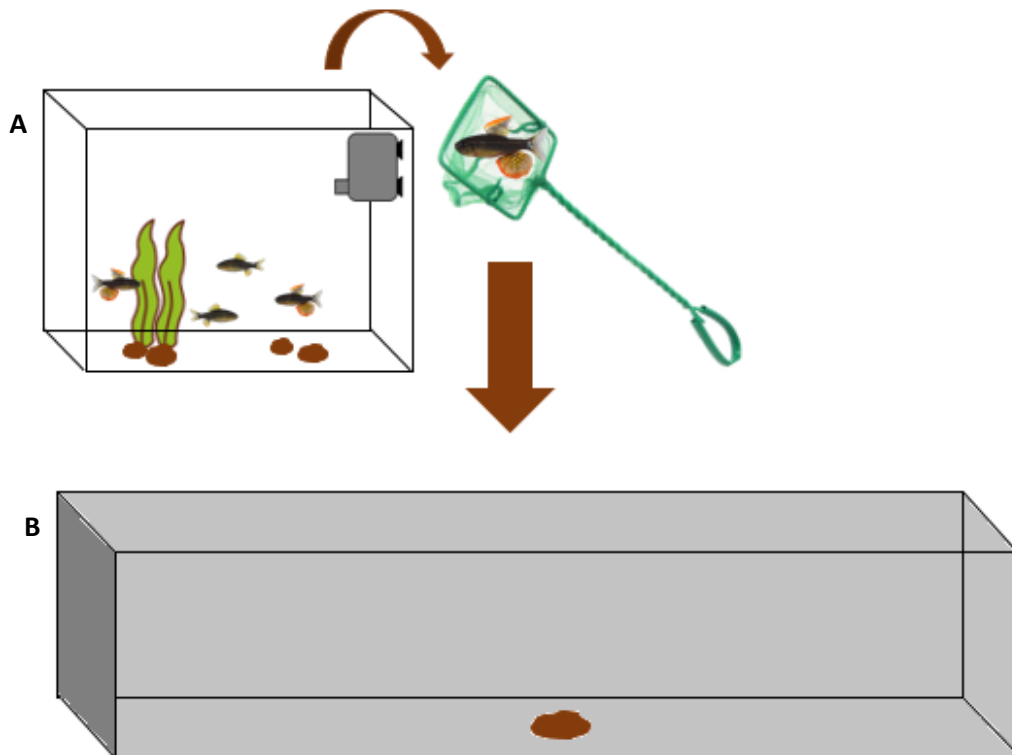


Figura 1. Representação dos tratamentos “método comum” e “exposição sucessiva”, onde os peixes foram capturados com rede e expostos ao ar. A) aquário estoque; B) aquário experimental.

3.3.2. Não exposição ao ar

No tratamento “não exposição ao ar”, 24 indivíduos foram capturados e transferidos do aquário estoque para os aquários experimentais com auxílio de um recipiente plástico escuro contendo água. Esse foi o único tratamento em que os peixes não foram expostos ao ar.

Os indivíduos foram capturados com a rede do aquário estoque, mas não foram retirados da água durante a transferência para o aquário experimental, sendo condicionados no recipiente durante alguns segundos. Feito isso, os indivíduos foram individualizados nos aquários experimentais, submergindo o recipiente na água do aquário (Figura 2).

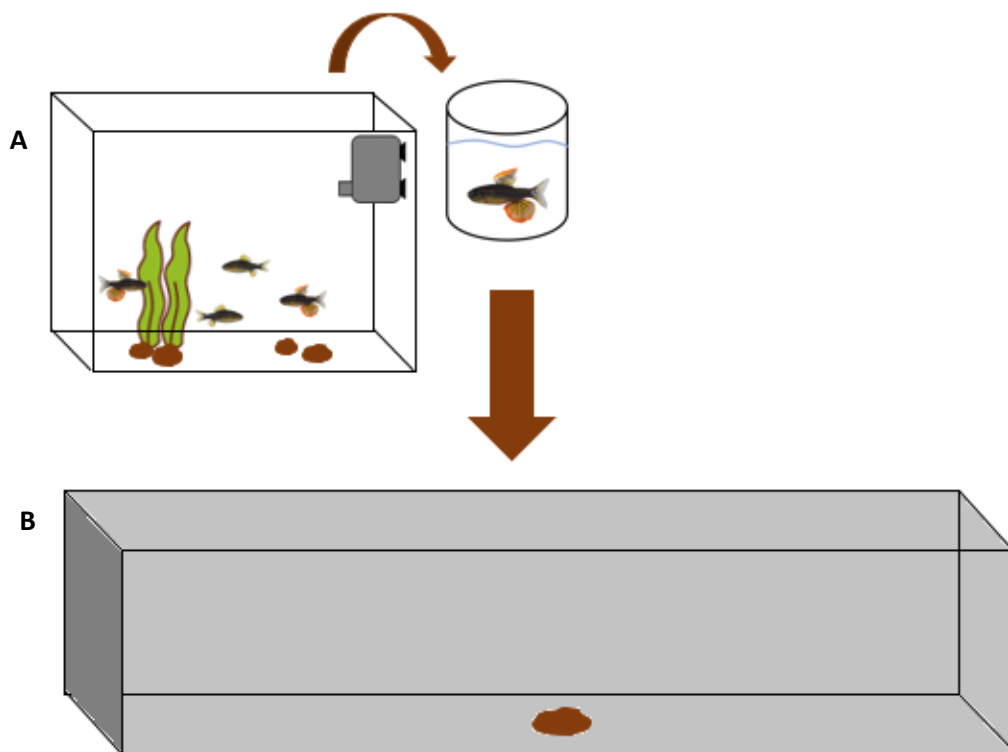


Figura 2. Representação do procedimento de transferência dos peixes no tratamento “não exposição ao ar”, no qual os peixes permaneceram submersos na água. A) aquário estoque; B) aquário experimental.

3.3.3. *Dither fish*

No tratamento “*dither fish*”, 27 indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram transferidos para o aquário experimental contendo dois *dither fish*. A espécie utilizada como *dither fish* foi o tetra cardinal (*Paracheirodon axelrodi*), pois é uma espécie de tamanho menor que *C. spilurus* e apresenta natação ativa, características que tornam esta espécie ideal para atuar como *dither fish*.

Dois tetras cardinais foram transferidos para cada aquário experimental dois dias antes do início do experimento para aclimação ao ambiente. Os indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram transferidos do aquário estoque para o aquário experimental com uso de rede (havendo exposição ao ar). Desta forma, cada aquário experimental continha um indivíduo de *C. spilurus* e dois tetras cardinais (Figura 3).

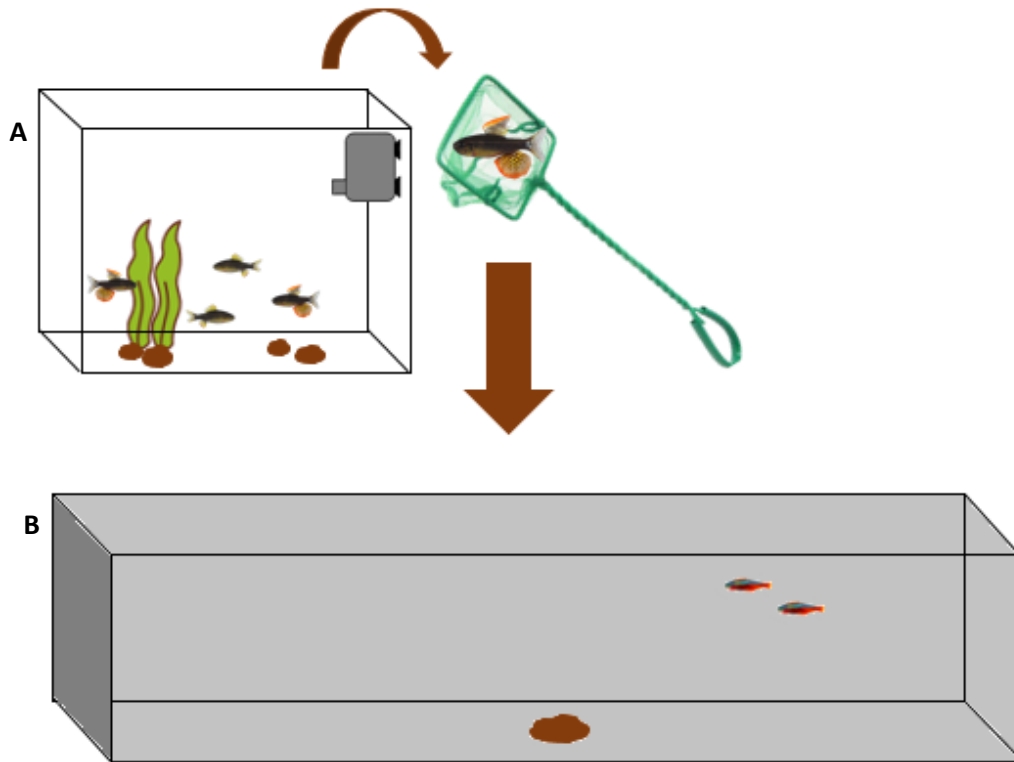


Figura 3. No tratamento “*dither fish*” os indivíduos de *Crenuchus spilurus* foram transferidos para aquários experimentais contendo dois cardinais tetras que atuaram como *dither fish*. A) aquário estoque; B) aquário experimental.

3.4. Análise de dados

Os vídeos gerados nos tratamentos “método comum”, “não exposição ao ar” e “exposição sucessiva” foram analisados no Swistrack, um *software* de rastreamento de partículas. Em seguida, as posições no plano cartesiano foram exportadas para ambiente computacional R, onde foram extraídas duas variáveis: 1) tempo relativo despendido na borda do aquário, definido como uma distância de até 3 cm das paredes do aquário; 2) deslocamento total dos peixes no aquário, calculado em pixels.

Os vídeos gerados no tratamento “*dither fish*” foram analisados no *software* Ethovision XT, pois possui ferramentas que possibilitam identificar e rastrear apenas uma partícula por aquário, não permitindo o rastreamento dos peixes que atuaram com *dither fish*. As variáveis respostas analisadas foram comparadas entre os tratamentos por meio de uma Análise de Variância (ANOVA).

4. RESULTADOS

4.1. Tempo próximo à borda do aquário

Houve diferença no tempo em que os indivíduos permaneceram junto às bordas do aquário entre os tratamentos (ANOVA, $F=6,108$; $p=0,0007$). As comparações sugerem que os indivíduos do tratamento “método comum” permaneceram menos tempo na região da borda do que os indivíduos do tratamento “não exposição ao ar”.

No tratamento “exposição sucessiva”, os indivíduos permaneceram bastante tempo próximo à borda, mas esse tratamento não foi diferente dos outros, exceto o tratamento “*dither fish*”.

O tratamento “*dither fish*” foi o único tratamento diferente de todos os outros. Os indivíduos submetidos à esse método permaneceram menos tempo junto às bordas do aquário. Desta forma, os indivíduos exploraram mais o aquário, isso deve-se à proporção de tempo nadando próximo às bordas e no centro do aquário (Tabela 1; Figura 4).

Tabela 1. Valores de p das comparações par-a-par do tempo de natação de *Crenuchus spilurus* próximo à borda.

	Não exposição ao ar	<i>Dither fish</i>	Exposição sucessiva	Método Comum
Não exposição ao ar	-	-	-	-
<i>Dither fish</i>	0,0001	-	-	-
Exposição sucessiva	0,448	0,0009	-	-
Método Comum	0,0395	0,0306	0,1813	-

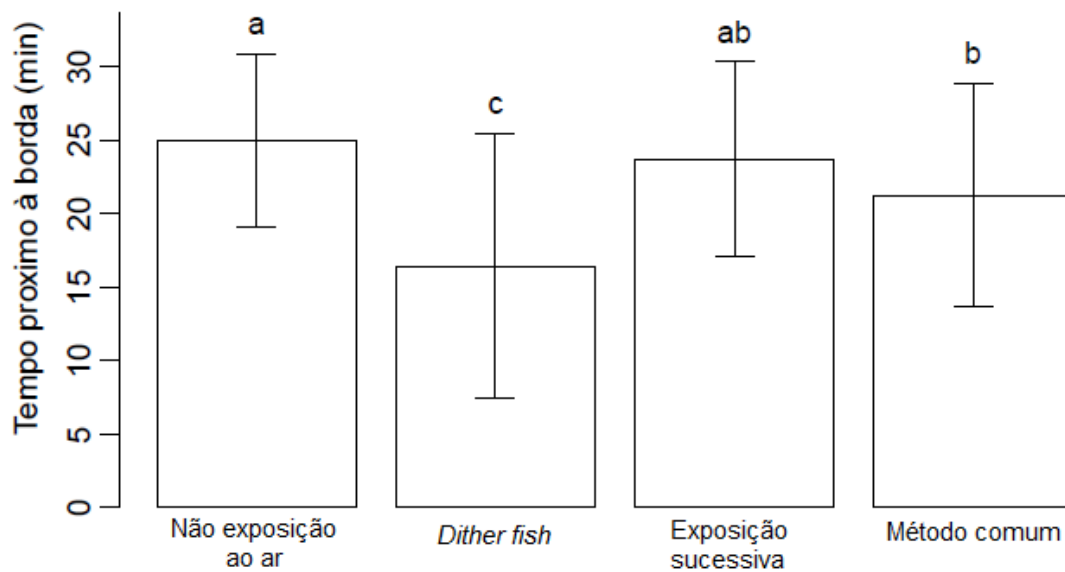


Figura 4. Representação do tempo de natação dos indivíduos de *Crenuchus spilurus* junto às bordas do aquário.

4.2. Deslocamento total

A deslocamento total foi calculado em pixels para cada indivíduo nos aquários experimentais em cada tratamento. As comparações sugerem que houve diferenç  entre os tratamentos (ANOVA, $F=3,6596$; $p=0,0147$). No tratamento "não exposição ao ar", os indivíduos se deslocaram menos do que nos outros tratamentos, não diferindo apenas de "*dither fish*".

Não houve diferenç  no deslocamento total entre os indivíduos submetidos aos tratamentos "método comum" e "exposição sucessiva". O deslocamento apresentado pelos indivíduos do tratamento "*dither fish*" não foi significativamente diferente dos outros tratamentos (Tabela 2; Figura 5).

Tabela 2. Valores de p das comparações par-a-par do deslocamento total de *Crenuchus spilurus* no aquário.

	Não exposição ao ar	<i>Dither fish</i>	Exposição sucessiva	Método Comum
Não exposição ao ar	-	-	-	-
<i>Dither fish</i>	0,1338	-	-	-
Exposição sucessiva	0,0016	0,4767	-	-
Método Comum	0,0391	0,8598	0,5202	-

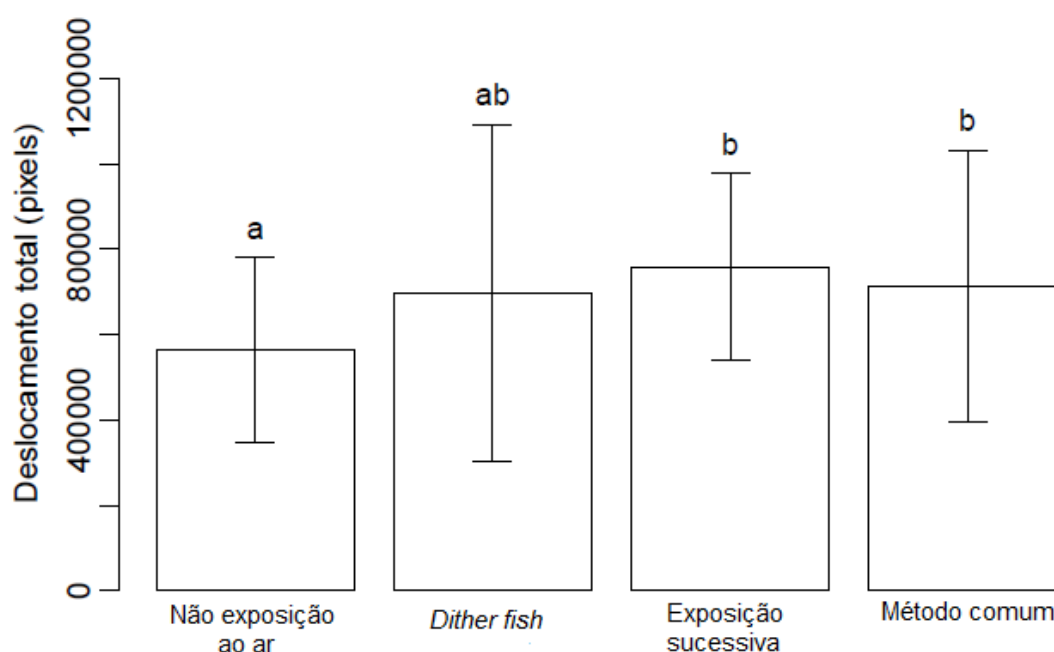


Figura 5. Representação do deslocamento total dos indivíduos de *Crenuchus spilurus* no aquário experimental.

Durante o período de execução dos experimentos, não houve mortes dos indivíduos de *Crenuchus spilurus* nos tratamentos “métodos comum”, “não exposição ao ar” e “*dither fish*”. Entretanto, houve mortes pós-experimento de três peixes submetidos ao tratamento “exposição sucessiva”.

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstra que o uso de diferentes formas de transferência de peixes e o uso de enriquecimento do ambiente experimental modifica as respostas comportamentais dos indivíduos testados. Portanto, pesquisadores podem considerar a utilização de diferentes métodos de acordo com as medidas comportamentais que serão analisadas.

Os peixes se deslocaram mais quando capturados com a rede do que com o recipiente que não os expôs ao ar. Os indivíduos capturados e transferidos com o recipiente permaneceram mais tempo próximo das bordas do aquário do que os indivíduos capturados com a rede. No tratamento “exposição sucessiva”, os indivíduos se deslocaram bastante, com um tempo de natação maior na região das bordas do aquário. Os indivíduos submetidos ao tratamento “*dither fish*” exploraram mais o aquário do que os indivíduos que foram submetidos aos demais tratamentos, porém o deslocamento dos indivíduos não diferiu dos outros tratamentos.

As diferenças entre deslocamento e tempo na borda dos indivíduos de *Crenuchus spilurus* nos tratamentos “método comum” e “não exposição ao ar” mostram com clareza que o método de transferência tem influência nas respostas dos indivíduos. Em um estudo semelhante, onde foi comparado os efeitos do método de transferência com rede e recipiente nos peixes, o comportamento neofóbico dos indivíduos de *Brachyrhaphis episcopi* foi afetado pelos métodos empregados na transferência dos peixes, sendo que os indivíduos se mostraram menos neofóbicos quando capturados com a rede (BRYDGES et al., 2009).

O método de captura com o recipiente pode não ser particularmente relevante quando é desejado investigar deslocamento e exploração, uma vez que os indivíduos apresentaram um comportamento menos ativo e menos exploratório. Com isso, o método “não exposição ao ar” pode ser aplicado em estudos em que é necessário que os indivíduos não se movam ativamente durante ou antes de uma manipulação, como com medidas de coloração em que o deslocamento dos peixes em direção à fonte de luz altera os valores de coloração obtidos.

Quantificações hormonais e hematológicas apontam que a exposição aérea pode ser prejudicial aos peixes, por ser mais estressante que métodos que não removem os peixes da água (SILVA et. al., 2012). É possível que o estresse dos indivíduos de *Crenuchus spilurus* tenha sido menor no tratamento “não exposição ao ar”, o que pode ter resultado na menor movimentação dos indivíduos. Porém, é provável que as respostas de estresse aos diferentes métodos seja diferentes entre as espécies, pois há espécies que são mais sensíveis à manipulação do que outras (BRYDGES et al., 2009; HARPER e WOLF, 2009).

Nós vimos poucos pontos positivos no tratamento “exposição sucessiva”, pois não diferiu muito de outros tratamentos e, por envolver a manipulação repetida dos peixes, ocasionou a mortalidade de indivíduos. Nossos resultados mostraram que os indivíduos de *Crenuchus spilurus*, quando expostos a esse tratamento, permaneceram bastante tempo nadando próximo às bordas, explorando menos a região central do aquário que possuía uma pedra como um objeto a ser explorado. Desta forma, esse método não foi particularmente efetivo em *C. spilurus* para avaliar o tempo de associação ao estímulo.

Os peixes submetidos ao tratamento “*dither fish*” exploraram mais o aquário experimental do que os peixes submetidos aos outros tratamentos. Apenas nesse tratamento houve uma proporção de tempo semelhante em que os indivíduos despenderam na região das bordas e região central do aquário. Isso indica que os indivíduos de *Crenuchus spilurus* se sentiram mais seguros ao explorar o aquário experimental por conta da presença dos tetras cardinais. O comportamento apresentado por *C. spilurus* durante o experimento sustenta o uso do método para reduzir a timidez dos indivíduos e estimular o comportamento natural durante os experimentos (e. g. LAMANNA e EASON, 2003; LAMANNA e EASON, 2007; PURSER e RADFORD, 2011; EVANS e GASPARINI, 2013; KELLEY, PHILLIPS e EVANS, 2013; VOELLMY et al., 2014).

Um aspecto negativo do uso de *dither fish* é a necessidade de algoritmos computacionais mais complexos no rastreamento dos peixes, uma vez que algoritmos simples podem falhar em identificar o peixe focal dos demais peixes no aquário.

Os resultados do presente estudo poderão auxiliar pesquisadores a definir os protocolos experimentais a serem utilizados em pesquisas comportamentais com peixes. Além disso, contribuir para a melhoria dos protocolos experimentais utilizados em estudos com a espécie *Crenuchus spilurus*, ou até mesmo espécies com características similares.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que os tratamentos experimentais influenciam nas respostas às variáveis comportamentais e a utilização de determinado tratamento depende das respostas a serem avaliadas pelo pesquisador. O tratamento “método comum” pode ser aplicado em estudos em que o pesquisador pretende avaliar o deslocamento no aquário. O tratamento “não exposição ao ar” pode ser indicado em estudos onde o protocolo requer que os indivíduos não se movimentem ativamente durante um procedimento. A manipulação periódica dos peixes não é indicada para avaliar tempo de associação à um estímulo e exploração. O método de enriquecimento ambiental “*dither fish*” se mostrou efetivo na redução da timidez e em estimular o comportamento exploratório dos peixes.

7. REFERÊNCIAS

- BARLOW, G. W. Dither - A way to reduce undesirable fright behavior in ethological studies. *Ethology*, v. 25, p. 315-318, 1968.
- BORGHEZAN, E. A. Fêmeas rejeitam parceiros sexuais heteroespecíficos em função da distância filogenética e desenvolvimento ontogenético no peixe *Crenuchus spilurus*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 42 p., 2017.
- BROWN, A.; COLGAN, P. W. Individual and species recognition in centrarchid fishes: evidence and hypotheses. *Behavioural Ecology and Sociobiology*, v. 19, p. 373-379, 1986.
- BRYDGES, N. M; BOULCOTT, P. ELLIS, T. BRAITHWAITE, V.A. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Animal Behaviour Science*, v. 116, p. 295–301, 2009.
- EVANS, J.P.; GASPARINI, C. The genetic basis of female multiple mating in a polyandrous livebearing fish. *Ecology and Evolution*, v. 3, p. 61-6, 2013.
- FERNANDES, Y. M.; RAMPERSAD, M.; LUCHIARI, A. C.; GERLAI, R. Associative learning in the multichamber tank: a new learning paradigm for zebrafish. *Behavioral Brain Research*, v. 312, p. 279-284, 2016.
- HARPER, C.; WOLF, J.C. Morphologic effects of the stress response in fish. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v. 50, p. 387-96, 2009.
- HOSHIBA, M.A.; GONÇALVES, F.D.; URBINATI, E.C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. *Acta Amazonica*, v. 39, p. 445-452, 2009.
- KELLEY, J.L.; PHILLIPS, S.C.; EVANS, J.P. Individual consistency in exploratory behaviour and mating tactics in male guppies. *Naturwissenschaften*, v. 100, p. 965-974, 2013.
- LAMANNA, J. R.; EASON, P. K. Effects of landmarks on territorial establishment. *Animal Behaviour*, v. 54, p. 471-178, 2003.

LAMANNA, P. R.; EASON, P. K. Effects of predator presence on territorial establishment. *Behaviour*, v. 144, p. 985-1001, 2007.

OLIVEIRA, J.; SILVEIRA, M.; CHACON, D.; LUCHIARI, A. The Zebrafish world of colors and shapes: Preference and Discrimination. *Zebrafish*, v. 00, pp. 1-8, 2015.

PIRES, T.H.S. O papel da seleção sexual na manutenção de linhagens evolutivas: evidências baseadas no comportamento e ecologia de *Crenuchus spilurus* Günther, 1863 (Characiformes: Crenuchidae). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, 205 pp, 2012.

PIRES, T. H.; FARAGO, T. B.; CAMPOS, D. F.; CARDOSO, G. M.; ZUANON, J. Traits of a lineage with extraordinary geographical range: ecology, behavior and life-history of the sailfin tetra *Crenuchus spilurus*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 99, p. 925-937, 2016.

PIRES, T. H.; BORGHEZAN, E. A.; MACHADO, V. N.; POWELL, D. L.; RÖPKE, C. P.; OLIVEIRA, C.; ZUANON, J; FARIAS, I. P. Testing Wallace's intuition: water type, reproductive isolation and divergence in an Amazonian fish. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 39(1), p. 882-892, 2018.

PINHEIRO-DA-SILVA, J; SILVA, P.F; NOGUEIRA, M.B., LUCHIARI, A.C. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*). *Animal Cognition*, v. 20, p. 159-169, 2016.

PURSER, K; RADFORD, A. N. Acoustic Noise Induces Attention Shifts and Reduces Foraging Performance in Three-Spined Sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *PLoS ONE*, v. 6(2), pp. 174-.78, 2011.

SILVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, J. J.; LUCHIARI, A. C. Dusky damselfish *Stegastes fuscus* relational learning: evidences from associative and spatial tasks. *Journal of Fish Biology*, 2015. doi:10.1111/jfb.12618.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES; B. D. A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, M. C. S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis*

niloticus L.) sob estresse por exposição ao ar. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, p. 99-107, 2012.

SILVEIRA, M.; SILVEIRA, J.; AGUES-BARBOSA, T.; CARVALHO, M.; SILVA, P.; LUCHIARI, A. Zebra Fitness: Learning and anxiety after physical exercise in zebrafish. *Recent Advances in Zebrafish Researches* (Ed. Mattila M.), 2018.

SUSKI, C. D.; COOKE, S. J.; DANYLCHUK, A. J.; O'CONNOR, C. M.; GRAVEL, M. A.; REDPATH, T.; HANSON, K.C.; GINGERICH, A. J.; MURCHIE, K. J.; DANYLCHUCK, S. E.; KOPPELMAN, J. B.; GOLDBERG, T. L. Physiological disturbance and recovery dynamics of bonefish (*Albula vulpes*), a tropical marine fish, in response to variable exercise and exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 148, p. 664–673, 2007.

SLOMAN, K. A.; BALDWIN, L.; MCMAHON, S.; SNELLGROVE, D. The effects of mixed-species assemblage on the behaviour and welfare of fish held in home aquária. *Animal Behaviour*, v. 155, p. 160-168, 2011.

VOELLMY, I. K; PURSER, J; FLYNN, D; KENNEDY, P; SIMPSON, S. D; RADFORD, A. N. Acoustic noise reduces foraging success in two sympatric fish species via different mechanisms. *Animal Behaviour*, v. 89, p. 191-198, 2014.

VAN DER SLUIJS, I; VAN-ALPHEN, J.J.M; SEEHAUSEN, O. Preference polymorphism for coloration but no speciation in a population of Lake Victoria cichlids. *Behavioral Ecology*, v. 19, p. 177-183, 2008.

WILLIAMS, T.D; READMAN, G.D; OWEN, S.F. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Laboratory animals*, v. 43, p. 107-120. 2009.

YANONG, R.P.E. Reproductive management of freshwater ornamental fish. *Seininars in avian and exotic pet medicine*, v. 5, p. 222-235, 1996.