

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Zootecnia

Camila Oliveira Paranhos

**CONSEQUÊNCIAS DO “COPING STYLE” NO DESEMPENHO
ZOTÉCNICO E APRENDIZADO DO *COLOSSOMA MACROPOMUM***

Belo Horizonte

2023

Camila Oliveira Paranhos

**CONSEQUÊNCIAS DO “COPING STYLE” NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E
APRENDIZADO DO *COLOSSOMA MACROPOMUM***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção animal/Aquacultura

Orientador: Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz

Belo Horizonte
2023

P223c Paranhos, Camila Oliveira, 1990-
Consequências do "coping style" no desempenho zootécnico e aprendizado do colossoma
Macropomum / Camila Oliveira Paranhos. – 2023.
86 f.il

Orientador: Ronald Kennedy Luz
Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.
Área de Concentração: Produção animal/Aquacultura
Bibliografias: f. 24 a 30

1. Tambaqui - Teses - 2. Fisiologia - Teses - 3. Zootecnia - Teses - I. Luz, Ronald Kennedy
II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569 Biblioteca da Escola de
Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINASGERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Consequências do “Coping Style” do desempenho zootécnico e aprendizado do
*Colossoma macropomum***

Camila Oliveira Paranhos

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e sete de fevereiro de dois mil e vinte três**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

Glauber David Almeida Palheta

Universidade Federal do Pará (UFPA)

Documento assinado digitalmente
gov.br GLAUBER DAVID ALMEIDA PALHETA
Data: 09/03/2023 06:28:52-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Lucas Pedro Gonçalves Junior

Universidade Newton Lins

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCAS PEDRO GONCALVES JUNIOR
Data: 08/03/2023 19:38:51-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Galileu Crovatto Veras

Universidade Federal de Minas Gerais

Documento assinado digitalmente
gov.br GALILEU CROVATTO VERAS
Data: 07/03/2023 08:43:38-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Rodrigo Takata

Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro

Documento assinado digitalmente
gov.br RODRIGO TAKATA
Data: 10/03/2023 09:44:58-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ronald Kennedy Luz - Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais

Documento assinado digitalmente
gov.br RONALD KENNEDY LUZ
Data: 10/03/2023 15:10:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Belo Horizonte, 27/02/2023

Dedicatória

Dedico á minha mãe Luiza por todo incentivo aos meus estudos.

Ao meu pai Paulo pela parceria e amizade sempre.

Á minha avó Vilma por todo amor e carinho dedicado.

Á minha irma Paula, minha metade.

Agradecimentos

Á Deus por me dar paciência, foco e sabedoria.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de Estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz por todo apoio, incentivo e por ser uma inspiração a todos seus alunos.

Áos professores da Escola de Veterinária por todos ensinamentos passados durante toda a minha trajetória.

Aos meus companheiros do Laqua e Laboratório de Larvicultura e Alevinagem, pela amizade, bons momentos e parceria. Em especial Isabela, Nathália e Carol por todo suporte nos experimentos realizados.

Aos meus pais Luiza e Paulo, minha irmã Paula e avó minha Vilma que sempre acreditaram em mim e me deram forças para continuar.

Ao meu Vi, meu melhor amigo e meu refúgio.

Por fim, àqueles que de alguma forma participaram na realização deste estudo.

Muito obrigada!

RESUMO

O objetivo desta tese foi avaliar se diferenças na habilidade de aprendizagem, desempenho zootécnico e respostas fisiológicas podem ser explicadas por diferenças no estilo de enfrentamento ao estresse do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Para o artigo 1, juvenis de tambaqui foram classificados em proativos e reativos até a obtenção de 84 de cada. Na Fase 1 do experimento, os juvenis, pesando $2,16 \pm 0,52$ g, foram estocados em 12 tanques de 28 L cada, com 14 animais/tanque. Foram testados os seguintes tratamentos: proativo (PT), reativo (RT) e misto (MT) composto por animais reativos (MRT) e proativos (MPT). Na Fase 2, os animais foram transferidos para tanques de 175 L. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em ambas as fases. Biometrias foram realizadas após o final da Fase 1 e da Fase 2 e coleta de sangue ao final da fase 2. Após a Fase 1, os animais MPT apresentaram maior crescimento do que os animais MRT ($p < 0,05$). O ganho de peso e o ganho de peso diário também foram maiores nos animais MPT em comparação aos animais PT ($p < 0,05$). Após a Fase 2, os animais PT apresentaram maior ganho de peso e ganho de peso diário em comparação aos animais RT e MT ($p < 0,05$), assim como os animais MPT em comparação aos animais PT. O desempenho do TR foi superior ($p < 0,05$) ao do MRT. Glicose ($p < 0,04$) e colesterol ($p < 0,01$) foram maiores para RT em comparação com PT. O colesterol dos animais MPT foi maior do que o dos animais MRT ($p < 0,01$), enquanto a proteína plasmática foi menor ($p < 0,001$). Glicose ($p < 0,001$) e colesterol ($p < 0,01$) foram maiores para MPT em comparação com PT. Glicose ($p < 0,02$) e colesterol ($p < 0,01$) também foram maiores para MRT em comparação com RT. Para o artigo 2, foram utilizados 24 animais, sendo 12 animais proativos ($7,78 \pm 2,39$ cm; $7,72 \pm 2,34$ g) e 12 animais reativos ($7,68 \pm 0,51$ cm; $6,98 \pm 1,32$ g). Para o teste de aprendizagem, que durou 15 dias, os animais foram colocados individualmente em um labirinto em forma de T, na qual uma peça de Lego® era colocada dentro de um dos braços do labirinto representando um marcador visual juntamente com pellets de ração. Os animais proativos e reativos não conseguiram associar a peça de Lego® ao alimento sugerindo que o estilo de enfrentamento ao estresse não foi capaz de influenciar a aprendizagem associativa desta espécie. Nos dois primeiros dias os animais reativos levaram um tempo maior para sair da zona de aclimação (tempo de latência) em comparação aos animais proativos ($P = 0,0307$). Pode se concluir que o cultivo de juvenis de *C. macropomum* com diferentes estilos de enfrentamento ao estresse em um mesmo ambiente na RAS provocou diminuição no desempenho dos animais reativos porém não houve nenhuma evidência que diferencie a habilidade de aprendizagem de diferentes estratégias de

enfrentamento ao estresse do tambaqui *C. macropomum*.

Palavras-chave: “Coping style”, aprendizagem associativa, tambaqui.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate whether differences in learning ability, zootechnical performance and physiological responses can be explained by differences in tambaqui (*Colossoma macropomum*) coping style with stress. For article 1, tambaqui juveniles were classified into proactive and reactive until 84 of each were obtained. In Phase 1 of the experiment, the juveniles, weighing 2.16 ± 0.52 g, were stocked in 12 tanks of 28 L each, with 14 animals/tank. The following treatments were tested: proactive (PT), reactive (RT) and mixed (MT) composed of reactive (MRT) and proactive (MPT) animals. In Phase 2, the animals were transferred to 175 L tanks. The animals were fed twice a day with commercial diet in both phases. Biometrics were performed after the end of Phase 1 and at the end of Phase 2, and blood sampling at the end of Phase 2. After Phase 1, MPT animals showed higher growth than MRT animals ($p < 0.05$). Weight gain and daily weight gain were also higher for MPT animals compared to PT animals ($p < 0.05$). After Phase 2, PT animals showed higher weight gain and daily weight gain compared to RT and MT animals ($p < 0.05$), as also did MPT animals compared to PT animals. Performance for RT was superior ($p < 0.05$) to that of MRT. Glucose ($p < 0.04$) and cholesterol ($p < 0.01$) were higher for RT compared to PT. Cholesterol for MPT animals was higher than for MRT animals ($p < 0.01$), while plasma protein was lower ($p < 0.001$). Glucose ($p < 0.001$) and cholesterol ($p < 0.01$) were higher for MPT compared to PT. Glucose ($p < 0.02$) and cholesterol ($p < 0.01$) were also higher for MRT compared to RT. For article 2, 24 animals were used, 12 proactive animals (7.78 ± 2.39 cm; 7.72 ± 2.34 g) and 12 reactive animals (7.68 ± 0.51 cm; 6.98 ± 1.32 g). For the learning test, which lasted 15 days, the animals were placed individually in a T-shaped maze, in which a Lego® piece was placed inside one of the arms of the maze representing a visual marker along with food pellets, the arm being defined by means of a daily draw. Proactive and reactive animals were unable to associate the Lego® piece with the food, suggesting that the stress coping style was not able to influence the associative learning of this species. In the first two days, reactive animals took a longer time to leave the acclimatization zone (latency time) compared to proactive animals ($P = 0.0307$). It can be concluded that the cultivation of juveniles of *C. macropomum* with different styles of coping with stress in the same environment in the RAS caused a decrease in the performance of reactive animals, however, there was no evidence to differentiate the learning ability of different stress coping strategies of tambaqui *C. macropomum*.

Keywords: “Coping style”, learning associative, tambaqui

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Fig. 1. Schematic drawing of the test tank for personality classification.....39

Artigo 2

Figura 1. Desenho esquemático do tanque-teste para a classificação dos animais em proativos e reativos.....68

Figura 2. Desenho esquemático da canaleta utilizada para classificação dos animais em proativos e reativos, adaptado de Pasquet et al. (2016).....70

Figura 3. Desenho esquemático do labirinto em T.....71

Figura 4. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* gastaram para sair da zona de aclimatação (Latência) no teste de aprendizado do labirinto em T.....74

Figura 5. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* gastaram para realizar sua primeira escolha entre o marcador visual (Lego®) e o ambiente vazio no teste de aprendizado do labirinto em T.....75

Figura 6. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* gastaram para se alimentarem no teste de aprendizado do labirinto em T.....76

Figura 7. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* ficaram ociosos no teste de aprendizado do labirinto em T.....76

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1. Growth response of <i>Colossoma macropomum</i> juveniles classified by stress coping style (1 to 50 days of experiment in Phase 1).....	43
Table 2. Growth of <i>Colossoma macropomum</i> juveniles classified by stress coping style within mixed treatment (MT) (1 to 50 days of experiment in Phase 1).	44
Table 3. Growth response of <i>Colossoma macropomum</i> juveniles classified by stress coping style (51 to 90 days of experiment in Phase 2).....	45
Table 4. Crescimento of <i>Colossoma macropomun</i> juveniles classified by stress coping style within mixed treatment (MT) (51 to 91 days of experiment in Phase 2).	46
Table 5. Survival (%) of <i>Colossoma macropomum</i> classified by stress coping style after “90days of entire experiment (Phase 1 and Phase 2)”.....	47
Table 6. Hematological and biochemical parameters of <i>Colossoma macropomum</i> classified by stress coping style after 90 days of experiment.	48

Artigo 2

Tabela 1. Etograma para a observação de <i>Colossoma macropomun</i> (n=12 por estilo de enfrentamento ao estresse), adaptado de Bonifacio et al., (2022).....	72
Tabela 2. Quantidade de animais que associaram o marco visual e ao alimento.....	74

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μl	Micro litro
ANOVA	Análise de variância
CA	Conversão Alimentar
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Cm	Centímetro
CR DP	Consumo total de ração
FAO	Desvio padrão Food and Agriculture Organization of the United Nations
G	Grama
g dL^{-1}	Grama por decilitro
g kg^{-1}	Grama por quilo
GCH	Ganho de Comprimento Horizontal
GCV	Ganho de Comprimento Vertical
GP	Ganho de Peso
GPD	Ganho de Peso Diário
H	Hora
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPI	Hipotálamo-hipófise interrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg	Quilo
L	Litro
Min	Minuto
mg dL^{-1}	Miligrama
mg L^{-1}	Miligrama por decilitro
MPT	Mixed proactive treatment
MRT	Mixed reactive treatment
MT	Mixed Treatment
P	P-valor
PB	Proteína Bruta Proactive
PT	Treatment
Rpm	Rotações por minuto
RAS	Sistema de recirculação de água
RT	Reactive treatment

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>O tambaqui (Colossoma macropomum)</i>	17
2.2 <i>O “coping style”</i>	18
2.3 <i>Diferenças comportamentais e fisiológicas entre indivíduos proativos e reativos</i>	19
2.4 <i>Consequências do “coping style” no desempenho de peixes</i>	20
2.5 <i>Habilidade de aprendizagem</i>	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. <i>Objetivo geral</i>	24
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	24
REFERÊNCIAS	25

Artigo 1

Introduction	36
Materials and Methods	38
<i>Experimental design and managerial</i>	38
<i>Classification of Colossoma macropomum by stress coping style</i>	38
<i>Phase 1: Initial (day 1 to day 50) performance of Colossoma macropomum juveniles classified by stress coping style</i>	39
<i>Phase 2: Performance from day 51 to day 90 of Colossoma macropomum juveniles classified by stress coping style</i>	41
<i>Biometric index</i>	41
<i>Blood sampling</i>	42
<i>Data analysis</i>	42
Results	43
<i>Phase 1: Performance from day 1 to day 50 of Colossoma macropomum juveniles classified by stress coping style</i>	43
<i>Phase 2: Performance from day 51 to day 90 of Colossoma macropomum juveniles classified by stress coping style</i>	44
<i>Blood tests</i>	47
Discussion	48
Conclusions	53
References	55

Artigo 2

1. Introdução.....	65
2. Material e métodos	66
2.1 <i>Classificação em animais proativos e reativos.....</i>	67
2.2 <i>Método de novo ambiente</i>	67
2.3 <i>Método de latência ao se aproximar de um novo objeto</i>	69
2.4 <i>Sessão de reconhecimento em labirinto em T.....</i>	70
2.5 <i>Aprendizado em labirinto em T de indivíduos proativos e reativos (primeira escolha).....</i>	71
2.6 <i>Qualidade de água</i>	72
2.7 <i>Estatística.....</i>	73
3. Resultados	73
3.1 <i>Habilidade de aprendizagem de animais proativos e reativos</i>	73
4. Discussão	77
5. Conclusões.....	80
Referências	80
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 85

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estudos na área do comportamento têm crescido e apresentado resultados importantes para produção animal. Muitos deles vêm sendo avaliados no intuito de estabelecer diferenças comportamentais consistentes em cada indivíduo (Koolhaas et al., 1999; Killen et al., 2016). Notavelmente, os indivíduos percebem e reagem de maneira diferente ao seu ambiente, e isso afeta sua robustez a desafios como situações estressantes. Essas diferentes reações comportamentais são descritas por diversos termos, dentre eles personalidade, grau de ousadia, “coping style”, entre outros.

Esses são termos utilizados para descrever a variação individual, consistente ao longo do tempo, no comportamento e fisiologia entre indivíduos em um grupo, independentemente da causa dessa variabilidade (Castanheira et al., 2017; Planas-Sitjà et al., 2021). Dentre essas variações, podem-se destacar dois padrões de resposta tanto comportamental quanto neuroendócrina: proativo e o reativo.

Particularmente, algumas condições que são bem toleradas por alguns indivíduos podem ser prejudiciais para outros. Peixes proativos apresentam luta e fuga como estratégia comportamental, são animais agressivos, exploram o ambiente de forma rápida e superficial, sendo caracterizados por alto consumo de energia (Mesquita et al., 2016), apresentam maior taxa de crescimento (Basic et al., 2012) e tendem a ganhar peso corporal mais rápido que os seus co-específicos reativos (Mittelbach et al., 2014). Além disso, são mais resistentes a doenças (Kittilsen et al., 2012) e, geralmente, apresentam maior sucesso reprodutivo (Yang et al., 2022).

Fisiologicamente, indivíduos proativos são caracterizados por menor reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (ou seja, menor cortisol pós-estresse), bem como menor atividade serotoninérgica cerebral e maior atividade dopaminérgica, enquanto indivíduos reativos exibem o perfil comportamental e fisiológico oposto (Koolhaas et al., 2010).

A aprendizagem associativa é o processo pelo qual um organismo estabelece uma associação experimentando em conjunto dois estímulos sensoriais, de maneira que a experiência seguinte de um ajude a lembrar o outro (Dickinson, 2012). Assim como os mamíferos, existem evidências de que os peixes teleósteos também possuem as propriedades e a base neural do aprendizado e da memória (Salas et al., 2006; Hong e Zha, 2019). Sendo assim, esses animais aprendem durante toda vida, além de desenvolver métodos de

aprendizagem complexas (Kieffer e Colgan, 1992). Atualmente, são descritos vários mecanismos de aprendizagem pelos quais os animais conseguem usar a experiência passada para modificar o comportamento.

Para avaliar a capacidade de aprendizagem de um animal, o labirinto em T pode ser usado em uma variedade de maneiras (Gould, 2011) podendo assumir outras formas, como labirinto em Y (Adeyemi et al., 2010) e em formato de cruz (Gaikwad et al., 2011).

A capacidade cognitiva e o aprendizado em peixes demonstra ser uma importante ferramenta para compreensão das estratégias alimentares, sobrevivência e comunicação entre os animais refletindo no bem estar e desempenho produtivo dos mesmos. No entanto, são necessários mais estudos que associem os processos cognitivos ao estilo de enfrentamento ao estresse.

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie nativa da bacia do rio Amazonas. É considerada a segunda espécie mais produzida comercialmente no Brasil (PeixeBR, 2022), devido a suas excelentes características para uso na aquicultura: é onívora, bem adaptada às condições de cativeiro, aceita facilmente dietas artificiais e apresenta boas taxas de crescimento e conversão alimentar (Tavares- Dias, 2011; Ribeiro et al., 2016), sendo das nativas a que tem apresentado melhor desempenho (Santos et al., 2021). No entanto, até o momento não há informações relacionadas a influência do estilo de enfrentamento ao estresse sobre a fisiologia, desempenho zootécnico e habilidade de aprendizagem do *Colosso macropomum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é um peixe neotropical de ordem Characiformes, pertencente à família Characidae, e nativo da bacia do rio Amazonas (Guimarães e Martins, 2015). Atualmente é considerado o segundo maior peixe de escamas da América do sul.

É a espécie nativa de maior interesse no Brasil representando pelo menos 20% da produção de peixes no país (Pedroza Filho et al., 2020), tendo alcançado em 2021 uma produção de 262.370 mil toneladas (PEIXEBR, 2022). É também a principal espécie cultivada no norte e nordeste e a segunda mais cultivada em todo o território nacional, ficando atrás somente da tilápia (IBGE, 2020).

O sucesso da produção do tambaqui se deve principalmente à sua rusticidade, alto valor comercial, alto grau de aceitação pelos consumidores, rápido crescimento, comportamento alimentar onívoro e adaptação ao cultivo (Morais e O'Sullivan, 2017), sendo das espécies nativas, a que tem apresentado melhor desempenho podendo atingir mais de 25 kg. Se trata de uma espécie que possui grandes reservas de gordura corporal, podendo ser usada como fonte de energia durante os períodos de escassez de alimentos (Golding e Carvalho, 1982).

A produção da espécie é limitada a regiões mais quentes, onde é cultivada principalmente em viveiros (Anuário da Piscicultura, 2019). O cultivo em sistemas de recirculação de água (RAS) pode ser uma alternativa a essa limitação, podendo ampliar as áreas de produção da espécie e aproximá-la de outros mercados consumidores (De Souza e Silva et al., 2021; Santos et al., 2021). Esses sistemas permitem que a temperatura da água e outras variáveis de qualidade da água sejam controladas para atender a demanda da espécie (Assis et al., 2020).

Além do Brasil, o tambaqui também é aceito para consumo em outros países da América do Sul, como Colômbia, Peru e Venezuela (Woynárovich e Anrooy, 2019).

Porém durante o seu cultivo, é comum a heterogeneidade de tamanhos nos animais, fato que ainda não pode ser explicado (Santos et al., 2021).

Atualmente, se desconhece trabalhos que abordam a influência do estilo de enfileiramento ao estresse no tambaqui.

2.2 O “coping style”

Em animais, diferenças individuais na resposta a desafios são associadas com diferenças no comportamento (Killen et al., 2016). Quando confrontados com mudanças ambientais, indivíduos da mesma espécie mostraram diferentes respostas consistentes diante de situações inusitadas (Overli et al., 2007).

O “coping style” trata do estilo de enfrentamento que um indivíduo expõe diante de uma situação de perigo ou estresse, sendo essa resposta consistente ao longo do tempo (Koolhaas et al., 1999), ou seja, ela tende a se repetir em situações semelhantes.

Os peixes vêm sendo utilizados como referência em estudos de traços de personalidade, uma vez que são relativamente fáceis de criar e manter em laboratório, além de poderem ser coletados de diferentes habitats (Budaev e Brown, 2011). Diante disso nos últimos anos o número de estudos sobre o “coping style” em peixes têm crescido rapidamente, muitos deles abordando animais de interesse comercial, como carpa comum (*Cyprinus carpio*) (Huntingford et al., 2010); truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Gesto, 2019; Gesto et al., 2020); tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Mesquita et al., 2016; Figueiredo et al., 2021); Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Kittilsen et al., 2012) e linguado (*Paralichthys olivaceus*) (Yang et al., 2022).

Para classificação dos animais em proativos e reativos foram desenvolvidos testes capazes de separar indivíduos por personalidade como: interesse em formação de cardume (Wilson et al., 2009), ingestão de um novo alimento, exploração a um novo ambiente, latência ao se aproximar de um novo objeto (Colchen et al., 2017), emergir de um abrigo (Moscicki et al., 2015), teste de novo ambiente (Mesquita et al., 2016; Torres et al., 2017) entre outros. É importante ressaltar que esse método deve ser inédito para os animais, ou seja, não se deve repetir o mesmo teste com o mesmo animal. Caso seja necessário refazer o teste, aconselha-se utilizar outro método (Castanheira et al., 2017).

A individualidade dos animais de mesma espécie pode impactar no desempenho e bem-estar nas instalações de aquicultura, uma vez que o desconforto dos peixes frente a um estressor e logo suas consequências, podem ser diferentes dependendo do indivíduo (Richter e Hintze, 2019). No entanto, de acordo com Vindas et al. (2017) os traços comportamentais não são tão fixos como propostos, mas altamente dinâmicos e os animais podem exibir uma série de respostas plásticas aos estímulos. Estudos sugerem que os indivíduos proativos podem ser mais flexíveis às condições de mudança, em posição aos indivíduos reativos (Basic et al., 2012). Ainda assim, poucos estudos abordam o quanto plásticos são os estilos de enfrentamento

proativos e reativos.

Portanto, na aquicultura, estudos têm proposto vantagens em classificar indivíduos por estilos de enfrentamento, visto que existe a possibilidade de cultivar animais que possuem características mais favoráveis à produção. Sendo assim, o conceito e aplicação do “coping style” vem se tornando cada vez mais útil dentro da produção animal, visando tanto a otimização da produção quanto o bem estar animal.

2.3 Diferenças comportamentais e fisiológicas entre indivíduos proativos e reativos

Os termos reativo e proativo são extremos de um continuum “Boldness” de um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas que diz respeito ao nível de ousadia de um indivíduo ao enfrentar uma condição que lhe oferece risco (Alderman, 2016; Gesto, 2019).

Indivíduos proativos têm sido caracterizados por apresentarem uma resposta comportamental de fuga e são mais propensos a se dispersarem (Coates et al., 2019). Tendem, portanto a explorar ambientes desconhecidos e assumir riscos (Castanheira et al., 2013; Colchen et al., 2017). São animais que normalmente se comportam ativamente e lutam contra os predadores ou fogem deles (Alderman, 2016). Além disso, animais proativos também tendem a ter melhor aptidão em relação aos indivíduos reativos (Smith e Blumstein, 2010). Em contrapartida, os animais reativos possuem menor atividade natatória e tendem a conservar energia (Mesquita et al., 2015), evitam riscos e geralmente permanecem imóveis quando submetidos a novos ambientes (Castanheira et al., 2013).

Carbonara et al. (2019), ao trabalharem com *Sparus aurata*, observaram que indivíduos proativos exibiram níveis mais elevados de atividade em relação a indivíduos reativos quando criados em alta densidade, efeito esse que pode ser associado a uma maior competição por espaço, exigindo assim uma maior atividade desses indivíduos para que possam manter uma posição dominante. Embora a resposta fisiológica ao estresse de peixes de diferentes estilos de enfrentamento tenha sido exaustivamente estudada, não há muitos dados disponíveis sobre as respostas comportamentais ao estresse de peixes de diferentes personalidades (Gesto et al., 2020). Portanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento de como os estilos de enfrentamento ao estresse se relacionam com as respostas fisiológicas dos animais.

No que diz respeito ao bem estar e a fisiologia de cada estilo de enfrentamento ao

estresse, avaliações hematológicas e bioquímicas podem ser importantes ferramentas para explicar diferenças comportamentais entre animais proativos e reativos (Pickering, 1981; Wendelaar Bonga, 1997; Andersson et al., 2011). Entre as variáveis bioquímicas o cortisol (Wendelaar Bonga, 1997) e a glicose (Silva et al., 2009) estão relacionados à maneira como o animal lida com o estresse (Andersson et al., 2011), sendo os animais reativos aqueles que apresentam maior nível de cortisol basal (Andersson et al., 2011). Alguns estudos sugerem que o estilo de enfrentamento proativo pode estar associado a uma ativação mais baixa do eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise inter-renal (HPI), responsável pela liberação de cortisol, sob estresse agudo do que peixes reativos (Castanheira et al., 2017; Wong et al., 2019). Esses indivíduos apresentam a resposta dominada pelo sistema nervoso simpático, portanto apresentam maior quantidade de catecolaminas no sangue e menor quantidade de cortisol circulante (Andersson et al., 2011).

Contudo, se há alguma situação estressora, seja ela ambiental ou social, o nível de estresse tende a ser maior nos animais reativos devido ao modo como essa personalidade lida fisiologicamente com situações estressantes (Andersson et al., 2011), consequentemente podendo resultar em prejuízos no desempenho zootécnico (Basic et al., 2012).

2.4 Consequências do “coping style” no desempenho de peixes

O estado de estresse se dá quando a homeostase ou equilíbrio dinâmico do organismo é ameaçada diante de alguma ação estressora, que por sua vez também provoca um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa habilitando o animal para superar as ameaças (Wendelaar-Bonga, 1997).

Como consequência ao estresse social, os níveis de cortisol plasmático tendem a aumentar, elevando a glicose e aminoácidos no sangue dos peixes fazendo com que o centro da fome não seja ativado (Andersen et al., 1991).

Diante disso, alguns trabalhos vêm abordando o desempenho de crescimento de peixes e como este é afetado pela personalidade dos animais. Martins et al. (2005) ao estudar o crescimento e como estas se relacionam com as diferenças individuais no consumo de ração, comportamento alimentar e eficiência alimentar do bagre africano (*Clarias gariepinus*) observaram que os indivíduos proativos foram aqueles que reagiam primeiro à presença da ração e consumiam o seu trato mais rapidamente após a transferência para o um novo ambiente. Esses indivíduos também foram aqueles que exibiram menor resposta do cortisol

após o estresse agudo. Todas essas características (melhor eficiência alimentar e menor capacidade de resposta ao estresse) são claramente benéficas em condições de aquicultura. Torres et al. (2017) ao cultivar larvas de *L. alexandri* observaram menor ganho de peso médio e maior taxa de canibalismo para o tratamento misto, quando comparado aos tratamentos separados por estilos de enfrentamento ao estresse. Porém, resultados contrários foram encontrados por Behrens et al. (2020) ao trabalhar *Neogobius melanostomus* em que observaram menor crescimento de indivíduos proativos em relação ao seus coespecíficos reativos de mesma idade. Os autores atribuíram esse menor crescimento a uma maior taxa metabólica, padrão encontrado em indivíduos proativos apresentando, portanto, taxa de crescimento reduzido. Desta forma, estudos em diferentes espécies são necessários para o melhor entendimento da classificação por estilo de enfrentamento e sua aplicação no setor produtivo.

Torres (2021) ao avaliar o desempenho de crescimento de juvenis machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) classificados por personalidade observou que a presença de animais proativos no tratamento criado misto pode ter inibido o crescimento de animais reativos uma vez que esses animais ganharam menor peso em relação aos de personalidade oposta. O fato de animais reativos apresentarem menor peso em relação aos seus coespecíficos quando criados em conjunto já é conhecido e descrito para outras espécies como *N. pulcher* (Heg et al., 2011) e *O. mykiss* (Basic et al., 2012). Torres (2021) também observou que apesar do desempenho de indivíduos separados por estilo de enfrentamento ao estresse terem sido semelhantes, a conversão alimentar dos animais do grupo reativo foi menor, demonstrando melhor aproveitamento do alimento, uma vez que foi necessário menor fornecimento de alimento para garantir o mesmo ganho de peso.

Estudos recentes vêm abordando também o desempenho da prole de pais classificados por estilo de enfrentamento ao estresse. Yang et al. (2022) observaram que a prole do linguado (*Paralichthys olivaceus*) proativo cresce mais rápido e tem uma adaptabilidade ambiental mais forte indicando assim um melhor desempenho e maior resistência ao estresse não só de indivíduos proativos como também de sua descendência.

Como podemos observar, a triagem em massa dos animais de diferentes estratégias de enfrentamento ao estresse pode ajudar a otimizar os sistemas de produção, visto que, condições ideais para animais proativos, provavelmente, são diferentes daquelas para animais reativos.

2.5 Habilidade de aprendizagem

A cognição é definida como processo em que os animais adquirem, processam, armazenam e agem sobre informações coletadas do ambiente (Shettleworth, 2010; Brown, 2015). A aprendizagem é um mecanismo importante que proporciona aos animais a flexibilidade comportamental frente a mudanças. Assim como os mamíferos, existem evidências de que os peixes teleósteos também possuem as propriedades e a base neural do aprendizado e da memória (Salas et al., 2006; Hong e Zha, 2019). Sendo assim, esses animais aprendem durante toda vida, além de desenvolver métodos de aprendizagem complexas (Kieffer e Colgan, 1992).

As estruturas cerebrais associadas as tomadas de decisões, que são fundamentais para o aprendizado e comportamento social, apresentam semelhanças entre os vertebrados (Goodson, 2005; O'Connell e Hofmann, 2011; Torres, 2017). Em peixes, o aprendizado e memória são associados ao cerebelo e amígdala (Vargas et al., 2009; Torres, 2017). Existe uma variabilidade na capacidade de aprendizado entre as espécies de peixe, às vezes, dentro das mesmas espécies. Isso ocorre devido a diferenças genéticas, enquanto parte pode ser atribuída a variadas experiências durante a ontogenia. Esses processos moldam o comportamento para corresponder às condições ambientais predominantes (Brown, 2015). Os estímulos neurais repetidos podem estimular processo, sendo comum em ambientes com variações ambientais, principalmente quando os animais são jovens, aumentando a flexibilidade comportamental, facilitando a fuga de predadores e melhorando estratégias alimentares (Braithwaite e Salvanes, 2005; Kotrschal e Taborsky, 2010).

Os animais podem utilizar vários mecanismos de aprendizado pelos quais, através de experiências passadas, conseguem modificar o comportamento. Além disso, os peixes conseguem resolver problemas espaciais complexos (Perera, 2004), são capazes de aprendizagem latente (Gómez-Laplaza e Gerlai, 2010) e aprende tarefas espaciais, envolvendo adaptação a estímulos na marcação visual (Kieffer e Colgan, 1992).

O labirinto é uma ferramenta utilizada para determinar o aprendizado e memória em peixes, sendo que condiciona os indivíduos a associação através de estímulos visuais (por exemplo, objeto, cor ou sinal) a um estímulo final (por exemplo, o alimento) (Becker e Kowall, 1977; Mesquita et al., 2016). Esse aparato pode ser aplicado de diversas formas como o labirinto em T (Gould, 2011), labirinto em Y (Adeyemi et al., 2010) e em formato de cruz (Gaikwad et al., 2011). O labirinto em T é utilizado para investigar a memória com base na atividade locomotora (Tierney e Lee, 2011; Mesquita et al., 2016). Torres et al. (2018),

verificaram mudanças comportamentais e de aprendizagem quando utilizado o labirinto em T com cores diferentes para *Oreochromis niloticus*, em que as cores preta e verde foram indicadas para o teste de aprendizado na espécie, verificando que nessas cores os animais foram mais ágeis na realização de tarefas. Petrazzini et al. (2017) utilizando essa mesma ferramenta, não encontraram evidências claras de maior aprendizado em ambos os sexos de *Poecilia reticulata*, no entanto, esses autores não excluíssem completamente a hipótese de que as fêmeas tenham maior flexibilidade cognitiva do que machos a depender da tarefa a ser realizada. O estilo de enfrentamento ao estresse também pode ser avaliado através desse método, no entanto, ainda são escassos os estudos que façam essa associação.

De modo geral, a capacidade cognitiva e o aprendizado em peixes permitem observar e compreender as estratégias alimentares, de sobrevivência e comunicação entre os animais demonstrando ser uma ferramenta importante para a melhora do bem-estar na produção e, conseqüente, refletindo crescimento animal. No entanto, são necessários mais estudos que associem os processos cognitivos ao estilo de enfrentamento ao estresse.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se diferenças na habilidade de aprendizagem, desempenho zootécnico e respostas fisiológicas podem ser explicadas por diferenças no estilo de enfrentamento ao estresse do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

3.2. Objetivos específicos

- Classificar juvenis de *C. macropomum* por estilos de enfrentamento ao estresse;
- Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de *C. macropomum* classificados por personalidade, criados juntos (proativos+reativos) e separados;
- Verificar a influência do estilo de enfrentamento ao estresse sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis proativos e reativos de *C. macropomum*, após o experimento de desempenho zootécnico.
- Avaliar a capacidade de aprendizagem de indivíduos proativos e reativos de *C. macropomum* em labirinto em T.
- Medir o tempo de latência, a primeira escolha, o tempo gasto para fazer a primeira escolha, o tempo gasto para alimentação e o tempo ocioso de indivíduos proativos e reativos de *C. macropomum*.

REFERÊNCIAS

- Adeyemi, O.O., Akindele, A.J., Yemitan, O.K., Aigbe, F.R., Fagbo, F.I., 2010. Anticonvulsant, anxiolytic and sedative activities of the aqueous root extract of *Securidaca longepedunculata* Fresen. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 191-195.
- Alderman, S., 2016. Bold fish, shy: It's all in the metabolism. *J. J. Exp. Biol.* 219, 1937.
- Andersen, D. E., Reid, S. D., Moon, T. W., Perry, S. F., 1991. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1811-1817.
- Andersson, M.A., Silva, P.I.M., Steffensen, J.F., Hoglund, E., 2011. Effects of maternal stress style on offspring characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Horm. Behav.* 60, 699-705.
- Assis, Y.P. A. S., Porto, L.A., Melo, N.F.A.C., Palheta, G.D.A., Luz, R.K., Favero, G.C., 2020. Feed Restriction as a Feeding Management Strategy in *Colossoma macropomum* Juveniles under Recirculating Aquaculture System (RAS). *Aquaculture* 529, 735689.
- Basic, D., Winberg, S., Schjolden, J., Krogdahl, A., Höglund, E., 2012. Context dependent responses to novelty in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), selected for high and low post-stress cortisol responsiveness. *Physiol. Behav.* 105, 1175-1181.
- Becker, G., Kowal, M., 1977. Crucial role of the postnatal maternal environment in the expression of prenatal stress effects in the male rats. *J. Comp. Physiol. Psych.* 91, 1432-1446.
- Behrens, J. W., Von Friesen, L. W., Brodin T., Ericsson, P., Hirsch, P. E., Persson, A., Sundelin, A., Van Deurs, M., Nilsson, P. A., 2020. Personality- and size-related metabolic performance in invasive round goby (*Neogobius melanostomus*). *Physiol. &behav.* 215, 112777-112777.
- Braithwaite, V. A., Salvanes, A. G., 2005. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild

populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, n.272, p.1107-1113.

Brown, C., 2015. Inteligência, sensibilidade e ética dos peixes. *Anim Cogn* 18, 1–17.

Budaev, S., Brown, C., 2011. Fish cognition and behavior. Chapter: Personality and Behaviour. 35- 65.

Carbonara, P., Alfonso, S., Zupa, W., Manfrin, A., Fiocchi, E., Pretto, T., Spedicato, M.T., Lembo, G., 2019. Behavioral and physiological responses to stocking density in sea bream (*Sparus aurata*): Do coping styles matter? *Physiol. & Behav.* 202, 112698.

Castanheira, M. F., Conceição, L. E. C., Millot, S., Rey, S., Begout, M. L., Damsgard, B., Kristensen, T., Hoglund, E., Øverli, Ø., Martins, C. I. M., 2017. Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. *Rev. aquac.* 9,23-41.

Castanheira, M. F., Herrera, M., Costa, B., Conceição L. E. C., Martins, C. I. M., 2013. Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream *Sparus aurata*: indication of divergent coping styles. *Appl. Anim. Behav. Sci* 143,75-81.

Coates, W. D., Hale, R., Morrongiello, J. R., 2019. Dispersal decisions and personality in a freshwater fish. *Anim. Behav.* 157,209-218.

Colchen, T., Faux, E., Teletchea, F., Pasquet, A., 2017. Is personality of young fish consistent through different behavioural tests? *Appl. Anim. Behav. sci.* 194,127-134.

De souza e silva, W., Ferreira, A.L., Do Carmo Neves, L., Ferreira, N.S, Palheta, G.D.A., Takata, R., Luz, R.K., 2021. Effects of stocking density on survival, growth and stress resistance of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in a recirculating aquaculture system (RAS). *Aquac.Int.* 29,609-621.

Figueiredo, L.G., Santos F.A.C., Torres, I.F.A., Boaventura. T.P., Luz, R.K. 2022. Behaviour of personality-screened juvenile *Oreochromis niloticus* in different challenges: Bold fish present more exploratory capacity and learning to face imposed challenges. *An. Acad. Bras. Cienc.* 95, 1.

Gaikwad, S., Stewart, A., Hart, P., Wong, K., Piet, V., Cachat, J., Kalueff, A.V., 2011. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. *Behavioural Processes* 87, 224-230.

Gesto, M., 2019. Consistent individual competitive ability in rainbow trout as a proxy for coping style and its lack of correlation with cortisol responsiveness upon acute stress. *Physiol. & Behav.* 208,112576.

Gesto, M., Madsen, L., Andersen, N. R., Jøcumsen, A., 2018. Differences in stress and disease resilience related to emergence time for first feeding in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Experim. Biol.* 221(8), jeb174623.

Gesto, M., Zupa, W., Alfonso, S., Spedicato, M. T., Lembo, G., Carbonara, P., 2020. Using acoustic telemetry to assess behavioral responses to acute hypoxia and ammonia exposure in farmed rainbow trout of different competitive ability. *Ap, Anim. Behav. Sci.* 230,105084.

Golding, M, Carvalho, L., 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Rev. Bras. Zool.* 1,107- 133.

Gómez-Laplaza, L.M., Gerlai, R., 2010. Latent learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research* 2, 509-515.

Goodson, J. L., 2005. The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations. *Horm.Behav.*48, 11-22.

Gould, G.G., 2011. Modified associative learning T-maze test for zebrafish (*Danio rerio*) and other small teleost fish. *Neuromethods.* 51, 61-73.

Griffin, A.S., Guillette, L.M., Healy, S.D., 2015. Cognition and personality: an analysis of an emerging field. *Trends in Ecology & Evolution* 30, 207-214.

Guimarães, I. G., Martins, G. P. Nutritional requirement of two Amazonian aquacultured fish species, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): a mini review. *J. Appl. Ichthyol.* 31, 57-66.

Heg, D., Schürch, R., Rothenberger, S., 2011. Behavioral type and growth rate in a cichlid fish. *Behav. Ecol.* 22, 1227-1233.

Hong, X., Zha, J., 2019. Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. *Science of the total environment*, 686, 311-321.

Huntingford, F. A. G., Andrew, M. S., Morera, D., Coyle, S. M., Pilarczyk, M., 2010. Coping strategies in a strongly schooling fish, the common carp *Cyprinus carpio*. *J.Fish Biol.* 76,1576–1591.

IBGE., 2020. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento da produção da aquicultura. Rio de Janeiro: IBGE.

Kieffer, J.D., Colgan, P.W., 1992. The role of learning in fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, n.2, p. 125-143.

Killen, S. S., Adriaenssens, B., Marras, S., Claireaux, G.,Cooke, S. J., 2016. Context dependency of trait repeatability and its relevance for management and conservation of fish populations. *Conserv. physiol.* 4(1), Cow007.

Kittilsen, S., Johansen, I. B., Braastad, B. O., Øverli, Ø., 2012. Pigments, parasites and personality: towards a unifying role for steroid hormones? *PLoS One* 7, e34281.

Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., 1999. Coping styles in animals: current in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobeha. Rev.* 23, 925–935.

Koolhaas, J.M., de Boer, S.F., Coppens, C.M., Buwalda, B., 2010. Neuroendocrinology of coping styles: to understand the biology of individual evolution. *Neuroendocrinol.*31, 307-321.

Kotrschal, A., Taborsky, B., 2010. A mudança ambiental aumenta as habilidades cognitivas em peixes. *Biologia PLoS*, n. 4, e1000351.

Lucon-Xiccato, T., Bisazza, A., 2017. Complex maze learning by fish. *Animal Behaviour* 125, 69-75.

Martins, C.I.M., Schrama, J.W., Verreth, J. A. J., 2005. The consistency of individual differences in growth, feed efficiency and feed efficiency in individually housed *Clarias gariepinus* (Burcell 1822) African catfish. *Aquacult. Res.* 36, 1509 – 1516.

Mesquita, F. O., Borcato, F. L., Huntingford, F. A., 2015. Aprendizagem baseada em dicas e algorítmica na carpa comum: uma possível ligação com o estilo de enfrentamento do estresse. *Behav. Proces.* 115, 25 – 29.

Mesquita, F. O., Torres, I. F. A., Luz, R. K., 2016. Behaviour of proactive and reactive tilapia *Oreochromis niloticus* in a T-maze. *Ap. Anim. Behav.* 181, 200-204.

Mesquita, F.O., Torres, I.F., Luz, R.K., 2016. Comportamento proativo e reativo da tilápia *Oreochromis niloticus* em um labirinto em T. *Applied Animal Behavior Science* 181, 200-204.

Mittelbach, G. G., Ballew, N. G., Kjelvik, M. K., 2014. Fish behavioral types and their ecological consequences. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 71, 1-18.

Morais, I. D. S., O'sullivan, F. D. A., 2017. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE).

Moscicki, M.K., Hurd, P.L., 2015. Sex, boldness and stress experience affect convict cichlid, *Amatitlani nigrofasciata*, open field behavior. *Anim. Behav.* 107, 105-114.

O'connell, L.A., Hofmann, H.A., 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *J. Comp. Neurol.* 519, 3599-3639.

Overli, O., Sorensen, C., Pulman, K. G., Pottinger, T.G., Korzan, W., Summer, C.H., Nilsson, G.E., 2007. Evolutionary background for stress coping styles: Relationships

between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neurosci. Behav. Rev.* 31, 396-412.

Pedroza Filho, M. X., Flores, R., Ianella, P., Castilho-Barros, L., de Oliveira, E. J., Caetano, A., 2020. Tambaqui: benefícios econômicos com a adoção do Tambaplus Parentesco. Embrapa Pesca e Aquicultura-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

PeixeBR. Anuário PeixeBR da Piscicultura. 2022. Disponível em <<https://www.peixebr.com.br/anuario-2022/>>. Acessado em 20 dez 2022.

Perera, T.B., 2004. Fish can encode order in their spatial map. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, 2131-2134.

Pickering, A. D., Christie, P., 1981. Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 487–496.

Planas-Sitjá, I., Deneubourg, J. L., Cronin, A. L., 2021. Variation in personality can substitute for social feedback in coordinated animal movements. *Commun. biol.* 41, 469-469.

Ribeiro, F.M., Freitas, P.V.D.X., dos Santos, E.O., de Sousa, R.M., Carvalho, T.A., de Almeida, E.M., Costa, A.C., 2016. Alimentação e nutrição de pirapitinga (*Piaractus brachypomums*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*): Revisão. *Pubvet*, 10, 873-945.

Richter, S. H., Hintze, S., 2019. From the Individual to the Population – and Back Again? Emphasising the Role of the Individual in Animal Welfare Science. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 212, 1-8.

Santos, F. A. C., Júlio, G. S. C., Luz, R. K., 2021. Stocking density in *Colossoma macropomum* larviculture, a freshwater in recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* 52, 1185-1191.

Shettleworth, S. J., 2010. Cognition, evolution, and behaviour, 2nd edn. Kindle Edition. Oxford University Press, Oxford.

Silva, R. D., Rocha L. O., Fortes, B. D. A., Rodrigues, C. P. F., Lobo, J. R., Faleiro, M. B. R., De Paula, F. G., Vieira, D., 2009. Determinação de glicose plasmática em exemplares adultos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) por glicosímetro digital portátil e por método enzimático. Anais 6º Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão. Goiânia, 5914-5919.

Smith, B. R. Blumstein, D.T., 2010. Fitness consequences of personality traits: a meta analysis. Behav. Ecol. 19, 448–455.

Tavares-Dias, M., 2011. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. Embrapa Amapá-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (*INFOTECA E*).

Tierney, A.J., Lee, J., 2011. Spatial Learning in a T-Maze by the Crayfish *Orconectes rusticus*. Journal of Comparative Psychology 125, 31-39.

Torres, I. F. A. Efeito da coloração do ambiente sobre o comportamento e aprendizado de tilápia do Nilo. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 20. 2017.

Torres, I. F. A., Júlio, G. S. C., Figueiredo, L. G., Lima, N. L. C., Soares, A. P. N. Luz, R. K., 2017. Larviculture of a carnivorous freshwater catfish, *Lophiosilurus alexandri*, screened by personality type. Behav. Process. 145, 44-47.

Torres, I.F.A., 2021. Influência da personalidade sobre o desempenho zootécnico e reprodutivo de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. PhD Thesis. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

Torres, I.F.A., Ferreira, A.D., Silva, W.D.E., Mesquita, F.O., Luz, R.K., 2018. Effect of environmental color on learning of Nile tilapia. Applied Animal Behaviour Science 209, 104-108.

Vargas, J.P., López, J.C., Portavella, M., 2009. What are the functions of fish brain pallium? Brain. Res. Bull. 79, 436-440.

Vindas, M. A., Madaro, A., Fraser, T. W. K., Höglund, E., Olsen, Kristiansen, R. E., Øverli, Ø., 2017. Uncontrollable chronic stress reduces growth disparities in farmed Atlantic salmon. *Physiol & Behav.* 179, 246-252.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*77, 591- 625.

Wilson, A. D. M., Godin, J. G. J., Ward, A.J.W., 2009. Boldness and reproductive fitness correlates in the Eastern mosquito fish, *Gambusia holbrooki*. *Ethol* 116, 96-104.

Wong, R. Y., French, J., Russ, J. B., 2019. Differences in stress reactivity between zebrafish with alternative stress coping styles. *R. Soci. Op. Sci.* 6(5), 181797-1817.

Woynárovich, A., Van Anrooy, R., 2019. Guia de Campo da Cultura de Tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816. Artigo Técnico de Pesca e Aquicultura da FAO.

Yang, K., Zhang, X., Liu, Z., Lu, W., 2022. Parental personality influence offspring performance traits in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 548, 737694.

Artigo 1

Growth and physiological response of proactive and reactive juvenile “tambaqui”

(*Colossoma macropomum*) in a recirculating aquaculture system

Growth and physiological response of proactive and reactive juvenile “tambaqui” (*Colossoma macropomum*) in a recirculating aquaculture system

Camila Oliveira Paranhos¹, Caroline Teixeira Bonifácio¹, Nathália Soares Ferreira¹, Ronald Kennedy Luz^{1*}

¹ Laboratório de Aquacultura, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura. Avenida Antônio Carlos, nº 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Running Head: Growth response of proactive and reactive juvenile “tambaqui

Research area: Animal Fisheries Sciences

*Correspondence: Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte-MG, Brasil. Cep. 31270-901. E-mail: luzrk@vet.ufmg.br. Tel.: +55 (31) 3409 2218.

Abstract: This study evaluated the growth and physiological response of proactive and reactive *Colossoma macropomum* juveniles in a recirculating aquaculture system (RAS). In Phase 1 of the experiment (50 days of cultivation), juveniles, weighing $2.16 \pm 0.52\text{g}$, were stocked in 12 28-L tanks. The following treatments were tested: proactive (PT), reactive (RT) and mixed (MT) composed of reactive (MRT) and proactive (MPT) animals. In Phase 2 of the experiment (40 days of cultivation), the animals were transferred to 175-L tanks with the same treatments as Phase 1. The animals were fed twice a day with commercial diet in both phases. After Phase 1, MPT animals showed higher growth than MRT animals ($P < 0.05$), and higher weight gain and daily weight than PT animals ($P < 0.05$). After Phase 2, PT animals showed higher weight gain and daily weight gain than RT and MT animals ($P < 0.05$), as did MPT animals compared to PT animals. Performance for RT animals was superior ($P < 0.05$) to that of MRT animals. Glucose ($P < 0.04$) and cholesterol ($P < 0.01$) were higher for RT animals compared to PT animals. Cholesterol was higher for MPT animals than for MRT animals ($P < 0.01$), while plasma protein was lower ($P < 0.001$). Glucose ($P < 0.001$) and cholesterol ($P < 0.01$) were higher for MPT animals compared to PT animals and for MRT animals compared to RT animals (glucose $P < 0.02$, cholesterol $P < 0.01$). After 90 days of cultivation, proactive animals cultivated separately presented better performance. When cultivated together, reactive animals experienced a decrease in performance and both stress coping styles showed more signs of stress.

Keywords: behavior; Characiformes; coping style; performance.

Introduction

Studies on animal behavior have seen growing interest and have established consistent behavioral differences between individuals with important results for animal production (Koolhaas et al. 1999; Killen et al. 2016). Various terms have been used to describe such behavioral differences, including personality, degree of boldness and coping style, among others. Stress coping style is used to describe individual variation in behavior and physiology among animals in a group that is consistent over time (Castanheira et al. 2017; Planas-Sitjà et al. 2021). Among these individual variants, two behavioral and neuroendocrine response patterns can be highlighted: proactive and reactive (Frost et al. 2007). Proactive and reactive are terms that refer to the level of proactivity exhibited by an individual when faced with a condition that offers risk (Wilson et al. 1994; Alderman 2016). Proactive individuals present a physiological response dominated by the sympathetic nervous system and the release of catecholamines (noradrenaline and adrenaline) into the blood (Koolhaas 2008). They are animals that have been characterized as having an escape behavioral response and are more likely to disperse (Coates et al. 2019). Therefore, they tend to explore unfamiliar environments and take risks (Castanheira et al. 2013; Colchen et al. 2017). It is also normal for them to behave actively and fight predators or flee from them (Alderman et al. 2016). In contrast, reactive animals have a physiological response to stress dominated by the hypothalamic-pituitary-interrenal axis, whereby the release of glucocorticoids (cortisol) occurs (Andersson et al. 2011). They exhibit swimming activity and tend to conserve energy (Mesquita 2011), avoid risks and generally remain immobile when subjected to new environments (Koolhaas 2008; Toms et al. 2010; Castanheira et al. 2013).

In this sense, aquaculture studies have proposed advantages to characterizing fish as proactive and reactive. Proactive fish recover their appetite faster after stressful situations

(Mas-Muñoz et al. 2011), have higher growth rates (Basic et al. 2015) and tend to gain body weight faster than reactive conspecifics (Heg and Rothenberger 2011; Mittelbach et al. 2014).

In addition, they are more disease resistant (Hoglund et al. 2008) and generally have greater reproductive success (King et al. 2013), which directly affects production systems. According to Castanheira et al. (2017), mass screening of animals of different stress coping styles can help to optimize production systems since ideal conditions for proactive animals likely differ from those for reactive animals. Furthermore, recognizing the existence of different behavioral and physiological stress coping styles can be applied to animal selection programs.

Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), is a Neotropical fish species of the family Characidae (order Characiformes) that is native to the Amazon River basin (Guimarães and Martins, 2015). It is the second most commercially produced species in Brazil (PeixeBR 2020), due to its rapid growth and robustness, and the best performing native species (Santos et al. 2021), with individuals reaching weights of more than 25 kg. The species is also accepted for consumption in other South American countries, such as Colombia, Peru and Venezuela (Woynárovich and Van Anrooy 2019). The species shows good adaptation to cultivation in RAS (De Souza e Silva et al. 2021; Boaventura et al. 2021; Santos et al. 2021; Santos et al. 2022), although it commonly exhibits size heterogeneity during cultivation (Santos et al. 2021), which has yet to be explained.

Thus, we aimed to evaluate the hypothesis that proactive individuals of *C. macropomum* will present different behavioral, physiological and performance responses when cultivated with and without reactive animals. For this, we evaluated the performance and physiological response of *C. macropomum* juveniles classified by stress coping style as proactive or reactive, cultured together and separately in a recirculating aquaculture system (RAS).

Materials and Methods

Experimental design and management

The experiment was carried out in Laboratório de Aquacultura at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), following a protocol approved by the Committee for Ethics in Animals Use (CEUA -244/2020), which involved two experimental phases.

*Classification of *Colossoma macropomum* by stress coping style*

A test was performed to obtain *C. macropomum* juveniles classified according to stress coping style as proactive or reactive. Juveniles measuring 4.5 ± 1.1 cm in total length were separated as either proactive or reactive through the new environment test (adapted from Mesquita et al. 2016). The test tank (80 × 50 × 46 cm) was filled to 35 cm, for a total of 140 L of water (Figure 1). To serve as a dark environment, a dark and closed chamber measuring 26.5 × 50 × 46 cm was built at one end of the tank and covered with black canvas to prevent the entry of light. A circular cut was made in the chamber partition at a height of 9.5 cm from the bottom of the tank. A transparent tunnel, 2.5 cm long and 3.5 cm in diameter, was modified so that its entrance had a door that prevented animal passage until the end of acclimatization. The tunnel was coupled to provide access between the dark environment and the light environment, thus allowing animals to return to the dark after passing the water at 28 °C and an aerator were placed at the end of the tank opposite the dark chamber.

The test consisted of placing 20 juveniles in the dark chamber, where they remained under acclimatization for 10 minutes before being provided access to the light environment. These animals were deprived of food for 72 hours prior to the test so that the gastrointestinal tract would be empty and the animals would experience hunger so as to provoke them to face the challenge of a new environment. After acclimatization, commercial feed pellets (1–2 mm in diameter and containing 360.0 g kg⁻¹ crude protein, 70.0 g kg⁻¹ ether extract, 140.0 g kg⁻¹ mineral matter, 10.0 g kg⁻¹ calcium and 6.0 g kg⁻¹ phosphorus) were released into the light environment to promote an olfactory stimulus in the animals. The access door was then

opened for 40 minutes, allowing the fish to pass between environments, after which it was closed. The animals that remained in the dark chamber at the end of the 40 minutes were classified as reactive and those that passed through the tunnel and were found in the light environment were classified as proactive (adapted from Mesquita et al. 2015).

The test was performed until obtaining 84 proactive and 84 reactive juveniles.

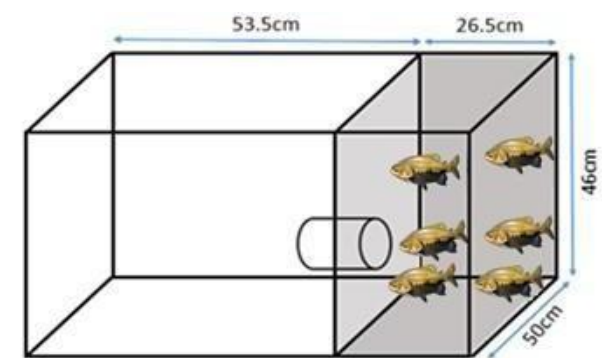


Figure 1. Schematic drawing of the test tank used for personality classification

*Phase 1: Initial (day 1 to day 50) performance of *Colossoma macropomum* juveniles classified by stress coping style*

After classification, the juveniles were stocked in 12 tanks of 28 L of useful volume in a RAS. The RAS included mechanical (acrylic wool) and biological (using gravel as media) filters, a heating system, water pump (Sarlo Better pump - 1,920 L h⁻¹) and supplementary aeration, by means of porous stone and a 2 hp air blower. The fish were stocked at an initial density of one juvenile per 2 L of water. The following treatments were tested with each tank being an experimental unit:

- Reactive Treatment (RT): four tanks received 14 reactive animals each.
- Proactive Treatment (PT): four tanks received 14 proactive animals each.

- Mixed Treatment (MT): four tanks received a combination of seven reactive animals (MRT- mixed reactive treatment) and seven proactive animals (MPT- mixed proactive treatment) for a total of 14 animals each.

Before starting the experiment, the reactive animals of the MT treatment were anesthetized with 50 mg L⁻¹ of eugenol (Biodynamics) (Ferreira et al. 2021) and marked subcutaneously with a 0.4 cm line with a fluorescent visual implant elastomer for individual identification. All other animals underwent the same procedure, but without marking, thus standardizing initial management.

Initial measurements of the animals were: weight 2.16 ± 0.52 g, horizontal length 5.00 ± 0.42 cm, and vertical length 2.11 ± 0.25 cm. The water of the RAS was maintained at a temperature of 29.59 ± 0.93 °C. Dissolved oxygen, measured using a multiparameter probe (EcoSense® DO200A, Yellow Springs Instrument Co. Inc. Yellow Springs, OH, USA), was maintained above 5 mg L⁻¹. Total ammonia was monitored twice a week using a colorimetric kit (Labcontest) and was maintained at 0.16 ± 0.13 mg L⁻¹. Water pH was measured with a Hanna HI98130 multiparameter probe and maintained at 7.25 ± 0.31 . About 50% of the water in each tank was replaced every three days. This volume was replaced with water under the same conditions as that of the RAS.

The animals were fed *ad libitum* at 08:00 and 16:00 h with a commercial diet measuring 1–2 mm in diameter and containing 360.0 g kg⁻¹ crude protein, 70.0 g kg⁻¹ ether extract, 140.0 g kg⁻¹ mineral matter, 10.0 g kg⁻¹ calcium and 6.0 g kg⁻¹ phosphorus (manufacturer data).

Left over feed was collected in a sieve 30 minutes after feeding and stocked in a freezer - 20 °C for subsequent drying in an oven at 55 °C and weighing. Correction of feed moisture was carried out under normal conditions. Phase 1 lasted 50 days.

Phase 2: Performance from day 51 to day 90 of Colossoma macropomum juveniles classified by stress coping style

In this phase, the animals were transferred to larger tanks while keeping the original treatments described in Phase 1. Thus, the juveniles were stocked in another RAS with tanks of 175 L of useful volume. The tanks were filled with water to 60% capacity. The water was monitored twice a week and maintained at a temperature of 29.77 ± 1.61 °C with dissolved oxygen above 5 mg L^{-1} , total ammonia of $0.16 \pm 0.15 \text{ mg L}^{-1}$ and pH of 7.80 ± 0.45 . The feeding regimen was the same as in Phase 1, however, the commercial diet measured 6–8 mm in diameter and contained 320.0 g kg^{-1} crude protein, 60 g kg^{-1} ether extract, 120 g kg^{-1} mineral matter, 5 g kg^{-1} calcium and 6 g kg^{-1} phosphorus (manufacturer data). Phase 2 lasted 40 days.

Biometric index

Animal performance was determined by performing biometrics after 50 days of cultivation, the end of Phase 1, and after 40 more days, day 90 of cultivation, the end of Phase 2. Having been marked with elastomers, the reactive MT animals could be distinguished, and their data evaluated separately. The animals were weighed (analytical scale with 0.01mg precision) and measured (millimeter ruler) for vertical length and horizontal length. Based on the data obtained from each tank, the following parameters were calculated:

- Average weight gain (g) (WG) = average final weight - average initial weight;
- Daily weight gain (g/day) (DWG) = weight gain/days since previous biometrics
- Average vertical length gain (cm) (VLG) = average final vertical length - average initial vertical length;
- Average horizontal length gain (cm) (HLG) = average final horizontal length

- average initial horizontal length;

- Feed intake (FI) = ration offered - leftovers
- Feed conversion (FC) = feed intake/biomass gain
- Protein efficiency ratio (PER) = weight gain (WG)/Feed intake (FI) x %CP of diet x

100.

- Survival (%) was determined by direct count of individuals at the end of each experimental phase.

Blood sampling

At the end of Phase 2, blood was collected through venipuncture of the caudal vertebral artery, with ventral access, from three animals of each RT and PT tank and from three MRT and three MPT animals from each MT tank. About 500 μL of blood was collected in a heparinized syringe, to which 10% of heparin was subsequently added, in relation to the volume of blood collected. These samples were used to determine hematocrit values from capillary tubes filled to approximately 2/3 with previously homogenized blood and centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm (Microline-Laborline®) (Goldenfarb et al. 1971). Hemoglobin concentrations were determined (Bioclin®) with 10 μL of blood, followed by reading with a UV/Vis spectrophotometer (Biochrom Libra S21 - S22). The remaining aliquots of whole blood were centrifuged at 5,000 rpm for 10 minutes to separate the liquid fraction. Plasma samples were used to evaluate plasma protein (g dL^{-1}), cholesterol (mg dL^{-1}), triglycerides (mg dL^{-1}) and glucose (mg dL^{-1}) using commercial kits (Bioclin®), followed by reading with a UV/Vis spectrophotometer (Biochrom Libra S22).

Data analysis

All data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and Levene's homogeneity of variance test. All data were then submitted to two-way ANOVA ($p < 0.05$), followed by

Tukey's test ($p < 0.05$) to differentiate means. Analyses were performed using Minitab17 software.

Results

*Phase 1: Performance from day 1 to day 50 of *Colossoma macropomum* juveniles classified by stress coping style*

After 50 days of the experiment (end of Phase 1), no differences ($P > 0.05$) were observed among PT, RT and MT for any of the evaluated parameters (WG, DWG, VLG, HLG, FI, FC and PER) (Table 1). However, within MT, MPT animals had better performance for WG, DWG, HLG and VLG compared to MRT animals ($P < 0.05$) (Table 2). Furthermore, WG and DWG were higher for MPT animals compared to PT animals ($P < 0.05$). However, there were no differences in HLG and VLG between MPT and PT ($P > 0.05$). There were no differences ($P > 0.05$) between MRT and RT for any of the evaluated parameters (Table 2).

Table 1. Growth response of *Colossoma macropomum* juveniles classified by stress coping style (1 to 50 days of experiment in Phase 1).

Treatments	Parameters						
	WG (g)	DWG (g)	HLG (cm)	VLG (cm)	FI (g)	FC	PER(%)
PT	23.93 ± 2.24	0.47 ± 0.00	6.82 ± 0.20	3.40 ± 0.50	290.00 ± 29.90	0.86 ± 0.07	0.23 ± 0.02
RT	21.89 ± 4.16	0.43 ± 0.08	6.25 ± 0.65	3.21 ± 0.50 ^a	285.50 ± 22.90	0.94 ± 0.14	0.21 ± 0.03
MT	24.39 ± 1.74	0.48 ± 0.02	6.53 ± 0.24	3.47 ± 0.55	309.76 ± 5.99	-	-
<i>P</i> -value	0.44	0.44	0.21	0.76	0.3	0.34	0.37

Data are similar according to ANOVA and Tukey's test ($P > 0.05$). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). Average weight gain (WG), Daily weight gain (DWG), Average horizontal length gain (HLG), Average vertical length gain (VLG), Feed intake (FI), Feed conversion (FC), Protein efficiency ratio (PER). REACTIVE Treatment (RT): animals reactive. PROACTIVE Treatment (PT): animals proactive. MIXED Treatment (MT).

Table 2. Growth of *Colossoma macropomum* juveniles classified by stress coping style within mixed treatment (MT) (1 to 50 days of experiment in Phase 1).

Treatments	Parameters			
	WG (g)	DWG (g)	HLG (cm)	VLG (cm)
MPT	29.74 ± 2.82 ^a	0.59 ± 0.05 ^a	7.39 ± 0.45 ^a	3.77 ± 0.54 ^a
MRT	18.18 ± 0.93 ^b	0.36 ± 0.01 ^b	5.42 ± 0.70 ^b	2.83 ± 0.17 ^b
<i>P</i> -value	<0.001	<0.001	<0.001	0.01
PT	23.93 ± 2.24 ^b	0.47 ± 0.04 ^b	6.82 ± 0.20 ^a	3.40 ± 0.50 ^a
MPT	29.74 ± 2.82 ^a	0.59 ± 0.05 ^a	7.39 ± 0.45 ^a	3.77 ± 0.54 ^a
<i>p</i> -value	0.01	0.01	0.06	0.35
RT	21.89 ± 4.16 ^a	0.43 ± 0.83 ^a	6.25 ± 0.65 ^a	3.21 ± 0.50 ^a
MRT	18.18 ± 0.95 ^a	0.36 ± 0.01 ^a	5.42 ± 0.70 ^a	2.83 ± 0.17 ^a
<i>P</i> -value	0.13	0.13	0.13	0.2

Different letters in a column indicate a significant difference between treatments according to two-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). Average weight gain (WG), Daily weight gain (DWG), Average horizontal length gain (HLG), Average vertical length gain (VLG). REACTIVE Treatment (RT): animals reactive. PROACTIVE Treatment (PT): animals proactive. MIXED Treatment (MT): combination of reactive animals (MRT – mixed reactive treatment) and proactive (MPT – mixed proactive treatment).

Phase 2: Performance from day 51 to day 90 of Colossoma macropomum juveniles classified by stress coping style

At day 90 (end of Phase 2), WG and DWG were significantly higher for PT animals compared to RT and MT animals ($P < 0.05$) (Table 3). There were no differences between RT and MT for HLG, VLG, FI, FC and PER ($P > 0.05$). MPT animals had better performance for WG, DWG, HLG and VLG ($P < 0.05$) than did MRT animals (Table 4). Furthermore, WG

was higher for MPT animals compared to PT animals ($P < 0.05$), whereas there were no differences for DWG, HGL and VLG ($P > 0.05$). All evaluated growth parameters except for HLG differed significantly ($P < 0.05$) between MRT and RT. No mortality was registered for any of the treatments after 50 days of the experiment (end of Phase 1), and there were no significant differences in survival among treatments after 90 days (end of Phase 2) ($P > 0.05$) (Table 5).

Table 3. Growth response of *Colossoma macropomum* juveniles classified by stress coping style (51 to 90 days of experiment in Phase 2).

Treatments	Parameters						
	WG (g)	DWG (g)	HLG (cm)	VLG (cm)	FI (g)	FC	PER (%)
PT	44.41 ± 1.44 ^a	1.11 ± 0.03 ^a	4.25 ± 0.39 ^a	3.24 ± 0.61 ^a	587.50 ± 63.00 ^a	1.28 ± 0.41 ^a	0.23 ± 0.0275 ^a
RT	31.12 ± 9.19 ^b	0.77 ± 0.23 ^b	3.42 ± 0.83 ^a	2.88 ± 0.29 ^a	491.90 ± 188.40 ^a	1.17 ± 0.10 ^a	0.20 ± 0.050 ^a
MT	31.79 ± 7.76 ^b	0.79 ± 0.19 ^b	3.57 ± 1.99 ^a	2.75 ± 1.35 ^a	535.00 ± 201.00 ^a	-	-
<i>P</i> -value	0.04	0.04	0.48	0.72	0.71	0.37	0.31

Different letters in a column indicate a significant difference between treatments according to two-way ANOVA and Tukey's test ($P < .05$). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). Average weight gain (WG), Daily weight gain (DWG), Average horizontal length gain (HLG), Average vertical length gain (VLG), Feed intake (FI), Feed conversion (FC), Protein efficiency ratio (PER). REACTIVE Treatment (RT): animals reactive. PROACTIVE Treatment (PT): animals proactive. MIXED Treatment (MT).

Table 4. Growth of *Colossoma macropomun* juveniles classified by stress coping style within mixed treatment (MT) (51 to 91 days of experiment in Phase 2).

Treatments	Parameters			
	WG (g)	DWG (g)	HLG (cm)	VLG (cm)
MPT	47.68 ± 19.05 ^a	1.19 ± 0.48 ^a	4.44 ± 1.47 ^a	2.88 ± 0.50 ^a
MRT	17.25 ± 6.31 ^b	0.43 ± 0.15 ^b	2.72 ± 0.59 ^b	2.03 ± 0.27 ^b
<i>p</i> -value	0.02	0.02	0.02	0.02
PT	44.41 ± 41.44 ^b	1.11 ± 0.03 ^a	4.25 ± 0.39 ^a	3.24 ± 0.61 ^a
MPT	47.68 ± 19.05 ^a	1.19 ± 0.47 ^a	4.44 ± 1.46 ^a	2.88 ± 0.49 ^a
<i>p</i> -value	0.02	0.74	0.8	0.39
RT	31.12 ± 9.19 ^a	0.77 ± 0.23 ^a	3.42 ± 0.83 ^a	2.88 ± 0.29 ^a
MRT	17.25 ± 6.31 ^b	0.43 ± 0.15 ^b	2.72 ± 0.59 ^a	2.03 ± 0.27 ^b
<i>P</i> -value	0.04	0.04	0.22	<0.001

Different letters in a column indicate a significant difference between treatments according to two-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). Average weight gain (WG), Daily weight gain (DWG), Average horizontal length gain (HLG), Average vertical length gain (VLG). REACTIVE Treatment (RT): animals reactive. PROACTIVE Treatment (PT): animals proactive. MIXED Treatment (MT): combination of reactive animals (MRT – mixed reactive treatment) and proactive (MPT – mixed proactive treatment).

Table 5. Survival (%) of *Colossoma macropomum* classified by stress coping style after 90 days of entire experiment (Phase 1 and Phase 2).

Treatments	Survival (%)	P-value
Phase 1		
PT	98.21 ± 3.57	1.00
RT	98.21 ± 3.57	
MPT	96.43 ± 7.15	0.16
MRT	85.71 ± 1.66	
Phase 2		
PT	98.21 ± 3.57	0.67
MPT	96.43 ± 7.15	
RT	98.21 ± 3.57	0.08
MRT	85.71 ± 1.66	

Data are similar according to two-way ANOVA ($P > 0.05$). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). REACTIVE Treatment (RT): animals reactive. PROACTIVE Treatment (PT): animals proactive. MIXED Treatment (MT): combination of reactive animals (MRT – mixed reactive treatment) and proactive (MPT – mixed proactive treatment).

Blood tests

After the 90 days of the experiment, hematocrit, hemoglobin, triglycerides and plasma protein did not differ between PT animals and RT animals ($P > 0.05$) (Table 6). Glucose and cholesterol were higher for RT animals compared to PT animals ($P < 0.05$). Plasma cholesterol was also higher for MPT animals compared to MRT animals ($P < 0.05$). Plasma protein was higher for MRT animals compared to MPT animals ($P < 0.05$). On the other hand, there were no differences between MPT and MRT for the other blood variables ($P > 0.05$). Glucose and cholesterol were different for PT compared to MPT ($P < 0.05$), while there were no

differences between these treatments for the other variables ($P > 0.05$). Glucose, cholesterol and plasma protein values were higher for MRT compared to RT ($P < 0.05$).

Table 6. Hematological and biochemical parameters for *Colossoma macropomum* classified by stress coping style after 90 days of experiment.

Treatments	Parameters					
	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g dL ⁻¹)	Glucose (mg dL ⁻¹)	Triglycerides (mg dL ⁻¹)	Cholesterol (mg dL ⁻¹)	Plasma protein (g dL ⁻¹)
PT	24.20 ± 4.24 ^a	6.46 ± 1.83 ^a	28.76 ± 12.34 ^b	272.90 ± 98.36 ^a	139.50 ± 41.57 ^b	5.00 ± 1.40 ^a
RT	23.83 ± 2.96 ^a	6.17 ± 1.45 ^a	38.57 ± 14.01 ^a	274.40 ± 69.21 ^a	181.63 ± 31.06 ^a	5.71 ± 0.63 ^a
<i>P</i> -value	0.85	0.45	0.04	0.96	0.01	0.16
MPT	24.75 ± 4.11 ^a	5.104 ± 1.60 ^a	71.4 ± 45.87 ^a	301.70 ± 126.14 ^a	177.82 ± 23.58 ^a	4.98 ± 0.37 ^b
MRT	24.18 ± 3.16 ^a	5.173 ± 0.86 ^a	58.42 ± 30.67 ^a	220.30 ± 44.48 ^a	126.00 ± 60.13 ^b	5.43 ± 0.37 ^a
<i>P</i> -value	0.71	0.90	0.42	0.05	0.01	<0.001
MPT	24.75 ± 4.11 ^a	5.10 ± 1.60 ^a	71.40 ± 45.87 ^a	301.70 ± 126.14 ^a	177.82 ± 23.58 ^a	5.43 ± 0.37 ^a
PT	24.20 ± 4.24 ^a	6.46 ± 1.83 ^a	28.76 ± 12.34 ^b	272.90 ± 98.36 ^a	139.50 ± 41.57 ^b	5.00 ± 1.40 ^a
<i>P</i> -value	0.761	0.07	<0.001	0.55	0.01	0.31
MRT	24.18 ± 3.16 ^a	5.17 ± 0.86 ^a	58.42 ± 30.67 ^a	220.30 ± 44.48 ^a	58.42 ± 30.67 ^a	5.71 ± 0.63 ^a
RT	23.83 ± 2.96 ^a	6.17 ± 1.45 ^a	38.57 ± 14.01 ^b	274.40 ± 69.21 ^a	38.57 ± 14.01 ^b	4.98 ± 0.37 ^b
<i>P</i> -value	0.81	0.06	0.02	0.06	0.01	<0.001

Different letters in a column indicate a significant difference between treatments according to two-way ANOVA ($p < 0.05$). Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). REACTIVE Treatment (RT): animals reactive. PROACTIVE Treatment (PT): animals proactive. MIXED Treatment (MT): combination of reactive animals (MRT – mixed reactive treatment) and proactive (MPT – mixed proactive treatment).

Discussion

This is the first study to address the stress coping styles of *C. macropomum*, demonstrating direct effects on animal production and physiological response. The new

environment test has previously been used to classify fish as proactive and reactive (Mesquita 2011; Santos et al. 2022) and has been effective at screening several species according to stress coping style, such as *Cyprinus carpio* (Mesquita et al. 2016), *Lophiosilurus alexandri* (Torres et al. 2017) and *Oreochromis niloticus* (Santos et al. 2022).

The present study recorded no mortality in any of the treatments after the 50 days of Phase 1 of the experiment and no differences were found in survival among treatments after 90 days, the end of Phase 2. Although there were no effects on animal survival, the different styles of coping with a given stressor can affect food acquisition and the probability of being preyed upon (Stamps 2007), thus ultimately resulting in changes in survival. Working with larvae of the carnivorous *L. alexandri* classified by stress coping style, Torres et al. (2017) recorded similar survival among treatments with individuals of the same style but lower survival for the mixed treatment due to cannibalism.

Cultivation of the different stress coping styles (PT, RT and MT) did not affect the evaluated performance parameters at the end of 50 days, the end of Phase 1 of the experiment. On the other hand, within MT, MPT animals showed greater performance than MRT animals. Consistent individual differences in growth rate have been noted even when fish are cultivated alone with *ad libitum* feeding and the absence of predators, competitors or parasites (Martins et al. 2005), indicating that these differences are not simply due to social and environmental variation but to stress coping style. The presence of MPT animals probably contributed to reduced feeding by MRT animals, resulting in greater growth for MPT and an uneven lot. When working with olive sole (*Paralichthys olivaceus*), Long et al. (2021) observed that offspring of proactive animals had greater motivation to feed than offspring of reactive animals. Lesser growth for reactive animals when cultivated in the same environment as proactive animals has been described for other species. Heg et al. (2011) observed accelerated growth for proactive females of *Neolamprologus pulcher* when cultivated in the same

environment as conspecific reactive females. When cultivating larvae of *L. alexandri*, Torres et al. (2017) found lower mean weight gain for the mixed stress coping styles treatment compared to non-mixed treatments. Furthermore, studies suggest that proactive individuals have a high level of aggression (Milot et al. 2009; Castanheira et al. 2013), while reactive individuals reduce swimming and exploratory activities when faced with a certain stressful situation, thus presenting a lower level of aggression (Mesquita 2011). Since reactive animals tend to conserve more energy, greater competition for food from MPT individuals may have reduced consumption by MRT individuals. Also, MPT animals had higher WG and DWG compared to PT animals ($P < 0.05$). Certainly, by limiting the growth of MRT animals, MPT animals had a greater availability of space, resulting in higher growth rates compared to PT animals.

Contrary to Phase 1, at the end of Phase 2, PT animals had higher WG and DWG than did RT and MT animals. This finding can be explained by the greater amount of space for growth obtained in Phase 2, or even possible variation in behavior according to the growth of the animals. In addition, there was a change in diet between Phase 1 and Phase 2, from 36% CP to 32% CP. It may be that the proactive fish adapted better to this diet change, in addition to the factors mentioned above. However, this change of diets is common with the growth of animals (Kubitza et al. 1999). These results for Phase 2 are in line with those of Stamps (Stamps 2007), who reported indirect evidence suggesting a link between proactivity and growth, with most studies finding a positive relationship between the two characteristics. Proactive fish often recover their appetite faster after stressful situations (Mas-Muñoz et al. 2011) and have a higher rate of growth than reactive fish (Basic et al. 2012). On the other hand, reactive animals ingest less food than proactive animals (Jolles et al. 2016) and, in general, tend to grow more slowly when together with them (Heg et al. 2011; Mittelbach et al. 2014). These results indicate the importance of classifying according to stress coping style

and its direct application to commercial fish production. However, Behrens et al. (2020) found contrary results for *Neogobius melanostomus*, with less growth of proactive individuals than their reactive conspecifics of the same age. The authors attributed this lower growth rate to the higher standard metabolic rate found for proactive individuals. Thus, studies of different species are necessary for a better understanding of stress coping style classification and its application in the production sector. At the end of Phase 2, the MPT animals continued to perform better than the MRT animals, evidencing the reduced growth of reactive individuals cultivated in the same environment as conspecific proactive individuals. It is common to observe size heterogeneity during the cultivation of *C. macropomum* without stress coping style classification (Santos et al. 2021). WG also remained higher in MPT animals compared to PT animals, thus sustaining the results of Phase 1, indicating the importance of classifying animals and raising them separately in different tanks.

Under stressful conditions, there are hormones that act as glucocorticoids, activating glucose production through gluconeogenesis (secondary response), thereby raising its levels in the bloodstream (Nakano et al. 2014). In view of this, glucose has been used as an important stress indicator since its basal levels are easily measured (Silva et al. 2009). In the present study, RT animals had higher glucose levels than PT animals, which explains the lower growth of the latter. The response of fish to stress is characterized by a series of physiological and biochemical changes, resulting in the release of hormones in the bloodstream (Zahangir et al. 2015). The physiological response of proactive individuals is dominated by the sympathetic nervous system and the release of catecholamines (noradrenaline and adrenaline) in the blood (Koolhaas 2008). On the other hand, the physiological response of reactive animals to stress is dominated by the hypothalamic-pituitary-interrenal axis, whereby the release of glucocorticoids occurs (Andersson et al. 2011), which in turn explains the higher than basal level of glucose in the blood. Higher

cholesterol levels were also observed for RT animals compared PT animals. Since food consumption of both treatments was equal, ingesting the same amount of exogenous cholesterol, it is likely that the results are related to the physiology of the animals with opposite personalities. As higher glucose levels were observed in these RT animals, it is possible that there was also an increase in serum cortisol levels. When evaluating the cortisol levels of zebrafish (*Danio rerio*) in periods of increase and recovery from stress response, Wong et al. (2019) observed higher amounts in reactive individuals in the increase phase compared to proactive individuals. Reactive animals may have a higher demand for basal cholesterol to produce pregnenolone. This steroid hormone is a precursor of cortisol, a hormone that acts as a glucocorticoid, cooperating with the release of glucose (Oba et al. 2009). On the other hand, cholesterol levels in MPT animals were higher than in MRT animals. In this case, the higher levels of cholesterol in the plasma of the proactive animals of the mixed treatment may be the result of higher exogenous consumption.

Stress in fish can increase serum protein levels as changes occur primarily due to changes in plasma volume, which in turn is a consequence of osmotic imbalance (Ranzani-Paiva and Silva-Souza 2004). As a secondary response to stress, there is an increase in muscle protein catabolism and an alteration to plasma amino acid levels (Milligan 2003; Pickering and Pottinger 1995). Thus, the stress presented by MRT individuals was also able to affect plasma protein levels since higher levels were observed for MRT animals compared to MPT animals.

The higher values of glucose, cholesterol and plasma protein of MRT animals compared to RT animals explains the compromised growth performance of the former. The same applies to fish of the MPT treatment, which showed higher levels of cholesterol and glucose compared to PT animals, thus evidencing greater animal stress when cultivated together with conspecifics of the opposite stress coping style.

Conclusions

Stress coping styles have been well recognized in animal production and have shown wide application in fish farming. The cultivation of *C. macropomum* juveniles with different stress coping styles in the same environment in RAS caused a decrease in growth performance of reactive animals, resulting in an unequal lot. Furthermore, proactive and reactive animals cultured together showed greater signs of stress, differing strongly in their physiological and behavioral responses. After 90 days of cultivation, proactive animals raised separately showed better growth performance. In this sense, the culture environment and the needs of the reactive animals must be evaluated in relation to the offered diet and their requirements. The classification of proactive and reactive individuals can be an important tool to improve performance and, consequently, increase productivity and animal welfare of juvenile *C. macropomum*.

Author Contributions:

Camila Oliveira Paranhos: Conceptualization, methodology, software, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, visualization, supervision, project administration, funding acquisition. Caroline Teixeira Bonifácio: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, visualization, visualization. Nathália Soares Ferreira: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, visualization, visualization. Ronald Kennedy Luz: Conceptualization, methodology, software, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, visualization, supervision, project administration, funding acquisition, funding acquisition.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil - Project nº 402952/2021-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil). LUZ, R.K. received a research grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Process 308547/2018-7).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Data availability

Any further data related to the manuscript will be available upon request from the first author.

Declarations

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance and approved by the Institutional Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (protocol code in Animals Use (CEUA -244/2020)).

Consent to participate: All names in the author list have been involved in various stages of experimentation or writing.

Consent for publication: All authors agree to submit the paper for publication in the Tropical Animal Health and Production.

Competing interests : The authors declare no competing interests.

References

- Alderman, S., 2016. Proactive fish, shy: It's all in the metabolism. *Journal of Experimental Biology*, 219, 1937. <https://doi.org/10.1242/jeb.130195>
- Andersson, M.A., Silva, P.I.M., Steffensen, J.F., Hoglund, E., 2011. Effects of maternal stress style on offspring characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Hormones and Behavior*, 60, 699-705. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.09.008>
- Basic, D., Winberg, S., Schjolden, J., Krogdahl, A., Höglund, E., 2012. Context-dependent responses to novelty in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), selected for high and low post-stress cortisol responsiveness. *Physiology & Behavior*, 105, 1175-1181. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.021>
- Behrens, J.W., Von Friesen, L. W., Brodin, T., Ericsson, P., Hirsch, P. E., Persson, A., Sundelin, A., Van Deurs, M., Nilsson, P. A., 2020. Personality and size-related metabolic performance in invasive round goby (*Neogobius melanostomus*). *Physiology & Behavior*, 215, 112777. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112777>
- Boaventura, T. P., Pedras, P.P.C., Santos, F.A.C., Ferreira, A.L., Favero, G.C., Palheta, G.D.A., Melo, N.F.A.C., Luz, R.K., 2021. Cultivation of juvenile *Colossoma macropomum* in different colored tanks in recirculating aquaculture system (RAS): Effects on performance, metabolism and skin pigmentation. *Aquaculture*, 532,736079. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736079>
- Castanheira, M.F., Conceição, L.E.C., Millot, S.; Rey, S., Begout, M.L., Damsgard, B., Kristiansen., T., Hoglund, E., Øverli, Ø., Martins,C.I.M., 2017. Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 9, 23-41. <https://doi.org/10.1111/raq.12100>
- Castanheira, M.F., Herrera,M., Costa,B., Conceição, L.EC., Martins, C.I.M., 2013. Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream *Sparus aurata*: indication of divergent coping styles. *Applied Animal Behaviour Science*, 143, 75-81.

<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.11.008>

Coates, W. D., Hale, R., Morrongiello, J.R., 2019. Dispersal decisions and personality in a freshwater fish. *Animal Behaviour*, 157, 209-218.

<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.07.012>

Colchen, T., Faux, E., Teletchea, F., Pasquet, A., 2017 Is personality of young fish consistent through different behavioural tests? *Applied Animal Behaviour Science* 2017,

194,127-134. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.05.012>

De souza e silva, W., Ferreira, A.L., Do Carmo Neves, L., Ferreira, N.S, Palheta, G.D.A., Takata, R., Luz, R.K. 2021. Effects of stocking density on survival, growth and stress resistance of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in a recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture International*, 2021,29,609-621. <https://doi.org/ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10499-021-00647-z>

Ferreira, A.L., Bonifácio, C.T., de Souza e Silva, W., Takata, R., Favero, G.C., Luz, R. K., 2021. Anesthesia with eugenol and menthol for *Piaractus brachipomus* (Cuvier, 1818): Induction and recovery times, ventilation frequency and hematological and biochemical responses. *Aquaculture*, 544, 737076.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737076>

Frost, A. J., Winrow-Giffen, A., Ashley, P. J., Sneddon, L.U., 2007. Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 333-339.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3751>

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosius, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, 56, 35–39. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>

Guimarães I.G., Martins, G.P., 2015. Exigência nutricional de duas espécies de peixes

- cultivados na Amazônia, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) e *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): uma mini revisão. *Journal of Applied Ichthyology*, 31,57-66. <https://doi.org/10.1111/jai.12976>
- Heg, D., Schürch, R., Rothenberger, S., 2011. Behavioral type and growth rate in a cichlid fish. *Behavioral Ecology*, 22, 1227-1233. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr118>
- Hoglund, E., GjØen, H.M., Pottinger, T.G., Overli, O., 2008. Parental stress-coping styles affect the behaviour of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at early developmental stages. *Journal of Fish Biology*, 73, 1764-1769. <https://doi-org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1095-8649.2008.02068.x>
- Jolles, J.W., Taylor, B.A., Manica, A., 2016. Recent social conditions affect boldness repeatability in individual sticklebacks. *Animal Behaviour*, 112, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.12.010>
- Killen, S. S., Adriaenssens, B., Marras, S., Claireaux, G., Cooke, S. J., 2016. Context dependency of trait repeatability and its relevance for management and conservation of fish populations. *Conservation Physiology*, 4 (1), cow007. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow007>
- King, A.J., Furtbauer, I., Mamuneas, D., James, C., Manica, A., 2013. Sex-differences and temporal consistency in Stickle back fish boldness. *PLoS ONE*, 8(12), 81116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081116>
- Koolhaas, J.M., 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain Behavior, and Immunity*, 22, 662-667. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.11.006>
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster H., De Jong, I.C., Ruis, M.A., Blokhuis, H.J., 1999 Coping styles in animals: current in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 23, 925–

935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
- Kubitza, F., Lovshin, L.L., Ono, E.A., Sampaio, A.V., 1999. Planejamento da produção de peixes. 3 ed. ver. ampliada. Jundiaí: Fernando Kubitza.
- Long, T., Yuan, M., Yuan H., Lu, W., 2021. Heritability of animal individuality in fish: Distribution, behavior, metabolism and stress response. *Aquaculture*, 536, 736415. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736415>
- Martins, C.I.M., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2005. The consistency of individual differences in growth, feed efficiency and feed efficiency in individually housed *Clarias gariepinus* (Burcell 1822) African catfish. *Aquaculture Research*, 36, 1509-1516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01372.x>
- Mas-Muñoz, J., Komen, H., Schneider, O., Visch, S.W., Schrama, J.W., 2011. Feeding Behaviour, Swimming Activity and Boldness Explain Variation in Feed Intake and Growth of Sole (*Solea solea*) Reared in Captivity. *PLoS ONE*, 6, 1-9, e21393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021393>
- Mesquita, F.O. 2011. Coping styles and learning in fish: developing behavioural tools for welfare-friendly aquaculture. PhD thesis, College of medical, veterinary and life sciences, University of Glasgow, Scotland, 2011.
- Mesquita, F.O., Borcato, F.L, Huntingford. F.A., 2015. Cue-based and algorithmic learning in common carp: A possible link to stress coping style. *Behavioural Processes*, 115, 25-29. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.02.017>
- Mesquita, F.O., Torres, I.F.A., Luz, R.K., 2016. Behaviour of proactive and reactive tilapia *Oreochromis niloticus* in a T-maze. *Applied Animal Behaviour Science*, 181, 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.05.022>
- Milligan, C.L., 2003. A regulatory role of cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaun. *Journal of Experimental Biology*, 206, 3167-

3173. <https://doi.org/10.1242/jeb.00538>

Millot, S., Begout, M.L., Chatain, B., 2009. Risk-taking behavior variation over time in sea bass *Dicentrarchus labrax*: effects of day-night alterations, fish phenotypic characteristics and selection for growth. *Journal of Fish Biology*, 75, 1733-1749. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02425.x>

Mittelbach, G.G., Ballew, N.G., Kjelson, M.K., 2014. Fish behavioral types and their ecological consequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71, 1-18. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0558>

Nakano, M., Ogasawara, H., Shimada, T., Yamamoto, K., Ishihama, A., 2014. Involvement of cAMP-CRP in transcription activation and repression of the pck gene encoding PEP carboxykinase, the key enzyme of gluconeogenesis. *FEMS microbiology Letters*, 355 (2), 93-99. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12466>

Oba, E.T., Mariano W.S., Santos L.R.B., 2009 Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias M. (Ed.), *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa: Amapá, Macapá, Brasil. 226-247.

PeixeBR. 2020. Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário da Produção de Pescado no Brasil. Texto Comunicação Corporativa, São Paulo.

Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1995. Biochemical effects of stress. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 5, 349-379. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80043-3)

Planas-Sitjà, I., Deneubourg, J.L., Cronin, A.L., 2021. Variation in personality can substitute for social feedback in coordinated animal movements. *Communications Biology*, 4 (1), 469-469. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01991-9>

Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T., 2004. Hematologia de peixes brasileiros. In:

- Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Perez Lizama, M. de los. (Org.). Sanidade de organismos aquáticos. Editora Varela: São Paulo, Brasil.
- Santos, F.A.C., Julio, G.S.C., Batista, F.S., Miranda, L.N.L., Pedras, P.P.C., Luz, R.K., 2022. High stocking densities in the larviculture of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system: Performance, survival and economic viability. *Aquaculture*, 552,738016. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738016>
- Santos, F.A.C., Júlio, G.S.C., Luz, R.K., 2021. Stocking density in *Colossoma macropomum* larviculture, a freshwater in recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research*, 52, 1185-1191. <https://doi.org/10.1111/are.14976>
- Silva, R.D., Rocha, L.O., Fortes, B.D.A., Rodrigues, C.P.F., Lobo, J.R., Faleiro, M.B.R., De Paula, F.G., Vieira D., 2009. Determinação de glicose plasmática em exemplares adultos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por glicosímetro digital portátil e por método enzimático. Anais 6º congresso de ensino e extensão. Goiânia, Brasil, 5914-5919.
- Stamps, J.A., 2007. Growth-mortality tradeoffs and “personality traits”. *Ecology Letters*, 10(5), 355-363. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01034.x>
- Toms, C.N., Echevarda, D.J., Jouandot, D.J., 2010. A methodological reviews of personality-related studies in fish: focus on the shy-bold axis of behavior. *International Journal of Comparative Psychology*, 23, 1-25. <https://doi.org/10.46867/ijcp.2010.23.01.08>
- Torres, I. F. A., Júlio, G.S.C., Figueiredo, L.G., Lima, N.L.C., Soares, A.P.N., Luz, R.K., 2017. Larviculture of a carnivorous freshwater catfish, *Lophiosilurus alexandri*, screened by personality type. *Behavioural Processes*, 145, 44-47. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.09.001>
- Wilson, D.S., Clark, A.B., Coleman, K., Dearstyne, T., 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 442-446.

[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90134-1)

Wong, R. Y., Jeffrey F., Jacalyn, B.R., 2019. "Differences in Stress Reactivity between Zebrafish with Alternative Stress Coping Styles." *Royal Society Open Science*,6 (5),181797-181797.<https://doi.org/10.1098/rsos.181797>

Woynárovich, A., Van Anrooy, R., 2019. Guia de Campo da Cultura de Tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816. Artigo Técnico de Pesca e Aquicultura da FAO.

Zahangir, M.D.M., Hanque, F, Mostakim, G.M., Islam, M.S., 2015. Secondary stress responses of zebrafish to different pH: Evaluation in seasonal manner. *Aquaculture Reports*, 2, 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.08.008>

Artigo 2

Influência do estilo de enfrentamento ao estresse de *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) na habilidade de aprendizagem em labirinto em T

Influência do estilo de enfrentamento ao estresse de *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) na habilidade de aprendizagem em labirinto em T

Camila Oliveira Paranhos^a, Caroline Teixeira Bonifácio^a, Nathália Ferreira Soares^a, Ronald Kennedy

Luz^{a*}

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Avenida Antônio Carlos, n° 6627, CEP 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brasil

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar se diferenças na habilidade de aprendizagem podem ser explicadas por diferenças no estilo de enfrentamento ao estresse do tambaqui (*Colossoma macropomum*) em labirinto em T. Os animais foram previamente classificados pelos métodos de novo ambiente e latência ao se aproximar de um novo objeto. Foram utilizados 24 animais, sendo 12 animais proativos ($7,78 \pm 2,39$ cm; $7,72 \pm 2,34$ g) e 12 animais reativos ($7,68 \pm 0,51$ cm; $6,98 \pm 1,32$ g). Para o teste de aprendizagem, que durou 15 dias, os animais foram colocados individualmente em um labirinto em forma de T, na qual uma peça de Lego® era colocada dentro de um dos braços do labirinto representando um marcador visual juntamente com pellets de ração, sendo o braço definido por meio de um sorteio diário. Foram avaliados o tempo de latência dos animais ao sair da zona de aclimação, a primeira escolha dos animais, o tempo gasto ao realizar a primeira escolha, o tempo gasto para se alimentar e o tempo ocioso no labirinto em T. Os animais proativos e reativos não conseguiram associar a peça de Lego® ao alimento sugerindo que o estilo de enfrentamento ao estresse não foi capaz de influenciar a aprendizagem associativa desta espécie. Nos dois primeiros dias os animais reativos levaram um tempo maior para sair da zona de aclimação (tempo de latência) em comparação aos animais proativos ($P= 0,0307$). No restante dos dias do experimento, o tempo de latência não diferiu significativamente ($P= 0,5925$).

Não foi observada diferença significativa no tempo gasto para realizar a primeira escolha, no

tempo gasto para se alimentar e no tempo ocioso dos animais proativos e reativos. Não houve nenhuma evidência que relacionasse os estilos de enfrentamento ao estresse a aprendizagem associativa do tambaqui. Porém, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão de como essas variações individuais podem interferir na capacidade cognitiva do *Colossoma macropomum*.

Palavras-chave: Aprendizagem associativa, tambaqui, “coping style”, cognição

1. Introdução

Os mecanismos de resposta ao estresse pelos animais são fundamentais para sua sobrevivência, porém nem todos coespecíficos manifestam respostas semelhantes, diferindo de modo tanto comportamental quanto fisiológico (Castanheira et al., 2017; Demin et al., 2019; Planas-Sitja et al., 2021). Os termos proativos e reativos indicam extremos de um continuum de proatividade que representam o nível de ousadia exibido por um indivíduo diante de uma situação que lhe oferece risco (Alderman, 2016; Baker et al., 2018). Em geral, indivíduos do padrão proativo exibem maiores níveis de agressividade, tendem a explorar ambientes inusitados e se comportam mais ativamente em situações de perigo quando comparados com indivíduos reativos (Martins et al., 2011). As diferenças entre os dois padrões comportamentais podem ser exibidas em vários contextos, incluindo exploração de novos ambientes e objetos, interação com predadores e encontros com rivais (Sih et al., 2004).

A aprendizagem associativa é o processo pelo qual um organismo estabelece uma associação experimentando simultaneamente dois estímulos sensoriais, de modo que a experiência seguinte de um ajude a recordar o outro (Dickinson, 2012). Atualmente, são descritos vários mecanismos de aprendizagem pelos quais os animais conseguem usar a experiência passada para modificar o comportamento. Além disso, de acordo com Kieffer e Colgan (1992), os peixes possuem capacidade em aprender tarefas espaciais que envolvem a adaptação do comportamento a estímulos baseados na marcação visual.

Para avaliar a habilidade cognitiva de um animal, o labirinto em T pode ser usado em uma variedade de maneiras (Gould, 2011) podendo admitir outras formas, como labirinto em Y (Adeyemi et al., 2010) e em formato de cruz (Gaikwad et al., 2011). O labirinto é um aparato utilizado na ciência comportamental que pode ser empregado para investigar a capacidade de alternância como uma medida de memória (Tierney e Lee, 2011). Segundo Lamb et al. (2012) o labirinto em T é uma valiosa ferramenta de avaliação nos estudos de

aprendizado e memória podendo, também, ser empregado para avaliar o comportamento através de choque, drogas, cores ou discriminação apetitiva. Em geral, podemos afirmar que a avaliação da capacidade de aprendizado em peixes nos permite compreender distintas formas de condicionamento, estratégias de sobrevivência e comunicação social entre os mesmos. Diante disso, pode ser uma importante alternativa de estudo para melhor compreensão das preferências naturais dos animais e implementá-las nas práticas de manejo na aquicultura.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), é uma espécie nativa da bacia do Rio Amazonas, considerada a segunda espécie mais produzida comercialmente no Brasil (PeixeBR, 2022). Sua aceitação é devido as suas excelentes características para uso na aquicultura: é onívora, bem adaptada a condições de cativeiro, aceita com facilidade dietas artificiais e apresenta boas taxas de conversão alimentar (Tavares-Dias et al., 2011; Ribeiro et al., 2016), sendo das nativas a que apresenta melhor desempenho (Santos et al., 2021). A espécie também é muito bem aceita para consumo em outros países da América do Sul como Colômbia, Peru e Venezuela (Woynárovich e Anrooy, 2019).

Estudos indicam que os estilos de enfrentamento proativo e reativo ao estresse diferem no processamento de informações, na tomada de decisões e nas capacidades de aprendizado e memória (Kieffer e Colgan, 1992). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar se diferenças na habilidade de aprendizagem podem ser explicadas por diferenças no estilo de enfrentamento ao estresse do *C. macropomum* em labirinto em T.

2. Material e métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da UFMG. Os manejos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo n° 240/2021). O estudo foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, totalizando dois tratamentos, com 12 repetições cada.

2.1 Classificação em animais proativos e reativos

Foram utilizados *C. macropomum* de aproximadamente 8 g de peso e 7 cm de comprimento, produzidos no próprio Laboratório, para serem classificados em proativos e reativos. Os animais foram mantidos em uma caixa de 1000 L mantida em sistema de recirculação de água com filtro mecânico, biológico, sistema de aeração suplementar e de controle de temperatura, até o momento de classificação. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial contendo 46% de proteína bruta, 1,2 a 1,8 mm com 8% de extrato etéreo e energia digestível de 3600 kcal kg⁻¹, de acordo com dados do fabricante. Para realizar a triagem dos animais, foi realizado o método de novo ambiente (Mesquita et al., 2016) e posteriormente o método de latência ao se aproximar de um novo objeto (Pasquet et al., 2016; Colchen et al., 2017).

2.2 Método de novo ambiente

Para a classificação do estilo de enfrentamento ao estresse dos animais, utilizou-se um tanque-teste (80 x 50 x 46 cm), preenchido até a marca de 35 cm, totalizando 140 litros de água (Fig. 1) e dividido em uma zona escura e uma zona clara. Para isso, em uma das extremidades do tanque foi construída uma câmara escura, com medidas 26,5 x 50 x 46 cm e coberta com lona para impedir a entrada de luz. O ambiente iluminado foi separado da câmara escura por uma divisória, na qual foi feito um corte circular na altura de 9,5 cm do fundo do tanque. Um túnel transparente com 6 cm de comprimento e diâmetro de 8,5 cm foi acoplado ao corte circular, impossibilitando o retorno dos animais após a passagem de ambiente. A entrada do túnel possuía um tipo de porta para bloquear o acesso dos animais da zona escura para a zona iluminada até o término da aclimatação. Na extremidade iluminada, foi colocada uma lâmpada fluorescente (670 lux) e um aquecedor com termostato, mantendo a temperatura

da água em 28°C (Mesquita et al., 2016).

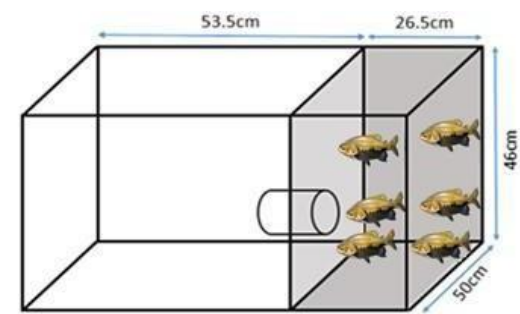


Figura 1. Desenho esquemático do tanque-teste para a classificação dos animais em proativos e reativos.

Para realizar a classificação do estilo de enfrentamento ao estresse, os animais foram privados de alimento por um período de 48 horas anteriormente à triagem, para o esvaziamento do trato gastrointestinal (Mesquita et al., 2016). A princípio, oito animais foram colocados na câmara escura, onde permaneceram sob aclimação por 10 minutos antes de terem acesso ao ambiente iluminado. Após o período de aclimação, pellets de ração foram colocados na extremidade oposta à câmara escura para promover o estímulo olfatório dos peixes e a porta de acesso entre os ambientes foi aberta, permitindo a passagem dos animais do ambiente escuro para o ambiente claro. Ao final de 30 minutos o acesso foi fechado. Desta forma, os animais que permaneceram na câmara escura foram classificados como reativos e aqueles encontrados em ambiente claro foram classificados como proativos. O teste foi repetido até se obter 50 animais proativos e 50 reativos.

Após o teste, os animais foram alocados separadamente por estilo de enfrentamento em dois tanques de 1000 L, como descrito anteriormente, com 80% do volume preenchido.

2.3 Método de latência ao se aproximar de um novo objeto

Após 48 horas da primeira classificação, foi realizada uma segunda triagem com os mesmos animais selecionados pelo método de novo ambiente. O método com base na latência ao se aproximar de um novo objeto consiste na classificação dos animais por meio da observação de seu comportamento ao avistar um novo objeto.

Para este método, foi utilizada uma canaleta retangular (97 x 27 x 21 cm), com volume útil de 17L (Fig.2). Foi separada cerca de 1/6 da canaleta (17 x 27 x 21 cm), por meio de um divisor de isopor para aclimatar os animais. Na extremidade oposta à zona de aclimação, foi posicionado um Lego® de coloração vermelha, disposto no centro do recipiente.

Os animais eram colocados individualmente na zona de aclimação por um período de 5 minutos. Posteriormente, o divisor era aberto e o comportamento dos peixes observado por 20 minutos. Os animais que permaneceram durante todo o período de classificação na zona de aclimação foram automaticamente classificados como animais reativos e os animais que se aproximaram a pelo menos 5 cm do objeto proativos.

Deste teste, foram selecionados os animais que foram classificados pelo mesmo estilo de enfrentamento ao estresse nos dois métodos realizados.

Para o aprendizado em labirinto em T, foram utilizados 24 animais, sendo 12 animais proativos ($7,78 \pm 2,39$ cm; $7,72 \pm 2,34$ g) e 12 animais reativos ($7,68 \pm 0,51$ cm; $6,98 \pm 1,32$ g). Após a classificação dos animais, os peixes retornaram para os tanques de 1000L, onde foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 16:00) com ração comercial contendo 460,0 g kg^{-1} de proteína bruta e com 1-2 mm de diâmetro, durante 5 dias.

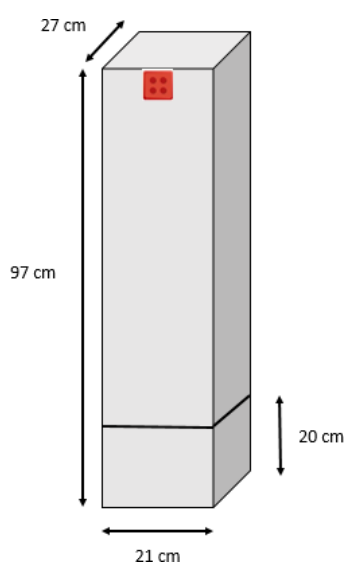


Figura 2. Desenho esquemático da canaleta utilizada para classificação dos animais em proativos e reativos, adaptado de Pasquet et al. (2016).

2.4 Sessão de reconhecimento em labirinto em T

Durante dois dias anteriores ao teste de aprendizado, os animais foram direcionados individualmente ao labirinto para uma sessão de reconhecimento. O labirinto em T utilizado teve suas paredes revestidas por um papel plástico opaco branco, com o corredor principal e os braços laterais medindo 49 e 29 cm de comprimento, respectivamente, e 20 cm de altura e 14 cm de largura (fig. 3).

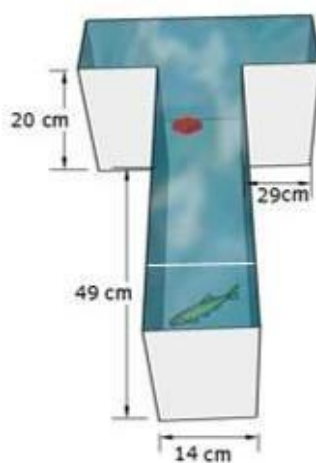


Figura 3. Desenho esquemático do labirinto em T.

A sessão de reconhecimento foi realizada para habituar os peixes ao labirinto em T e reduzir qualquer neofobia produzida pela exposição ao novo ambiente (Luchiari, 2016). Para isso, os animais foram submetidos a um jejum de 24 horas, e os tanques sorteados para que os animais pudessem ser capturados individualmente e colocados na zona de aclimação (caixa de partida) do labirinto em T, onde foram mantidos por cinco minutos. Durante o período de aclimação, os animais foram mantidos na caixa de partida com parede opaca removível de forma que ficassem sem contato visual externo com o restante do labirinto. Após os cinco minutos, a parede opaca foi removida para permitir o acesso ao restante (braços) do labirinto sem a presença de alimentos ou objetos por um período de 15 minutos. Todos os animais foram alimentados ao final do dia, após o término da sessão de reconhecimento. Esse procedimento foi repetidos ao longo dos dois dias anteriores ao teste de aprendizagem.

2.5 Aprendizado em labirinto em T de indivíduos proativos e reativos (primeira escolha)

Para o teste de aprendizagem, cada animal foi alocado individualmente ao labirinto em T, assim como descrito na sessão de reconhecimento. Antes do primeiro dia do teste, os animais foram submetidos a 24 horas de jejum. Uma peça de Lego® era colocada dentro de um dos braços do labirinto representando um marcador visual juntamente com pellets de ração, sendo o braço definido por meio de um sorteio diário. Os peixes foram colocados na zona de aclimação e após 5 minutos foram liberados para explorar o labirinto, momento em que foi observado o tempo e o comportamento dos animais. Durante os 15 minutos de observação, cada peixe foi analisado e o seu comportamento descrito na Tabela 1. Foram registrados: tempo de latência, a primeira escolha, tempo na primeira escolha, tempo em que o animal permaneceu na primeira escolha, tempo de ócio e tempo que o animal levou para se alimentar. Quando o peixe optava pelo braço com alimento como primeira escolha, foi

quantificado o tempo que o peixe levava para se alimentar. Também foi contabilizado os números de associações entre o marcador visual e o alimento, quando o braço com a peça de Lego® foi a primeira escolha realizada. Os animais foram alimentados uma vez ao dia, quando retornaram do labirinto em T. Foi utilizada ração comercial de 1,2 a 1,8 mm com 46% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e energia digestível de 3600 kcal kg⁻¹, de acordo com o rótulo da fabricante. O fotoperíodo utilizado foi de 12L:12E utilizando um temporizador automático. Cada animal foi treinado por 15 dias consecutivos, efetuando um teste por dia e esse manejo repetido ao longo dos dias de teste de aprendizagem.

Tabela 1. Variáveis comportamentais de *Colossoma macropomun* (n=12 por estilo de enfrentamento ao estresse), adaptado de Bonifacio et al., (2022).

Comportamento	Descrição
Tempo de latência	Tempo necessário para sair da zona de aclimação.
Tempo gasto para fazer a primeira escolha	Tempo decorrido entre sair da zona de aclimação e escolher um dos braços do labirinto em T (esquerda ou direita).
Tempo gasto para se alimentar	Tempo necessário para consumir a ração
Tempo gasto ocioso	Quantidade de tempo em que os peixes ficaram ociosos no labirinto em T, sem nenhuma função aparente.
Primeira escolha	Primeiro braço do labirinto em T visitado pelo peixe, o braço contendo Lego® e comida ou o braço vazio.

2.6 Qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água dos tanques de manutenção foram aferidos quatro vezes na semana antes do primeiro peixe ir ao labirinto. Os níveis de oxigênio dissolvido se

mantiveram acima de 5 mg L⁻¹, o pH 7,9±0,35, a temperatura 26,9±0,4°C e amônia total foi de 0 mg L⁻¹ nos tanques de manutenção. O oxigênio dissolvido foi aferido utilizando um oxímetro Politerm modelo POL-69. O pH e a temperatura foram aferidos utilizando um pHâmetro Hanna Instruments modelo Combo pH & EC. A para medição da amônia total foi utilizado um teste colorimétrico (Alfakit).

2.7 Estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e 12 repetições por tratamento. Os dados obtidos das observações comportamentais foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e ao teste de Barlett para a verificação da homocedasticidade, seguido do teste não paramétrico Mann-Whitney ao nível de 5% de significância. Os números de associações entre a peça de Lego® e alimento durante o teste de aprendizagem foi analisado pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$). Para realização das análises dos dados foi utilizado o software R na versão 4.1.0.

3. Resultados

3.1 Habilidade de aprendizagem de animais proativos e reativos

Tanto os animais proativos como os reativos não conseguiram associar o marcador visual (Lego®) ao alimento fornecido ($P = 0,616$) como primeira escolha. Quando comparados separadamente, a primeira escolha foi maior em ambos os grupos pelo lado vazio ($P < 0,001$), oposto ao marcador visual (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de animais que associaram o marco visual e ao alimento.

Associação entre o marco visual e o alimento			
Tratamento	SIM	NÃO	P-valor
Proativo	68,00±2,84 ^{Ab}	103,00±2,85 ^{Aa}	<0,001
Reativo	65,00±1,92 ^{Ab}	110,00±1,88 ^{Aa}	
P-valor	0,616		

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Qui-quadrado, $P < 0,05$). Letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre o total de animais que associaram ou não o marcador visual ao alimento (teste de quiquadrado, $P < 0,05$). Valores expressos como média e desvio padrão (DP).

Nos dois primeiros dias os animais reativos levaram um tempo maior para sair da zona de aclimatação (tempo de latência) em comparação aos animais proativos ($P = 0,0307$). No restante dos dias do experimento, o tempo de latência não diferiu significativamente ($P = 0,5925$) (fig. 4).

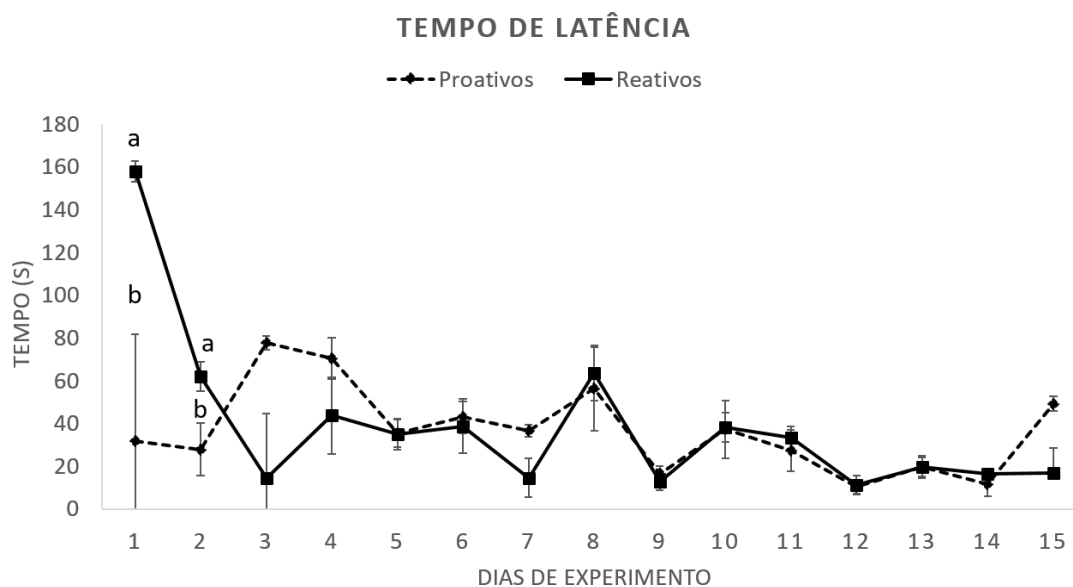


Figura 4. Tempo (segundos) (média ± erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* gastaram para sair da zona de aclimatação (Latência) no teste de aprendizado do labirinto em T. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste

de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Os animais proativos e reativos levaram tempos similares para realizar a primeira escolha entre o marcador visual (Lego®) e o ambiente vazio ao longo dos dias do experimento ($P = 0,4739$) (fig. 5).

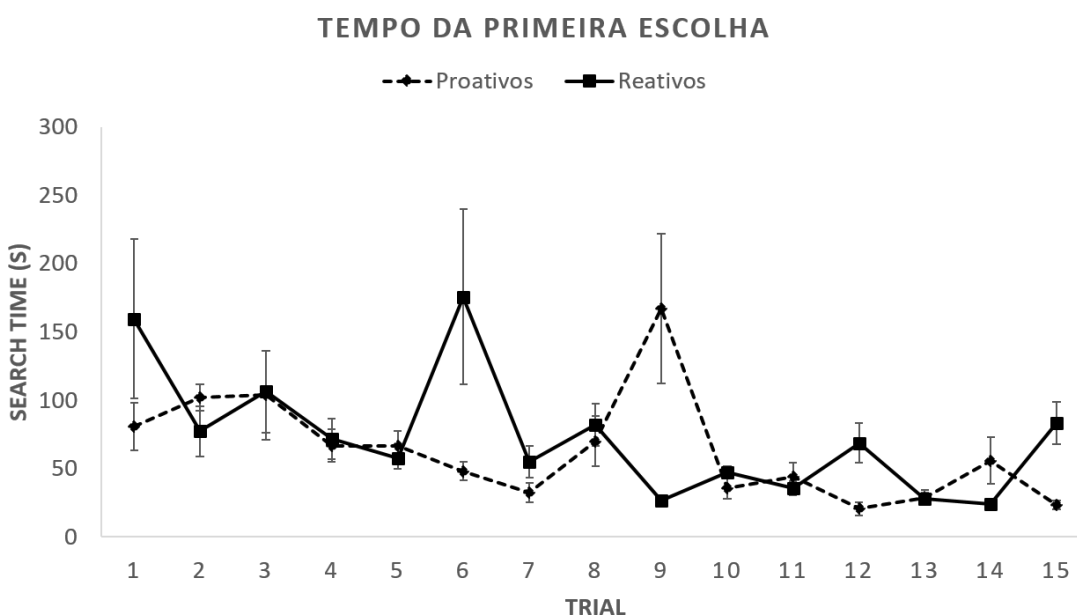


Figura 5. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* gastaram para realizar sua primeira escolha entre o marcador visual (Lego®) e o ambiente vazio no teste de aprendizado do labirinto em T.

O tempo que foi gasto para os indivíduos proativos e reativos se alimentarem também não diferiu significativamente ($P = 0,4373$) quando comparado ao longo dos dias do experimento (fig. 6). Do dia 12 ao dia 14 foi observado maior tempo de indivíduos reativos para consumir o alimento ($P = 0,0337$), porém, voltaram a apresentar tempos similares no dia 15 ($P = 0,2708$).

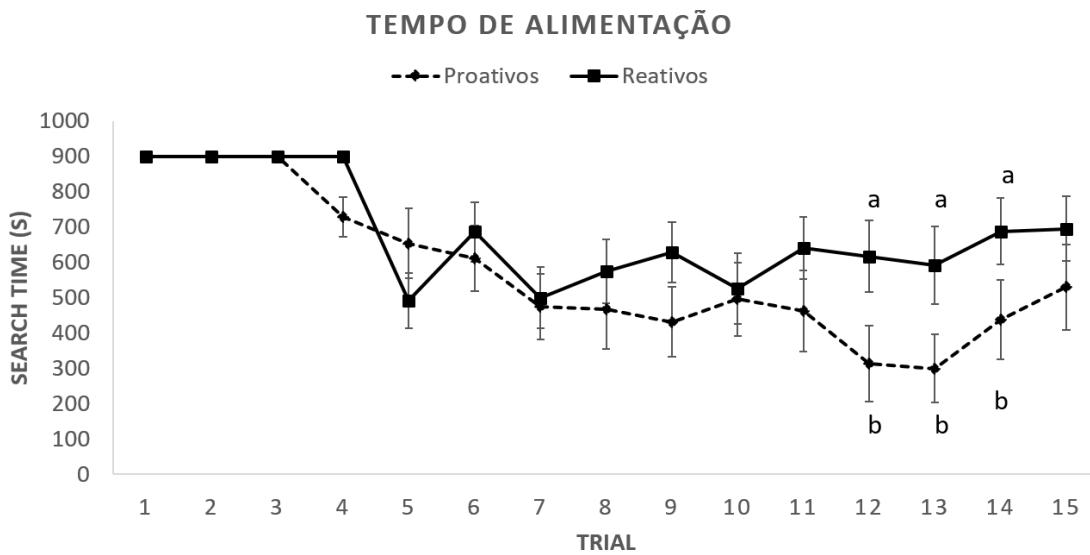


Figura 6. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* gastaram para se alimentarem no teste de aprendizado do labirinto em T. Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$)

O tempo em que os animais proativos e reativos apresentaram comportamento ocioso também não diferiu ao longo dos dias do experimento ($P = 0,4772$) (fig. 7).

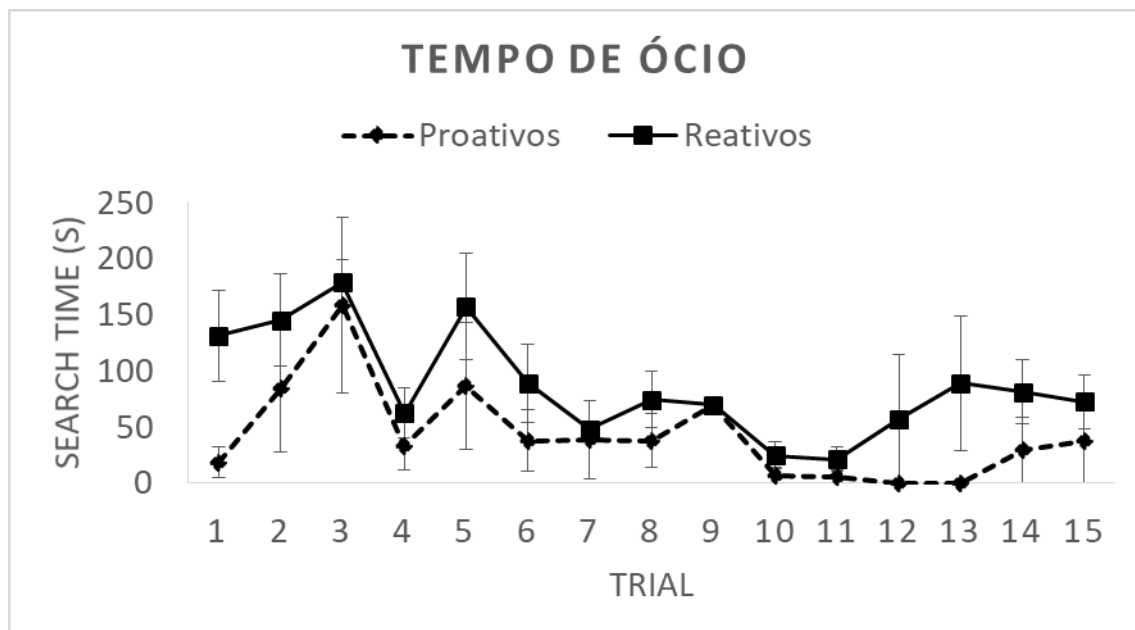


Figura 7. Tempo (segundos) (média \pm erro padrão) em que os indivíduos proativos e reativos de *Colossoma macropomum* ficaram ociosos no teste de aprendizado do labirinto em T.

4. Discussão

Os animais classificados como proativos e reativos de *C. macropomum* não conseguiram associar o marcador visual (Lego®) ao alimento fornecido ao longo dos dias do experimento. Portanto, o presente estudo sugere que o estilo de enfrentamento ao estresse não foi capaz de influenciar a aprendizagem associativa desta espécie.

Estudos recentes têm demonstrado sucesso na aprendizagem associativa em várias espécies como *Oreochromis niloticus* (Mesquita et al., 2016; Torres et al., 2018), *Poecilia reticulata* (Lucon-Xiccato e Bisazza, 2017; Petrazzini et al., 2017), *Aulonocara nyassae* (Bonifacio et al., 2022), *Danio rerio* (Babkiewicz et al., 2021), entre outros. No entanto, ainda são escassos os estudos que visam relacionar os processos cognitivos ao estilo de enfrentamento ao estresse dos indivíduos (Griffin et al., 2015). De acordo com Brown e Braithwaite (2005), a capacidade cognitiva diminui com medidas crescentes de proatividade. White et al. (2017) também encontraram uma relação negativa entre a ousadia e o aprendizado da truta (*Salvelinus fontinalis*), sugerindo a presença de diferentes estratégias de aprendizado e memória que auxiliam os animais a localizar e rastrear recursos em seu ambiente.

Quando avaliada a primeira escolha dos animais, independente do seu estilo de enfrentamento ao estresse, juvenis de *C. macropomum* mostraram uma preferência maior pelo lado vazio. A cadeia estímulo-resposta iniciada no processo de aprendizagem espacial no teste do labirinto em T enquadra-se em um condicionamento pavloviano clássico (aprendizagem associativa) em que há a associação de estímulos neutros e um significativo para o animal, podendo ele ser positivo ou negativo (Gould, 2010). Pode ser que no presente estudo os animais tenham associado o marcador visual (Lego®) não como uma recompensa positiva mas como uma possível ameaça, dificultando o acesso dos animais ao alimento. Segundo Dukas (2002) o processamento das informações do ambiente ao redor, pode ser prejudicada

no momento em que os animais precisam dividir sua atenção entre tarefas simultâneas, como competir por um alimento ou ficar atento a um possível predador.

Nos dois primeiros dias os animais reativos levaram um tempo maior para sair da zona de aclimatação em comparação aos proativos. De uma maneira geral, os animais reativos são descritos como indivíduos que possuem uma menor atividade natatória e conservam mais energia (Mesquita et al., 2015), evitam riscos além de permanecem imóveis quando submetidos a novos ambientes (Castanheira et al., 2013). Portanto, é provável que esse comportamento distinto dos animais nos dias iniciais esteja relacionado com o seu estilo de enfrentamento ao estresse.

A partir do terceiro dia, os animais proativos e reativos não diferiram no período de latência ao sair da zona de aclimatação, apresentando tempos bem inferiores aos primeiros dias. Mesquita et al. (2016) também observaram uma redução da latência para sair da área inicial ao longo do treinamento no labirinto em T, para ambas as estratégias de enfrentamento ao estresse de *O. niloticus*, sugerindo que os peixes se adaptaram às condições ambientais ao longo do tempo. Outros estudos também têm relatado diminuição no tempo de latência ao longo do tempo com outras espécies como *P. reticulata* (Swaney et al., 2001), *Salmo salar* (Vaz-Serrano et al., 2011) e *A. nyassae* (Bonifacio et al., 2022). Segundo Torres et al. (2018), o tempo de latência pode variar e essa indica que o aprendizado depende tanto da espécie quanto das condições ambientais.

Os animais proativos e reativos levaram tempos similares para realizar a primeira escolha entre o marcador visual (Lego®) e o ambiente vazio. Além disso, também não diferiram no tempo gasto para se alimentar. Como os animais não conseguiram associar o marcador ao alimento esses resultados já eram esperados e reforçam a evidência da falta de relação entre o estilo de enfrentamento ao estresse e a aprendizagem associativa do *C. macropomum*. Diferentes resultados foram encontrados por Mesquita et al. (2016) ao

trabalharem com *O. niloticus*. Os autores observaram que os peixes proativos se adaptaram melhor ao treinamento no labirinto em T do que os peixes reativos, apresentando um tempo de busca ao alimento superior. Por outro lado, White et al. (2017), ao investigar a influência do estilo de enfrentamento ao estresse na capacidade de aprendizado espacial da truta *S. fontinalis* em um labirinto de quatro braços encenado com pistas visuais, os animais proativos tiveram menor sucesso em localizar o alimento. Os animais proativos apresentam como característica a tendência a explorar ambientes desconhecidos e assumir riscos (Castanheira et al., 2013; Colchen et al., 2017). É possível que esses indivíduos explorem o ambiente de forma aleatória, independente de pistas ou apenas inspecionem o ambiente de forma superficial assimilando o mínimo de informações e gastando um tempo maior para a realização das tarefas. Já os indivíduos reativos, geralmente demoram um tempo maior para assimilar informações e se tornam mais eficientes (Sih e Del Giudice, 2012). Tais estudos sugerem, portanto, que a influência das diferenças individuais e o aprendizado dos animais também podem variar de acordo com a espécie e o ambiente em que estão inseridos.

O tempo em que os animais proativos e reativos apresentaram comportamento ocioso também não diferiu ao longo dos dias do experimento. As diferenças nas duas estratégias de enfrentamento ao estresse são observadas em vários contextos como, por exemplo ao explorar um ambiente inusitado. Provavelmente, o comportamento ocioso dos animais foram similares por não se tratar de um ambiente inédito uma vez que a sessão de reconhecimento do labirinto em T foi realizada no intuito de reduzir qualquer neofobia produzida pela exposição ao ambiente inusitado (Luchiari, 2016). Este é o primeiro estudo que visa relacionar a aprendizagem associativa com a estratégia de enfrentamento ao estresse do *C. macropomun*. Portanto, mais estudos com a espécie são necessários para uma melhor compreensão de como essas variações individuais podem interferir na capacidade cognitiva dos animais e de que maneira podemos utilizar esses achados para adequá-los em boas práticas de manejo na

aquacultura.

5. Conclusões

Juvenis de *C. macropomum* classificados como proativos e reativos não conseguiram associar o marcador visual (Lego®) ao alimento fornecido ao longo dos dias do experimento. Os animais, independente do estilo de enfrentamento ao estresse, preferiram o braço vazio, provavelmente por identificarem o marcador visual (Lego®) a uma possível ameaça. Portanto, não foi observada nenhuma evidência que relacione os estilos de enfrentamento ao estresse a aprendizagem associativa dos animais. Porém mais estudos são necessários para uma melhor compreensão de como essas variações individuais podem interferir na capacidade cognitiva do *Colossoma macropomum*.

Referências

- Adeyemi, O.O., Akindele, A.J., Yemitan, O.K., Aigbe, F.R., Fagbo, F.I., 2010. Anticonvulsant, anxiolytic and sedative activities of the aqueous root extract of *Securidaca longepedunculata* Fresen. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 191-195.
- Alderman, S., 2016. Bold fish, shy fish: it's all in the metabolism. *Journal of Experimental Biology* 219, 1937-1937.
- Babkiewicz, E., Surga, K., Gliwicz, Z.M., Maszczyk, P., 2021. The effect of temperature on the spatial learning rate of zebrafish (*Danio rerio*). *Ethology* 127, 632-642.
- Baker, M.R., Goodman, A.C., Santo, J.B., Wong, R.Y., 2018. Repeatability and reliability of exploratory behavior in proactive and reactive zebrafish, *Danio rerio*. *Scientific Reports* 8.

- Bonifacio, C.T., Paranhos, C.O., Torres, I.F.A., Luz, R.K., 2022. Association learning and preference of females and males of the blue orchid, *Aulonocara nyassae* Regan, 1922 in a T-maze. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 55, 145-158.
- Brown, C., Braithwaite, V.A., 2005. Effects of predation pressure on the cognitive ability of the poeciliid *Brachyraphis episcopi*. *Behavioral Ecology* 16, 482-487.
- Castanheira, M.F., Conceicao, L.E.C., Millot, S., Rey, S., Begout, M.L., Damsgard, B., Kristiansen, T., Hoglund, E., Overli, O., Martins, C.I.M., 2017. Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 9, 23-41.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceicao, L.E.C., Martins, C.I.M., 2013. Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream *Sparus aurata*: Indication of divergent coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* 143, 75-81.
- Colchen, T., Faux, E., Teletchea, F., Pasquet, A., 2017. Is personality of young fish consistent through different behavioural tests? *Applied Animal Behaviour Science* 194, 127-134.
- Demin, K.A., Lakstygala, A.M., Alekseeva, P.A., Sysoev, M., de Abreu, M.S., Alpyshov, E.T., Serikuly, N., Wang, D.M., Wang, M.Y., Tang, Z.C., Yan, D.N., Strekalova, T.V., Volgin, A.D., Arnstislayskaya, T.G., Wang, J.J., Song, C., Kalueff, A.V., 2019. The role of intraspecies variation in fish neurobehavioral and neuropharmacological phenotypes in aquatic models. *Aquatic Toxicology* 210, 44-55.
- Dickinson, A., 2012. Associative learning and animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 367, 2733-2742.
- Dukas, R., 2002. Consequências comportamentais e ecológicas da atenção limitada. *Proceedings B of the Royal Society's flagship biological* 357, 1539-1547.

- Gaikwad, S., Stewart, A., Hart, P., Wong, K., Piet, V., Cachat, J., Kalueff, A.V., 2011. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. *Behavioural Processes* 87, 224-230.
- Griffin, A.S., Guillette, L.M., Healy, S.D., 2015. Cognition and personality: an analysis of an emerging field. *Trends in Ecology & Evolution* 30, 207-214.
- Gould, G.G., 2011. Modified Associative Learning T-Maze Test for Zebrafish (*Danio rerio*) and Other Small Teleost Fish. In: Kalueff, A., Cachat, J. (eds) *Zebrafish Neurobehavioral Protocols. Neuromethods*, 51.
- Kieffer, James D., Patrick W. Colgan., 1992. The Role of Learning in Fish Behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2.2, 125-43.
- Lamb, E.A., Echevarria, D.J., Jouandot, D.J., 2012. The utility of the T-maze in assessing learning, memory, and models of neurological disorders in the zebrafish. *Behaviour* 149, 1081-1097.
- Luchiari, A.C., 2016. How Betta splendens finds its way. *Behavioural Processes* 124, 47-51.
- Lucon-Xiccato, T., Bisazza, A., 2017. Complex maze learning by fish. *Animal Behaviour* 125, 69-75.
- Martins, C.I.M., Silva, P.I.M., Conceicao, L.E.C., Costas, B., Hoglund, E., Overli, O., Schrama, J.W., 2011. Linking Fearfulness and Coping Styles in Fish. *Plos One* 6.
- Mesquita, F.O., Borcato, F.L., Huntingford, F.A., 2015. Cue-based and algorithmic learning in common carp: A possible link to stress coping style. *Behavioural Processes* 115, 25-29.
- Mesquita, F.O., Torres, I.F.A., Luz, R.K., 2016. Behaviour of proactive and reactive tilapia *Oreochromis niloticus* in a T-maze. *Applied Animal Behaviour Science* 181, 200-204.

Pasquet, A., Sebastian, A., Begout, M.L., LeDore, Y., Teletchea, F., Fontaine, P., 2016. First insight into personality traits in Northern pike (*Esox lucius*) larvae: a basis for behavioural studies of early life stages. *Environmental Biology of Fishes* 99, 105-115.

PEIXEBR. Anuário PeixeBR da Piscicultura. 2022. <https://www.peixebr.com.br/anuario-2022/>. (acessado em 20 dez 2022).

Petrazzini, M.E.M., Bisazza, A., Agrillo, C., Lucon-Xiccato, T., 2017. Sex differences in discrimination reversal learning in the guppy. *Animal Cognition* 20, 1081-1091.

Planas-Sitja, I., Deneubourg, J.L., Cronin, A.L., 2021. Variation in personality can substitute for social feedback in coordinated animal movements. *Communications Biology* 4.

Ribeiro, F.M., Freitas, P.V.D.X., dos Santos, E.O., de Sousa, R.M., Carvalho, T.A., de Almeida, E.M., Costa, A.C., 2016. Alimentação e nutrição de pirapitinga (*Piaractus brachypomums*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*): Revisão. *Pubvet* , 10, 873-945.

Santos, F.A.C., Julio, G.D.S., Luz, R.K., 2021. Stocking density in *Colossoma macropomum* larviculture, a freshwater fish, in recirculating aquaculture system. *Aquaculture Research* 52, 1185-1191.

Sih, A., Del Giudice, M., 2012. Linking behavioural syndromes and cognition: a behavioural ecology perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 1603, 2762-2772.

Sih, A., Bell, A.M., Johnson, J.C., Ziemba, R.E., 2004. Behavioral syndromes: An integrative overview. *Quarterly Review of Biology* 79, 241-277.

Swaney, W., Kendal, J., Capon, H., Brown, C., Laland, K.N., 2001. Familiarity facilitates social learning of foraging behaviour in the guppy. *Animal Behaviour* 62, 591-598.

Tavares-Dias, M., 2011. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. Embrapa Amapá-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA- E).

Tierney, A.J., Lee, J., 2011. Spatial Learning in a T-Maze by the Crayfish *Orconectes rusticus*. Journal of Comparative Psychology 125, 31-39.

Torres, I.F.A., Ferreira, A.D., Silva, W.D.E., Mesquita, F.O., Luz, R.K., 2018. Effect of environmental color on learning of Nile tilapia. Applied Animal Behaviour Science 209, 104-108.

Vaz-Serrano, J., Ruiz-Gomez, M.L., Gjoen, H.M., Skov, P.V., Huntingford, F.A., Overli, O., Hoglund, E., 2011. Consistent boldness behaviour in early emerging fry of domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar*): Decoupling of behavioural and physiological traits of the proactive stress coping style. Physiology & Behavior 103, 359-364.

White, S.L., Wagner, T., Gowan, C., Braithwaite, V.A., 2017. Can personality predict individual differences in brook trout spatial learning ability? Behavioural Processes 141, 220-228.

Wojnárovich, A.; Van Anrooy, R., 2019. Field guide to the culture of tambaqui *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816. Rome.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos estudos mostraram que o cultivo de juvenis de *C. macropomum* com diferentes estilos de enfrentamento ao estresse em um mesmo ambiente em RAS provocou diminuição no desempenho dos animais reativos, além de que animais proativos e reativos quando criados juntos mostraram maiores condições de estresse. Porém, não houve nenhuma evidência que diferencie a habilidade de aprendizagem de diferentes estratégias de enfrentamento ao estresse do *C. macropomum*. A classificação por estilo de enfrentamento do estresse pode ser uma ferramenta importante para melhorar a produtividade e o bem-estar animal. Porém, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão de como essas variações individuais podem afetar a produção animal.