

Bem-estar em peixes na aquacultura: os efeitos do contacto físico nas respostas dos peixes ao stress

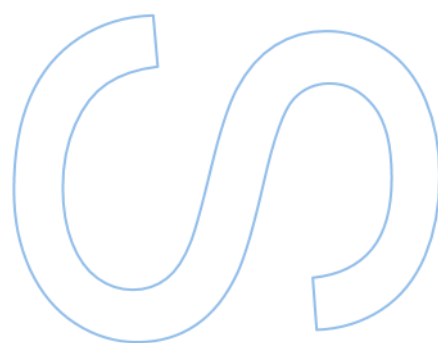
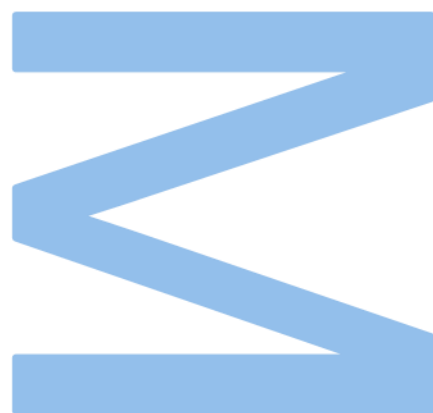
Júlia Côrtes Macieira

Mestrado em Ecologia e Ambiente

Departamento de Biologia

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2024



Bem-estar em peixes na aquacultura: os efeitos do contacto físico nas respostas dos peixes ao stress

Júlia Côrtes Macieira

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Ecologia e Ambiente

Departamento de Biologia
2024

Orientadora

Marta Soares, Investigadora Auxiliar, CIBIO-BIOPOLIS,
Universidade do Porto

Coorientadoras

Margarida Saavedra, Investigadora Auxiliar, IPMA
Eliane Gonçalves de Freitas, Professora Associada, Universidade
Estadual Paulista, UNESP

U. PORTO



Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a minha mãe que me deu a oportunidade de realizar esse estudo e vir para outro país para tirar este mestrado, além de todo apoio financeiro. Agradeço muito as minhas orientadoras Doutora. Marta Soares (CIBIO-BIOPOLIS, Universidade do Porto), Doutora Margarida Saavedra (IPMA) e Professora Dra. Eliane Gonçalves de Freitas (UNESP), por todo o apoio. Muito obrigada por estarem sempre em acompanhamento direto. Agradeço muito também a Doutora. Ana Gauy (UNESP) que me acompanhou e ajudou em todas as fases desta Tese. Um agradecimento ao Prof. Dr. Manuel Gesto e Bianca Cambiaghi que realizaram as análises dos cérebros na Dinamarca. E também preciso agradecer muito a Doutora Ana Couto que doou seu tempo para me ajudar as análises de composição proximal e muito apoio em conversas e dúvidas. E um enorme obrigada a toda a equipa do Aquário Vasco da Gama especialmente, ao Diretor, Capitão-de-fragata Nuno Galhardo Leitão, a subdiretora Comandante Maria Martins e a Dra. Fátima Gil, que além de me deixar usar o espaço deles de trabalho para realizar as experiências por 6 meses, também me acolheram como se fosse da casa. E por último, mas não menos importante, meu namorado, Luis, que embarcou nas aventuras dessa tese, acreditou em mim, largou o trabalho sem pestanejar e mudou-se para Lisboa junto comigo durante as experiências.

Esta tese foi financiada por uma *Small Research Grant* da *Fisheries Society of the British Isles* concedida à Doutora Sónia Cardoso (“Behavioural and physiological trade-offs between native and invasive fish species”). As licenças éticas foram fornecidas pelo Órgão de Revisão de Ética e Bem-Estar Animal (ORBEA-BIOPOLIS), referência 2023-01.

Resumo

A Aquacultura tem tido um aumento significativo nas últimas décadas, e a produção intensiva de pescado tem suscitado uma maior preocupação com o bem-estar dos animais, que estão sujeitos a vários agentes de stress, que podem conduzir a uma diminuição da qualidade e eficiência de produção. Assim, surge a necessidade de procurar metodologias de forma a mitigar os efeitos do stress nos peixes de aquacultura. Por isso, neste estudo, foi testado um método de estimulação táctil, semelhante a massagem, que promove um enriquecimento ambiental com efeitos positivos de bem-estar em animais. Esta metodologia inovadora foi testada em duas espécies cultivadas em Portugal e com elevado valor comercial: a dourada *Sparus aurata*, e o sargo *Diplodus sargus*. A estimulação táctil foi testada durante 21 dias usando quatro animais por aquário. Foi utilizado um tratamento, com um aparato feito com hastes plásticas e fios de silicone, a modo de promover estimulação táctil, e um controlo, com hastes, porém, sem os fios de silicone. O aparato foi inserido no centro do aquário. O comportamento foi avaliado por meio de gravações de vídeos de 30 minutos por dia. Nas quais foram quantificados os comportamentos de atravessamento, ameaças e agressões. Além disso, metade dos indivíduos foram sujeitos a um teste de stress, aos quais foram medidos cortisol e monoaminas, com o objetivo de verificar se havia uma resposta metabólica ao stress. Os resultados referentes ao comportamento indicaram um maior número de atravessamento para ambas espécies no controlo. No cortisol, observou-se que as douradas do tratamento com estimulação táctil, tiveram um aumento menor do cortisol enquanto nos sargos, o aumento foi maior no controlo. Nas monoaminas, foram encontradas diferenças nos metabolitos neurotransmissores de dopamina nas douradas e serotonina nos sargos e na razão desses metabolitos com as próprias.

Palavras-chave: Bem-estar, enriquecimento ambiental, comportamento, cortisol, monoaminas cerebrais, aquacultura, estimulação táctil.

Abstract

Aquaculture has seen a significant increase in recent decades, and intensive fish production has raised greater concern about the welfare of animals, which are subject to various stress agents, which can lead to a decrease in quality and production efficiency. Thus, there is a need to seek methodologies to mitigate the effects of stress on farmed fish. Therefore, in this study, a method of tactile stimulation, similar to massage, was tested, which promotes environmental enrichment with positive effects on animal well-being. This innovative methodology was tested on two species cultivated in Portugal and with high commercial value: the sea bream *Sparus aurata*, and the bream *Diplodus sargus*. Tactile stimulation was tested for 21 days using four animals per tank. A treatment was used, with an apparatus made with plastic rods and silicone wires, in order to promote tactile stimulation, and a control, with rods, however, without the silicone wires. The apparatus was inserted in the center of the aquarium. Behavior was assessed through 30-minute video recordings per day. In which crossing behaviors, threats and aggressions were quantified. In addition, half of the individuals underwent a stress test, in which cortisol and monoamines were measured, with the aim of verifying whether there was a metabolic response to stress. The results regarding behavior indicated a greater number of crossings for both species in the control. Regarding cortisol, it was observed that the sea bream in the treatment with tactile stimulation had a smaller increase in cortisol while in the bream, the increase was greater in the control. In monoamines, differences were found in the neutralizing metabolites of dopamine in sea bream and serotonin in bream and in the ratio of these metabolites to themselves.

Keywords: Welfare, environmental enrichment, behaviour, cortisol, brain monoamines, aquaculture, tactile stimulation.

Índice

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Aquacultura.....	1
1.2 Bem-estar em peixes de aquacultura.....	2
1.3 Stress em aquacultura.....	3
1.4 Técnicas de mitigação do stress: Uma nova forma de enriquecimento: o contacto físico e/ou estimulação tátil.....	5
1.5 Espécies.....	6
1.6 Objectivos da tese.....	7
2- Material e Métodos.	8
2.1 Manutenção dos peixes	8
2.2 Aparato	9
2.3 Desenho experimental	10
2.4 Análise do comportamento.....	10
2.5 Teste de stress	11
2.6 Composição proximal	13
2.6.1 Matéria Seca.....	13
2.6.2 Matéria inorgânica (cinzas)-.....	13
2.6.3 Lípidos.....	13
2.7 Análise de dados.....	14
3. Resultados.....	14
3.1 Comportamento	14

3.1.1 Douradas	14
3.1.2 Sargos.....	17
3.2 Cortisol	19
3.3 Monoaminas cerebrais.	21
3.4 Amostragem e análises bioquímicas	24
3.4.1 Composição proximal	25
4. Discussão	26
4.1 Comportamento	26
4.2 Cortisol	27
4.3 Monoaminas cerebrais	28
4.4 Composição proximal	28
5. Conclusão	29
Referências Bibliográficas	30
Anexos	40

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados do pos-hoc de Bonferroni para a comparação dos dias com os tratamentos.

Tabela 2. Análise GLM, univariate, para cortisol na dourada.

Tabela 3. Média dos valores de cortisol na dourada com erro padrão.

Tabela 4. Análise GLM, univariate, para cortisol no sargo.

Tabela 5. Média dos valores de cortisol no sargo com erro padrão.

Tabela 6. Tabela 6- One-way Anova, feito no SPSS das monoaminas cerebrais separadas por secção do cérebro, resultados da análise das cabeças coletadas. Onde DF são os graus de liberdade, z é o escore e sig é o nível de significância, em que é considerável significativo quando $>0,05$

Tabela 7. média das monoaminas por parte do cérebro e tratamento na dourada, em que está demonstrado a média seguido do erro padrão, para cada tratamento e cada monoamina analisada.

Tabela 8. One-way Anova, das monoaminas cerebrais separadas por secção do cérebro nos sargos. Onde DF são os graus de liberdade, z é o escore e sig é o nível de significância, em que é considerável significativo quando $>0,05$

Tabela 9. média das monoaminas por parte do cérebro e tratamento nos sargos, em que está demonstrado a média seguido do erro padrão, para cada tratamento e cada monoamina analisada.

Tabela 10. Teste-T para análise proximal com erro padrão, na dourada.

Tabela 11. Teste-T para análise proximal no sargo, com erro padrão.

Lista de Figuras

Figura 1. Sparus Aurata - Schneider, W., 1990 (FAO)

Figura 2. Diplodus sargus - Bauchot, M.-L., 1987 Poissons osseux.

Figura 3. a) Ambiente das experiências, que foram feitas na sala de quarentena do Aquário Vasco da Gama, antes dos peixes e aparatos

b) Ambiente, durante as experiências

Figura 4. Aparato usado no tratamento de estimulação táctil e o aparato do controlo (sem estimulação táctil).

Figura 5. a) Aparato dentro do aquário usado para as experiências, conforme foi inserido no aquário.

b) Aparato dentro do aquário

Figura 6. peixes durante o teste de stress

Figura 7. Esquema com as 3 secções do cérebro que foram analisadas.

Figura 8. Média total de atravessamentos nas douradas nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens com erro padrão.

Figura 9. Agressão e ameaças somadas para avaliarmos a interação agressiva total nas douradas, com erro padrão.

Figura 10. Média total de ameaças na dourada nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

Figura 11. Média total de agressão na dourada nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

Figura 12. Média total de atravessamentos no sargo nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

Figura 13. Agressão e ameaças somadas para avaliarmos a interação agressiva total nos sargos, com erro padrão.

Figura 14. Média total de ameaças no sargo nos 21 dias, dos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão

Figura 15. Média total de ataques no sargo nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

Figura 16. Média de Cortisol, com ou sem teste de stress, por tratamento na dourada

Figura 17. Média de Cortisol, com ou sem teste de stress, por tratamento no sargo

Figura 18. Média de Dopac nas 3 cavidades cerebrais, com e sem teste de stress, separados por tratamento, com erro padrão.

Figura 19. Média da razão de Dopac/DA com e sem teste de stress, separados por tratamento no mesencéfalo e cérebro posterior, com erro padrão.

Figura 20. Média de 5HIAA no cérebro posterior dos Sargos, separados por tratamento e teste de stress, com erro padrão.

Figura 21. Razão de 5HIAA/5HT no mesencéfalo dos Sargos, separados por tratamento e se passaram ou não por teste de stress, com erro padrão.

Figura 22. Resultado com as médias das 3 análises da composição proximal feitas, Matéria seca, Lípidos e Cinzas na dourada, com erro padrão.

Figura 23. Resultado com as médias das 3 análises da composição proximal feitas, Matéria seca, Lípidos e Cinzas no sargo, com erro padrão.

Lista de Abreviaturas

DGES	DIREÇÃO GERAL DO ENSINO SUPERIOR
FCT	FUNDAÇÃO PARA A CIÊNCIA E A TECNOLOGIA
FCUP	FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
IPMA	INSTITUTO PORTUGUÊS DO MAR E DA ATMOSFERA
UP	UNIVERSIDADE DO PORTO
CIIMAR	CENTRO INTERDISCIPLINAR DE INVESTIGAÇÃO MARINHA E AMBIENTAL
CIBIO	CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E RECURSOS GENÉTICOS
UNESP	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
NA	NORADRENALINA
DA	DOPAMINA
5HT	SEROTONINA
DOPAC	ÁCIDO 3,4-DI-HIDROXIFENILACÉTICO
5HIAA	ÁCIDO HIDROCI INDOL ACÉTICO
DM	MATÉRIA SECA

Introdução

1.1. Aquacultura:

A aquacultura está entre os setores mais dinâmicos do sistema alimentar global (Naylor et al., 2023). A produção mundial de aquacultura foi crescente ao longo das últimas décadas desde 1950 e atingiu em 2022 um recorde histórico de 130,9 milhões de toneladas, um aumento de 8,1 milhões de toneladas em relação aos 122,8 milhões de toneladas registados em 2020 (FAO, 2024). A aquacultura representa assim 51% do fornecimento de pescado, ultrapassando as pescas no fornecimento de pescado (FAO, 2024).

Portugal apresenta um elevado consumo de pescado, estando nas primeiras posições ao nível mundial do consumo per capita (FAO,2024). As espécies de aquacultura mais importantes em Portugal são a dourada *Sparus aurata* (Linnaeus,1974), o robalo *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), o linguado *Solea senegalensis* (Kaup,1858) e a corvina *Argyrosomus regius* (Asso,1801), sendo também produzidas outras espécies como o sargo *Diplodus sargus* (Linnaeus,1758), embora em menores quantidades (Fernandes, 2017).

Este aumento da aquacultura, possibilita uma diminuição da pressão média de pesca, favorecendo assim, a recuperação das espécies em ambiente natural (Natale et al.,2013; FAO,2024).

Apesar dos benefícios, a aquacultura também apresenta aspetos negativos. A intensidade de cultivo destes animais, acarreta problemas de bem-estar, que muitas vezes são refletidos num aumento de doenças, qualidade do pescado e mortalidade (FAO, 2022). Surge então, uma preocupação com o bem-estar dos animais em aquacultura.

1.2. Bem-estar em peixes de aquacultura

Um dos maiores desafios que a aquacultura enfrenta está associado com a sua sustentabilidade que passa não só por reduzir a sua pegada ambiental, o que tem sido alcançado através da introdução de sistemas de cultivo semi aberto que permitem um maior controlo da qualidade de água e menor quantidade de água libertada para o mar/rios. Um melhor controlo dos parâmetros da água implica também a garantia de melhores condições para os animais cultivados, reduzindo os fatores de stress e aumentando o bem-estar animal (Martins et al.,2012; Calone et al.,2019). Em Portugal, a preocupação com o bem-estar dos organismos aquáticos tem aumentado gradativamente, em parte devido a trabalhos de conscientização por grupos como o Fish Etho Group (<https://fishethogroup.net/>). O bem-estar, é também, uma exigência dos consumidores para aceitação dos produtos da aquacultura (Zander et al., 2017). É fundamental, por isso, identificar os agentes de stress existentes no cultivo de peixes, o seu impacto e procurar soluções para a sua mitigação.

Esta linha de investigação ainda é precoce, havendo poucos estudos publicados, o que pode estar relacionado à percepção pública de que os peixes não têm percepção da dor e de consciência (Brown et al., 2011a). Todas as evidências sugerem que os peixes são, de facto, muito mais inteligentes do que se acredita. Revisões sobre cognição dos peixes sugerem que os peixes mostram uma elevada gama de comportamentos sofisticados. Por exemplo, eles têm memórias de longo prazo, desenvolvem hábitos complexos, mostram sinais de inteligência maquiavélica, cooperam e reconhecem uns aos outros e são até mesmo capazes de usar ferramentas (Brown et al., 2011b).

Evidências recentes também sugerem que, apesar das aparências, o cérebro dos peixes também é mais semelhante ao nosso do que pensava anteriormente. Há todas as razões para acreditar que eles também podem ser conscientes e, portanto, capazes de sofrer (Brown, 2015).

É importante salientar que diferentes espécies têm diferentes requisitos biológicos e ambientais e mostram diferentes respostas às condições de aquacultura. As medidas comportamentais e fisiológicas estão intrinsecamente ligadas e dependem umas das outras para uma interpretação correta no que diz respeito ao bem-estar (Dawkins,1988). Não existe uma medida única de bem-estar e, embora uma ampla gama de medidas fisiológicas, bioquímicas e comportamentais sejam usadas para avaliar o bem-estar, nenhuma delas é considerada confiável isoladamente sendo necessária a aplicação de múltiplas medidas (Broom,1997)). Isto deve-se, em parte, à necessidade de uma interpretação cuidadosa do contexto funcional de muitas das medidas utilizadas (Dawkins, 1998).

O bem-estar animal não é, de forma alguma, um conceito simples. As duas questões principais são o significado de bem-estar animal e a melhor forma de o medir objetivamente (Broom, 1991a; Broom, 1991b; Dawkins, 1998; Mendl et.al, 2004). A produção de diretrizes precisas e objetivas para os níveis de aceitação em todos os aspetos do bem-estar dos peixes só será possível com a resolução destas questões. A Farm Animal Welfare Comitee (FAWC) baseou, portanto, as suas diretrizes no quadro das “Cinco Liberdades”, que define estados ideais em vez de níveis específicos de bem-estar aceitável (FAWC, 1996).

A ausência de fome e sede, desconforto, dor, lesões, doença, medo e angústia, bem como a liberdade de expressar um comportamento normal, proporciona-nos um quadro lógico para avaliar as questões de bem-estar. A saúde física é a medida de bem-estar mais universalmente aceita e é, sem dúvida, um requisito necessário para ser considerável (Broom et al., 1991a).

É importante lembrar que os problemas de saúde podem ser tanto uma causa como um resultado de um bem-estar deficiente. Este aspeto, procura, portanto, compreender experiências subjetivas de animais não humanos e propõe a experiência consciente do sofrimento nestes animais (Broom et al., 1991a).

O bem-estar dos peixes é uma questão importante para a indústria, não só para a perceção pública, marketing e aceitação do produto, mas também frequentemente em termos de eficiência de produção, qualidade e quantidade (Broom, 1998; Southgate et al., 2001; FSBI, 2002).

1.3. Stress na aquacultura:

A atividade da aquacultura tem presentes vários agentes de stress que podem ser pontuais como é o caso da amostragem, limpeza dos tanques ou permanentes como é o caso das densidades, qualidade da água, entre outros (Conte, 2004). Estes agentes de stress podem provocar alterações fisiológicas nos peixes que os tornam mais suscetíveis a parasitas ou a patógenos, podendo assim conduzir a maiores incidências de doenças e aumentar a mortalidade (Iwama et al., 1997). Embora muitos dos agentes de stress na aquacultura sejam inevitáveis, é possível mitigá-los para que o bem-estar dos peixes sejam mantido e a produção seja bem-sucedida (Ashley, 2007).

a) Resposta Comportamental

O comportamento social é definido como qualquer tipo de interação entre indivíduos, que influencie seu comportamento imediato ou futuro (Robinson et al, 2008), podendo ocorrer entre indivíduos da mesma espécie ou entre espécies diferentes (Oliveira et al., 2021). Nesta estrutura conceitual, existem diversos comportamentos que são denominados como comportamentos sociais, podendo ser, reprodutivos, interações cooperativas (Teresa et al., 2011; Tanaka et al., 2018) e hierarquia social, que é marcada por interações agressivas, para classificação social e defesa de território (Damsgård et al., 2012).

O comportamento agressivo, por exemplo, faz parte do repertório natural de várias espécies. Este comportamento aumenta o gasto energético, o que pode interferir no crescimento, reprodução e outras atividades do animal (Fernandes et al., 1993; Greaves et al, 2001; Gonçalves-de-Freitas et al.; 2019; Cavalino et al., 2023). Assim, os níveis de agressividade também são utilizados como indicadores de bem-estar.

b) Resposta Fisiológica

A resposta ao stress é considerada um mecanismo adaptativo que permite ao peixe lidar com agentes de stress e manter seu estado normal ou homeostático. Simplificando, o stress pode ser considerado um estado de desequilíbrio da homeostasia que é restabelecido por um complexo conjunto de respostas adaptativas (Chrousos, 1998).

A resposta fisiológica ao stress envolve todos os três sistemas reguladores, neural, endócrino e imunitário, e é comum em todos os vertebrados, incluindo os peixes. A percepção do stress pelos sensores do sistema nervoso provoca a secreção imediata da hormona libertadora de corticosteroides (CRH) pelo núcleo pré-óptico do hipotálamo. Os recetores CRH estimulados da hipófise induzem a libertação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) para a circulação, que, em sequência, estimula a libertação de cortisol pelas células adrenais (Pickering et al., 1981).

Essa resposta promove a sobrevivência e a recuperação dos indivíduos durante e após eventos desafiantes (Greenberg et al., 2001) resultando em alterações fisiológicas. A elevação crónica das concentrações circulantes de cortisol também reduz o crescimento, apesar do comportamento alimentar se manter normal (Bernier et al., 2004), mostrando que existe um custo metabólico do stress.

O cortisol é a principal hormona relacionada com o stress, o que o torna o indicador mais importante de exposição a este fator (López-Patiño et al., 2021). Quando o peixe é exposto a um agente stressor ocorre a ativação de dois eixos neuroendócrinos: o eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático e células cromafins (HSC), que resulta na libertação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), como produtos finais; e o eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI) que liberta os corticosteroides (cortisol e cortisona) (Mazeaud et al., 1977; Braithwaite and Ebbesson, 2014). De facto, estas elevações acentuadas do cortisol plasmático têm sido extremamente usadas como índice de stress (Pottinger et al., 1992). Porém, essas medidas podem ser afetadas por vários fatores diferentes (Dawkins, 1998; Huntingford et al., 2006; Braithwaite and Ebbesson, 2014).

As monoaminas serotonina e dopamina são importantes neurotransmissores/neuromoduladores monoaminérgicos no sistema nervoso central. Esses sistemas monoaminérgicos são evolutivamente bem conservados e são encontrados em invertebrados e também em vertebrados (Adrio et. al 1999; Azmitia 2007). As respostas comportamentais e fisiológicas ao stress têm mecanismos de controlo comuns no cérebro e os neurotransmissores monoaminas serotonina (5-hidroxitriptamina, (5-HT), dopamina (DA) e norepinefrina (NE) desempenham aqui um papel vital, para além de estarem envolvidos em ações agressivas (Pottinger et al., 1992).

O aumento de 5-HT(5-hidroxitriptamina) está associado à inibição da agressão e ao comportamento subordinado nos peixes, enquanto o aumento da atividade de dopamina (DA) está associado a um comportamento agressivo e competitivo e a uma dominância (Winberg et al., 1993). O aumento das atividades dopaminérgicas e serotoninérgicas no sistema nervoso central participa na estimulação da síntese de cortisol e na sua libertação para o sangue, como foi relatado para outras espécies, também é

aceite o envolvimento das monoaminas cerebrais (DA e 5HT) na iniciação da resposta dos peixes teleósteos a diferentes fatores de stress agudos (perseguição, exposição ao ar, etc.), embora a informação relativa ao papel destes neurotransmissores durante o stress crónico seja escassa (López-Patiño et al.2014).

1.4. Técnicas de mitigação do stress: Uma nova forma de enriquecimento: o contacto físico e/ou estimulação tátil:

Tem sido criado, uma variedade de estratégias que são conhecidas como enriquecimento ambiental, e são usadas para evitar o desenvolvimento de características mal-adaptativas ou indesejadas em peixes em cativeiro (Flagg et al., 1999; CHSRG - California Hatchery Scientific Review Group 2012), Näslund et al., define o enriquecimento ambiental de forma geral, como um aumento deliberado na complexidade ambiental com o objetivo de reduzir características mal-adaptativas e incomuns em peixes criados em ambientes privados de estímulos (Näslund et al., 2016)

O enriquecimento ambiental pode melhorar o bem-estar de peixes em cativeiro. O seu objetivo é fornecer nova estimulação sensorial e motora para ajudar a atender às suas necessidades comportamentais, fisiológicas, morfológicas e psicológicas, ao mesmo tempo em que reduz o estresse e a frequência de comportamentos anormais. (Arechavala-López et al., 2021).

Um dos enriquecimentos ambientais usados é a estimulação tátil, que é um tipo de enriquecimento sensorial e que o seu efeito na redução do stress tem sido evidenciado em vários estudos com mamíferos e o seu papel é igualmente observável nos humanos quando, por exemplo, recorrem a massagens de relaxamento (Field, 1996; Field et al.,2005; Jane et al.,2009). Estas “massagens” produzem efeitos positivos nos indivíduos, proporcionando não só bem-estar como também benefícios ao nível da saúde através da redução dos níveis de cortisol (Field et al., 2005). Há estudos em humanos que mostram que a produção de cortisol aumenta de forma considerável após stress induzido experimentalmente e diminui de forma considerável após terapias relaxantes, como a massoterapia (Field et al., 2005).

Existem alguns estudos que demonstram que a estimulação tátil de longo prazo melhora o sistema imunitário em animais como por exemplo, em cães (Charnetski et al.,2004), em bovinos, suínos (Magalhães Silva,2015; Lima, 2019) e em humanos (Field, 1995). No caso dos peixes, as evidências desse efeito benéfico, estão a dar os primeiros passos, com testes em peixe-zebra (Schirmer et al.,2013), e tilápia-do-nilo (Gauy et al., 2022). Sabe-se que a simbiose de limpeza é uma das interações comportamentais mais notáveis em ambientes marinhos e aquáticos (Losey, 1987). Feder (1966) define a simbiose de limpeza como "uma relação na qual certos organismos removem ectoparasitas, bactérias, tecidos doentes e feridos e partículas indesejadas de alimentos de peixes cooperantes e de alguns outros organismos que os visitam",

estabelecendo assim uma relação benéfica para hospedeiro e peixe-limpador. Tendo como base esta simbiose, Soares (et al. 2011) tentou reproduzir em aquários, a estimulação tátil demonstrando que esta diminui o stress em peixes tropicais, concluindo que a relação entre peixe, hospedeiro e limpador vai muito além da remoção dos parasitas. Na natureza, um peixe cliente tem seus ectoparasitas removidos por um peixe limpador, que fornece estimulação tátil através das suas barbatanas sobre o corpo do hospedeiro, enquanto remove os parasitas (Soares et al., 2011). Esse efeito foi criado artificialmente pelos autores, que desenvolveram um aparelho composto por um modelo de peixe limpador que esfregou mecanicamente o peixe cliente, confirmando os efeitos positivos esperados dessa relação. Bolognesi et al. (2019) também criaram um aparato com fios de silicone, que promovia estimulação tátil quando o peixe atravessava por entre as cerdas. Porém, este modelo foi criado para testar a estimulação tátil em peixes que não apresentam comportamento de cliente/limpador.

1.5. Espécies



Figura 1. Dourada, *sparus aurata*. Schneider. W, 1990 (FAO)

O foco deste trabalho, são espécies importantes para a aquacultura em Portugal, a primeira espécie foco é a dourada *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), (figura 1), que é um Sparidae subtropical distribuído de 62°N- 15°N, 17°W - 43°E. Ocorre naturalmente no Mediterrâneo e no Mar Negro (raro), e no Atlântico Oriental, desde as Ilhas Britânicas, Estreito de Gibraltar até Cabo Verde e em torno das Ilhas Canárias. (Pauly et al., 2008).

A dourada é uma espécie hermafrodita protândrica: é um macho funcional nos primeiros dois anos, tornando-se fêmea quando atinge mais de 30 cm de comprimento (Sola et al., 2007). É uma espécie de elevado valor comercial e uma das primeiras na região mediterrânea a ser cultivada em aquacultura, tendo já protocolos bem estabelecidos e rações formuladas de acordo com os seus requisitos nutricionais. O seu cultivo faz-se geralmente em zonas estuarinas em aquacultura semi-aberta, em tanques de terra ou em jaulas no mar (FAO, 2006). É uma espécie classificada como “pouco preocupante” (LC) pela IUCN (2023). A dourada, nas fases juvenil e adulta, é uma espécie essencialmente carnívora, alimentando-se de moluscos, crustáceos e outros organismos bentónicos (Moretti et al. 1999).

A segunda espécie foco é o sargo *Diplodus Sargus* (L.1758) (figura 2), que tem uma distribuição geográfica

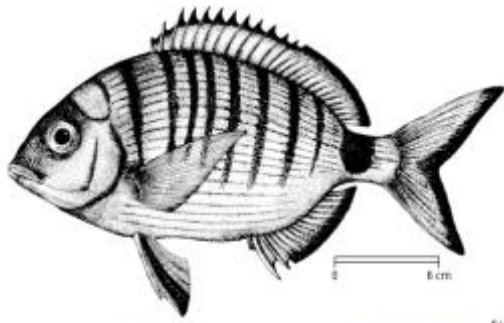


Figura 2. *Diplodus sargus*- Bauchot, M.L,1

que abrange o Mediterrâneo, o oeste do Mar Negro e o leste do Atlântico, da Bretanha às Ilhas Canárias, Madeira e noroeste da África. Está classificado como uma espécie “pouco preocupante” (LC) pela IUCN (Pollard et al., 2014).

São animais com sexos separados ou protândricos (Bauchot, 1986) mostra um padrão hermafroditismo digínico atingindo a maturidade sexual durante o segundo ano de vida, com cerca de 17cm (Morato et al., 2003). É uma espécie muito valorizada, com um elevado valor comercial (Harmelin-Vivien et al.,1995) mas o seu cultivo foi estudado durante vários anos,

tendo o seu potencial para aquacultura considerado baixo devido à sua baixa taxa de crescimento e propensão para acumulação de ectoparasitas e por isso, não está estabelecida. O seu cultivo faz-se sobretudo em regime de policultura, tendo sido objeto de iniciativas de repovoamento marinho por meio do uso de juvenis e subadultos fornecidos por instalações de aquacultura locais (D'Anna et al., 2004; 2012; Santos et al. 2006). Estudos mostram que os sargos, tem uma dieta altamente oportunista (Rosecchi 1987; Sala et al.,1997; Figueiredo et al. 2005; Leitão et al. 2007). Já foi identificado pequenos copépodes ectoparasitas em seu conteúdo estomacal (Rosecchi, 1987; Mariani, 2001), o que sugere uma limpeza ocasional, e sendo assim considerado um limpador facultativo. (Abecasis et al.,2015). Essa atividade é vista em sargos juvenis, normalmente com menos de 10 cm e a ausência de atividade de limpeza por maiores em indivíduos, mostra que o comportamento de limpeza é restrito às fases anteriores da vida (Neto el al 2019), a atividade de limpeza é provavelmente restrita a indivíduos com até um ano de idade (Neto el al 2019). Os indivíduos adultos procuram estações de limpeza e se aproveitam da simbiose com peixes limpadores (Zander et al., 2002).

1.6. Objectivos da tese

As manipulações típicas na aquacultura, como manuseamento, transporte, aglomeração ou vacinação, entre outras, têm efeitos indesejados nos peixes, comprometendo assim seu bem-estar. Como resultado são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem, o que pode ser útil na implementação de estratégias específicas para mitigar os efeitos negativos dessas manipulações (López-Patiño et al., 2021).

Em resumo, o principal objectivo deste trabalho foi introduzir uma nova forma de enriquecimento em condições laboratoriais que simule atividade de estimulação tátil que os peixes recebem na natureza através das interações de limpeza entre peixes (Soares et al, 2011; Bolognesi et al., 2019) em duas espécies sendo uma de importante valor na aquacultura marinha portuguesa: a dourada (*Sparus aurata*) e a outra que está a ser estudada formas de implementação na aquacultura ,o sargo (*Diplodus sargus*). E que este

estudo pode ser importante para estabelecer essa espécie em aquacultura. Para cada tratamento, foram avaliados parâmetros comportamentais e fisiológicos. Pretende-se assim, avaliar se o acesso a contacto físico pode reduzir o stress nesses animais e, como consequência, promover um aumento no bem-estar.

2 Material e Métodos

2.1. Manutenção dos peixes

Os ensaios foram realizados no Aquário Vasco da Gama. Os peixes foram fornecidos pela Estação de Piscicultura de Olhão do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.) que possui uma maternidade de douradas e sargos. Os juvenis com aproximadamente 8 g de peso, foram aclimatados durante 20 dias no primeiro ensaio e cerca de 30 dias no segundo e terceiro ensaios, num aquário de vidro (120 x 55 x 45cm). Após esse período foram distribuídos aleatoriamente em aquários mais pequenos (50 x 40 x 40 cm), cada um com quatro indivíduos (figuras 3).

Os aquários estavam num sistema de recirculação, com filtro biológico, escumador (TUNZE comline 9012) e UV. A água do circuito estava à temperatura ambiente, entre 19 °C e 22 °C, e a salinidade à volta dos 34 ppt. O fotoperíodo foi de 12 horas luz, 12h escuridão. A qualidade da água foi testada periodicamente por meio de testes analíticos (Tropic Marin) para amónia, nitrito e nitrato e pH. Os peixes foram alimentados 2 vezes por dia, às 9h e às 15 h com 12g diárias total de ração. Neste trabalho foram realizados 3 ensaios, um inicial com douradas que decorreu do dia 12 de outubro a 1 de novembro, outro com douradas e um com sargos que decorreram do dia 1 de dezembro ao dia 21 de dezembro.

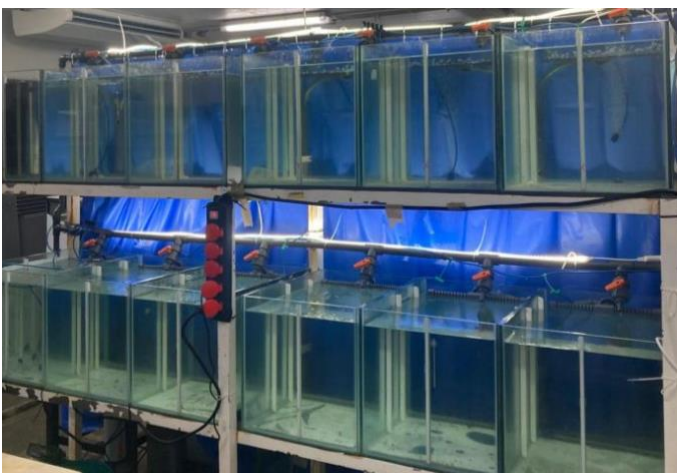


Figura 3 a) Ambiente das experiências, feitas na sala de quarentena do Aquário Vasco da Gama, antes da integração dos peixes e aparatos.

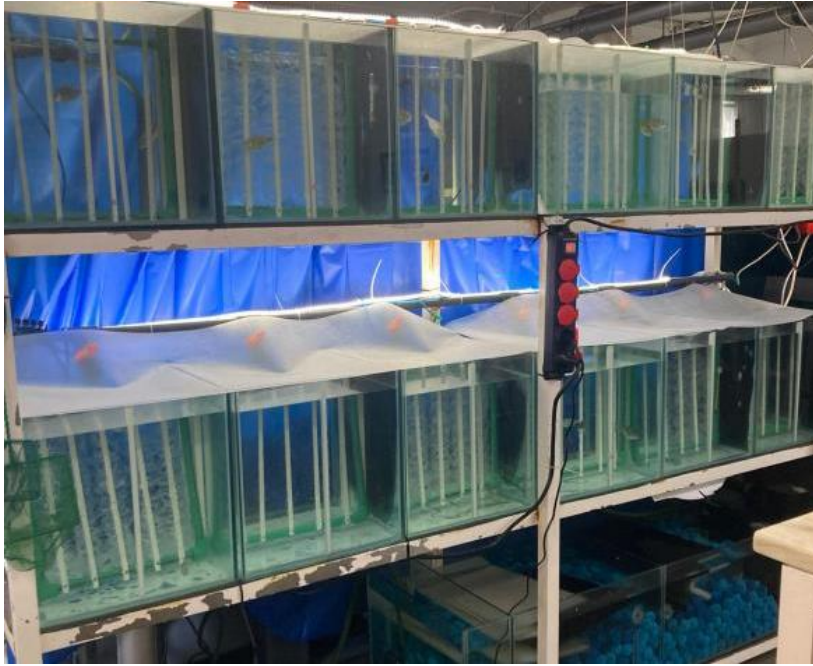


Figura 3. b) Mesmo ambiente, durante as experiências

2.2. Aparato

O aparato utilizado como estimulador tátil escolhido, foi o mesmo modelo utilizado por (Bolognesi et al, 2019), que é formado por 4 tubos de pvc e 5 hastes plásticas (38cmx35x35 cm). No aparato de tratamento, essas hastes plásticas são cobertas com fios de silicone. Esse aparato foi introduzido no centro de cada aquário, para promover a estimulação tátil sempre que o peixe atravessasse. No controlo, o aparato é exatamente igual, porém sem os fios de silicone, de forma a não promover a estimulação tátil. Como mostrado nas figuras 4 e 5.

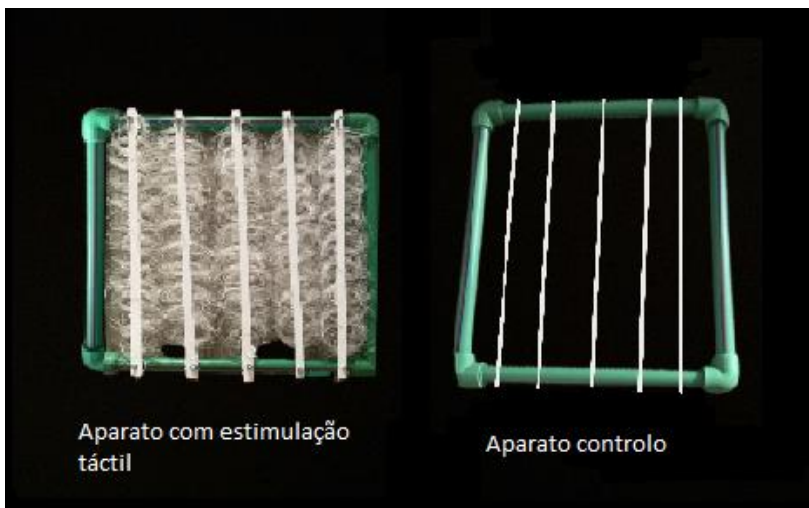


Figura 4 . Aparato usado no tratamento de estimulação tátil e o aparato do controlo (sem estimulação tátil).



Figura 5. a) Aparato dentro do aquário usado para as experiências, conforme foi inserido no meio do aquário.
b) Aparato dentro do aquário

2.3. Desenho experimental

Neste trabalho foram realizados 2 ensaios experimentais, um envolvendo douradas e outro com sargos. Foram utilizadas 64 douradas, e 20 sargos. As observações foram realizadas por meio de gravações diárias de 30 minutos por aquário.

a) Ensaio 1

Os peixes ficaram em contacto com os aparatos durante 21 dias. Esse período foi definido como um período considerado longo, ideal para esse tipo de experiências, e utilizado antes por (Gauy et al., 2022) para tilápia do Nilo.

Foram utilizados 16 aquários, com 4 douradas em cada totalizando 64 indivíduos. Sendo 8 aquários sendo tratamento (aparatos com fios) e 8 controlos

c) Ensaio 2

Foram utilizados 20 sargos, distribuídos em 5 aquários (4 peixes por aquário), sendo 3 com tratamento e 2 controlos.

2.4. Análise do comportamento

O comportamento foi registado por gravações para que não houvesse interferência do observador no comportamento dos animais. As gravações foram realizadas seis dias por semana, dando um total de 18

dias de gravações (por ensaio), das quais 30 minutos foram analisados os seguintes comportamentos:

- a) Atravessamento - Foi medida a frequência dos atravessamentos, ou seja, quando o peixe atravessava o aparato, e também foi medido o tempo de duração destes atravessamentos.
- b) Interações agressivas – a frequência das soma das ameaças e ataques entre os indivíduos do aquário.

As análises dos vídeos foram realizadas através do software BORIS (Behavioural Observation Research Interactive Software).

2.5. Teste de stress

No 22º dia, ou seja, após o tempo total das observações, os peixes foram retirados do aquário, dois indivíduos foram imediatamente eutanizados com o anestésico fenoxietanol, enquanto os outros dois indivíduos de cada aquário foram confinados em pequenos aquários, com cerca de 10 cm de água durante 30 minutos como mostra a figura 6, passando assim pelo teste de stress, antes de serem também eutanizados com fenoxietanol. Este teste teve a intenção de observar se os indivíduos expostos a estimulação tátil respondem de forma mais controlada a um evento de stress agudo.



Figura 6 - peixes durante o teste de stress

Após serem sacrificados, os peixes foram medidos, pesados e as cabeças (com opérculo) separadas, identificadas e armazenadas a -80 °C, tendo sido o restante do corpo também identificado e armazenado a -20 °C. Os cérebros e os opérculos com sangue foram enviados para a Universidade Técnica da Dinamarca para serem posteriormente processados para quantificação do cortisol e das monoaminas.

O cortisol foi quantificado pelo plasma obtido a partir das brânquias dos indivíduos, e analisados através do

ensaio de imunoabsorção enzimática (cortisol saliva ELISA), através do kit- Tecan/ IBL RE52611.

Os cérebros foram expostos removendo o topo do crânio, com a cabeça ainda congelada e foi dividido por cortes verticais em três secções, como esquematizado na figura 7: prosencéfalo, mesencéfalo, e cérebro posterior. Para efeitos de quantificação das monoaminas DA (dopamina), NA (noradrenalina), DOPAC (ácido 3,4-di-hidroxifenilacético), 5HIAA (ácido 5 hidroxí indol acético), 5HT (serotonina), e também a razão de DOPAC/DA e a razão de 5HIAA/5HT. Essas últimas, são da razão da massa dos compostos, pela massa do tecido. Tendo como resultado, o valor do composto por unidade de massa do tecido.

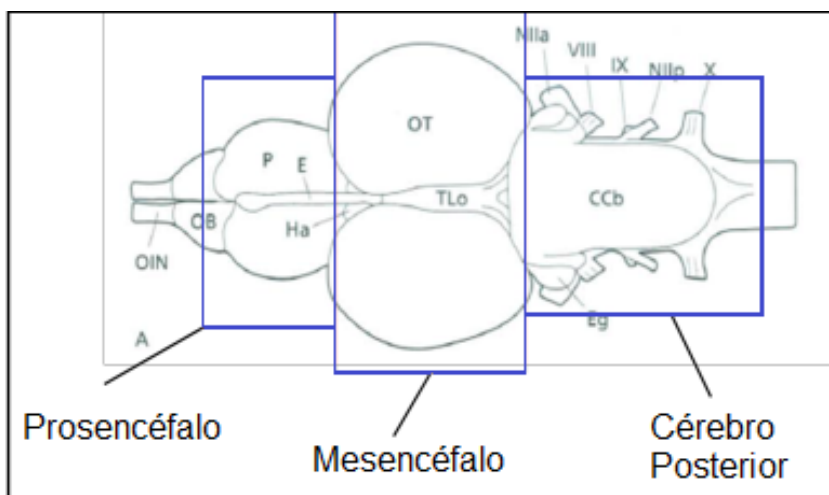


Figura 7- Esquema com as 3 secções do cérebro que foram analisadas.

As três secções do cérebro foram pesadas e homogeneizadas em 400 uL de solução de ácido perclórico (PCA) (0,4M PCA e 0,1mM EDTA) com um homogeneizador ultrassônico Sonopuls (Bandelin, Alemanha). Os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 14000x g (a 4°C). Os sobrenadantes foram diluídos três vezes com a solução de PCA antes da análise de HPLC. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-EC). A fase móvel do HPLC consistiu em 73,9 mM NaH₂P₄, 0,1mM Na₂EDTA e 0,58 mM de 1-octanossulfonato de sódio em água deionizada com 15,3 %(v/v) de metanol, pH=3,0. Foi utilizada uma coluna Supelcosil LC-18-DB (15cm x 4,6mm, 5µM)

(Supelco, Bellefonte, PA, USA) para a separação cromatográfica, e a detecção eletroquímica dos compostos separados foi realizada usando um detetor ESA Couluchem II. O sistema de detecção incluiu uma célula analítica dupla (5011A)

com potenciais de oxidação ajustados a +200mV (primeiro eletrodo) e -350mV (segundo eletrodo). Uma célula de condicionamento (5020) a +300mV foi usada antes da célula analítica. Os níveis de serotonina (5HT), dopamina (DA) e seus principais metabólitos oxidativos, ácido 5-hidroxi-indoleacético (5HIAA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), foram quantificados, juntamente com os níveis de norepinefrina (NE). A quantificação foi realizada comparando as áreas dos picos com as dos respetivos padrões. As razões entre 5HIAA E 5HT e entre DOPAC e DA foram calculadas como medidas indiretas da atividade dos neurónios serotoninérgicos e dopaminérgicos, respetivamente.

2.6. Composição Proximal

As análises de composição proximal foram realizadas no laboratório da FCUP e no CIIMAR. As amostras consistiam nas carcaças de peixes de cada aquário. Estas análises foram realizadas de acordo com os métodos da Associação Oficial de Analistas Químicos (AOAC,2000) e foram realizadas com o total de peixes de cada aquário.

Também foi comparado o peso fresco dos indivíduos entre controlo e tratamento.

2.6.1. Matéria seca

Para determinar a matéria seca das carcaças foi necessário determinar a humidade. Para isso, as carcaças foram pesadas e colocadas numa estufa a 60°C a secar até se atingir a estabilização do peso (cerca de 2 semanas). Depois de pesadas, as carcaças foram trituradas numa picadora até se obter um produto homogéneo para determinar a humidade residual, matéria inorgânica, proteína, lípidos e energia.

Para quantificação da humidade residual das carcaças e da humidade, pesou-se cerca de 0,5 g de amostra, em duplicado, em cadinhos de porcelana previamente limpos e secos. Os cadinhos com a amostra foram colocados na estufa a 100 °C durante 48h. Após este período, pesou-se novamente os cadinhos com as amostras e calculou-se a matéria seca através das seguintes fórmulas:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{\text{peso da carcaça inicial} - \text{peso da carcaça final}}{\text{Peso da carcaça inicial}} \times 100$$

$$\text{Matéria seca (\%)} = 100 - \text{humidade (\%)}$$

2.6.2. Matéria inorgânica (cinzas)

A matéria inorgânica foi determinada através da incineração das amostras anteriores, numa mufla a 500°C durante 16 horas. No final os cadinhos voltaram a ser pesados e a diferença entre o peso antes e depois da incineração indica a percentagem de cinzas

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{peso da carcaça inicial} - \text{peso da carcaça final}}{\text{Peso da carcaça inicial}} \times 100$$

2.6.3. Lípidos

Os lípidos foram determinados utilizando-se o método de Soxhlet (1879) modificado. Colocou-se um pouco de algodão no fundo dos cartuxos de celulose, aos quais se adicionou cerca de 0,4 g da amostra, e depois cobertos com mais um pouco de algodão. Os cartuxos foram encaixados no extrator de Soxhlet. Pesaram-se os copos de metal para a recolha de lípidos nos quais foram adicionados 50 ml de éter de petróleo. Em seguida, os copos foram também encaixados no extrator. Após todo o material estar no seu devido lugar, a máquina foi ligada, começando assim o processo de extração dos lípidos, o qual se divide em quatro fases.

Na primeira fase, o cartuxo encontra-se mergulhado no éter de petróleo durante 45 minutos; na segunda fase, o cartuxo é levantado, retirado do éter, permanecendo assim durante 1h30. Na terceira fase, que tem uma duração de 10 min, fecha-se a torneira da máquina, de forma que o éter de petróleo não passe pelo cartuxo. Finalmente, na quarta fase, liga-se a ventoinha durante 10 min. Após este processo, os copos são colocados cerca de 30 min na estufa, para terminar de secar qualquer resquício de éter que possa ter ficado, esfriados, e por fim, pesados para determinar o resultado.

Para determinação lipídica foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$Lípidos (\%MF) = \frac{\text{peso lípidos final}}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

$$Lípidos (\%MS) = \frac{Lípidos (\%MF) \times 100}{MS\%}$$

2.7 Análise de dados

Utilizou-se um teste de Levene para verificar a homogeneidade dos dados, e quando necessário, os dados foram transformados por $\log(x+1)$ ou $\sqrt{(x+1)}$.

Para o comportamento, utilizou-se uma ANOVA para medidas repetidas, e um pos-hoc Bonferroni, para comparação entre os dias e tratamentos e nos sargos foi usado o pos-hoc Unequal N HSD, pois o número de tratamentos não é igual. E foram analisadas a cada 3 dias de observação.

Para o cortisol e monoaminas, foi usada uma análise de variância simples (ANOVA) e como pós-hoc o teste Bonferroni, para comparação entre os tratamentos e testes de stress.

Para a composição proximal foi usado um test-t.

Para o comportamento foi usado o software Statistica (StatSoft), e para todas as outras análises foi usado o SPSS (IBM Corp.).

3. Resultados

3.1. Comportamento

3.1.1. Douradas

a) Atravessamento

Como se pode observar na figura 8 e na tabela 1, houve diferença significativa no número de atravessamentos pelo estimulador, na interação entre as observações e tratamento (Anova para medidas repetidas; $f=3.34$; $p=0.005$). O número de atravessamentos no controlo foi maior do que no tratamento com estimulação tátil, a média de atravessamentos totais no controlo foi de $298 \pm 17,6$ (os valores são média $\pm$ erro padrão), enquanto no tratamento foi de $24 \pm 2,7$. ($p=0.0001$), houve diferença significativa entre os tratamentos em quase todos os dias (nomeadamente dias 3,6,9,15 e 18).

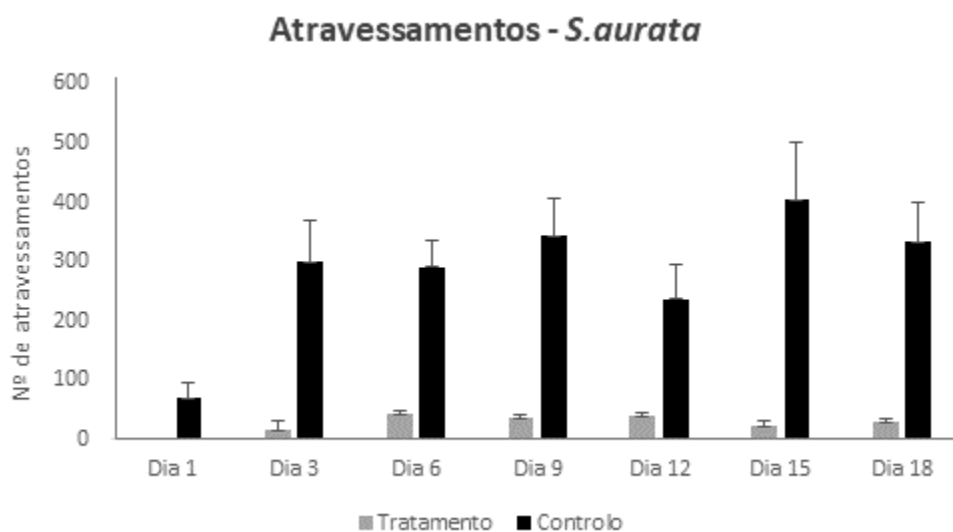


Figura 8. Média total de atravessamentos nas douradas nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens com erro padrão.

Quanto ao tempo de permanência (em segundos) no aparato, a média no tratamento foi de $0,764 \pm 0,11$ (média $\pm$ erro padrão). E no controlo $1,012 \pm 0,07$ (média $\pm$ erro padrão), $t(14)=1,84$, $p=0.08$. Não havendo diferenças estatísticas entre o tempo de permanência entre as douradas do tratamento e do controlo.

Tabela 1. Resultados do pos-hoc de Bonferroni para a comparação dos dias com os tratamentos.

Crossing (<i>S.aurata</i>)		
Observação	F	P
Dia 1	6,6300	1,000
Dia 3	16,720	0,001
Dia 6	16,485	0,015
Dia 9	17,326	0,004
Dia 12	13,721	0,224
Dia 15	18,474	<0,001
Dia 18	17,006	0,002

b) Interações agressivas

Nas interações agressivas, temos uma média de $21,52 \pm 3,42$ (média $\pm$ erro padrão) interações no

tratamento com estimulação táctil vs $27,86 \pm 3,55$ no controlo (figura 9).

Sendo essas interações, divididas em ameaças a ataques, que podemos ver separadamente nas figuras 10 e 11.

Não houve valores significativos para a diferença entre tratamentos, como também não houve diferença significativa com a interação entre tratamento e dia de observação.

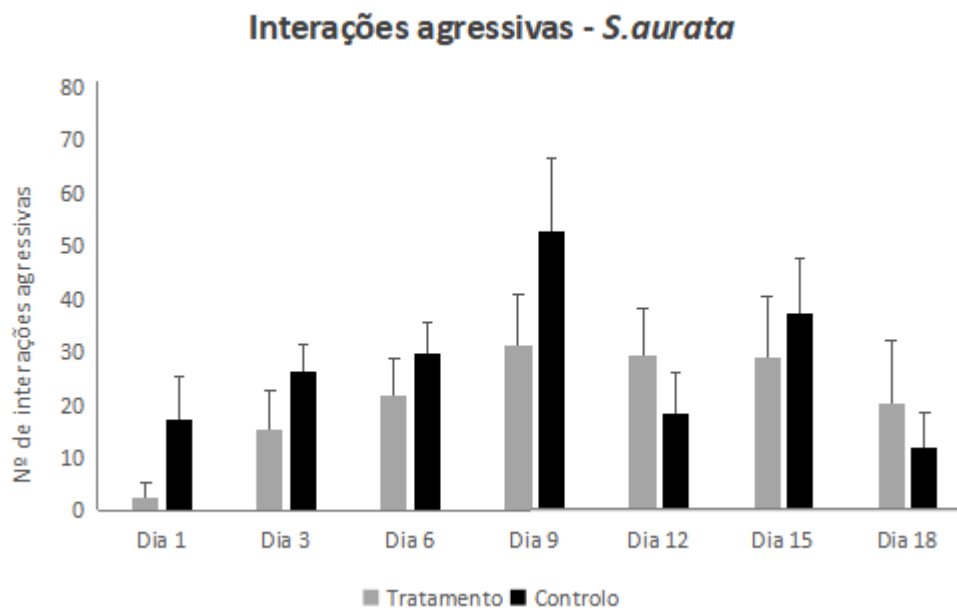


Figura 9. Agressão e ameaças somadas para avaliarmos a interação agressiva total nas douradas, com erro padrão.

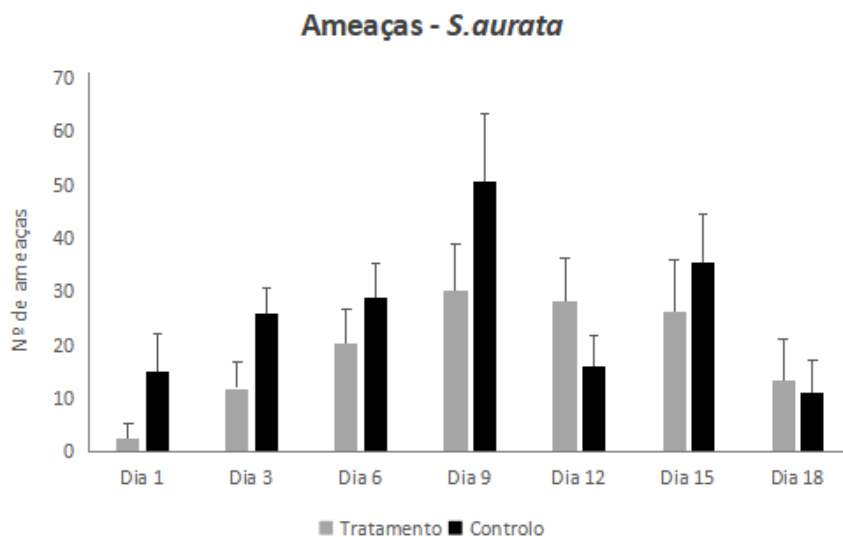


Figura 10. Média total de ameaças na dourada nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

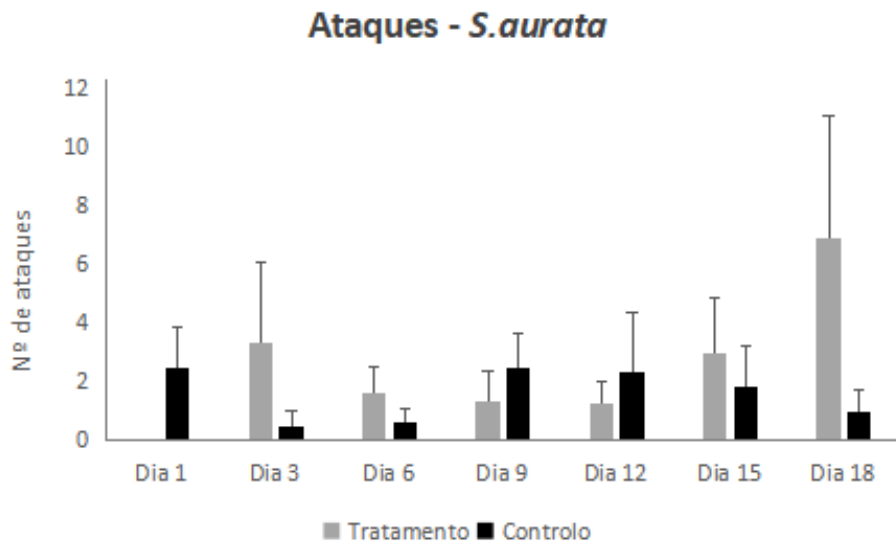


Figura 11. Média total de agressão na dourada nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

3.1.2 Sargos

a) Atravessamentos

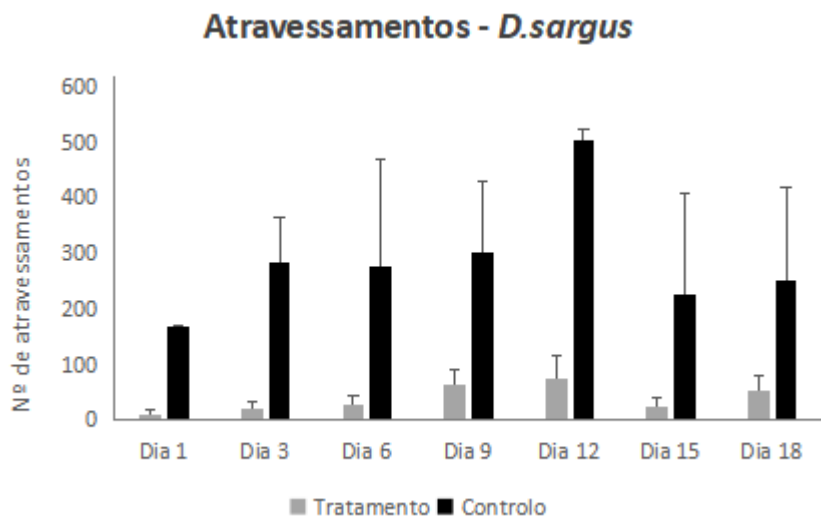


Figura 12. Média total de atravessamentos no sargo nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

Os atravessamentos não foram significativos na interação entre dias de observação e tipos de tratamentos ($f=0.9336$; $p=0.495$). E, também não houve diferenças estatísticas entre o tratamento e o controlo ($f=3.8265$; $p=0.1454$), apesar de não ser significativo, os atravessamentos foram consideravelmente maiores no controlo $269 \pm 46,6$ (média $\pm$ erro padrão), do que no tratamento $38,14 \pm 9$, conforme, figura 12.

Quanto ao tempo de permanência (em segundos) no aparato, a média no tratamento foi de $0,554 \pm 0,10$ (média $\pm$ erro padrão). E no controlo $0,960 \pm 0,11$ (média $\pm$ erro padrão), $t(14)=2,57$, $p=0.08$. Não havendo diferenças estatísticas entre o tempo de permanência entre os sargos do tratamento e do controlo.

b) Interações agressivas

Entre as interações agressivas e os tipos de tratamentos não houve diferença significativa ($f=3.133$; $p=0.1748$), e entre o dia de observação e tipo de tratamento também não foi significativo ($f=0.6297$; $p=0.7048$).

Mas podemos observar na figura 13, que as interações agressivas foram mais vistas no tratamento com estimulação tátil com uma média de $52,43 \pm 6,1$ (média $\pm$ erro padrão do que no controlo: $25,67 \pm 5$).

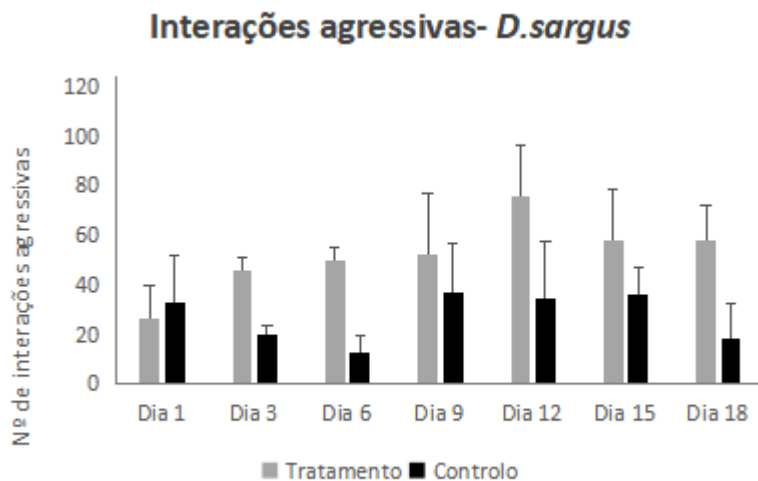


Figura.13. Agressão e ameaças somadas para avaliarmos a interação agressiva total nos sargos, com erro padrão.

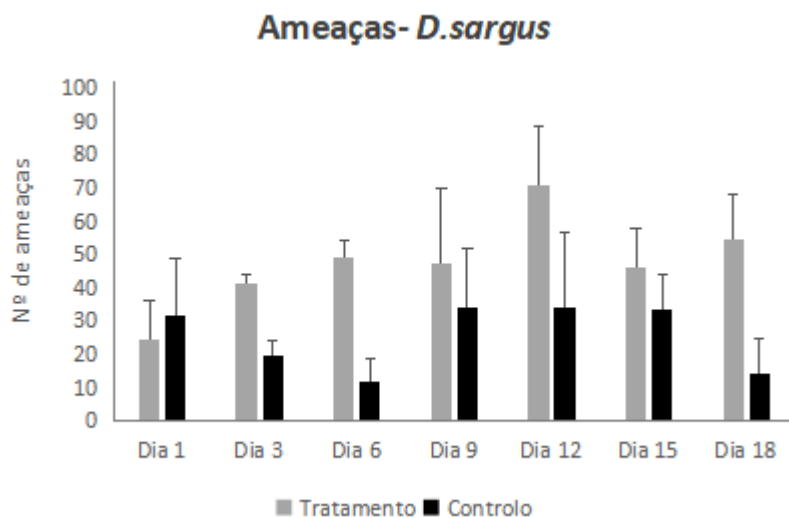


Figura 14. Média total de ameaças no sargo nos 21 dias, dos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão

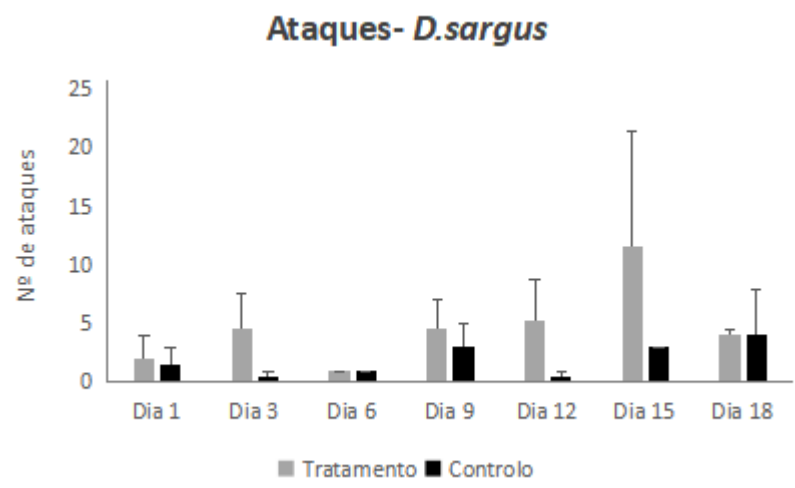


Figura 15. Média total de ataques no sargo nos 21 dias, observados nos 30 minutos diários de filmagens, com erro padrão.

3.2. Cortisol

a) Douradas:

Como se pode ver na figura 16 e na tabela 2, houve diferenças significativas entre os indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram e também houve diferença significativa entre os valores estatísticos do tratamento com o teste de stress. Os que estavam no aquário com a estimulação táctil tiveram um aumento menor do cortisol, do que os que estavam no controlo como mostra a tabela 3.

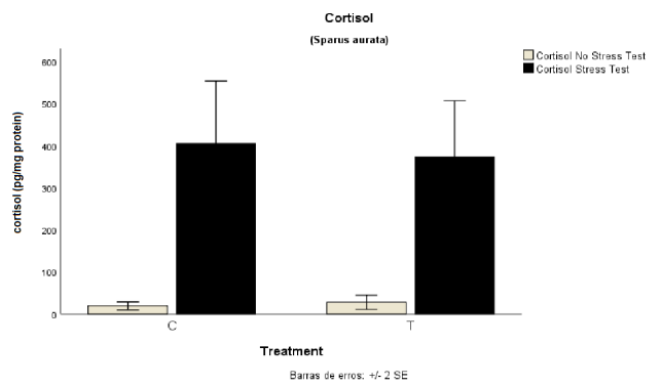


Figura 16- Média de Cortisol, com ou sem teste de stress, por tratamento na dourada

Tabela 2- análise GLM, univariate, para cortisol na dourada.

<i>Cortisol - S. aurata</i>			
	<i>DF</i>	<i>Z</i>	<i>Sig</i>
Tratamento	1	3,639	,073
Stress Test	1	26,883	<,001
Treat*Stress	1	5,489	,032

Tabela 3- média dos valores de cortisol na dourada com erro padrão.

Média de Cortisol entre tratamentos	
Tratamento com estimulação tátil	
Com teste de stress	316,65 ± 38,44
Sem teste de stress	27,89 ± 8,47
Controlo	
Com teste de stress	456,26 ± 85,97
Sem teste de stress	19,52 ± 4,46

b) Sargos

Nos sargos, houve diferenças significativas entre os que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, mas não houve diferença entre a interação do teste com o tratamento, como podemos ver na figura 17 e na tabela 4. Inclusive, ao contrário das douradas, pode-se ver na tabela 5, que o cortisol teve um aumento maior no tratamento em comparação aos que estavam no controlo.

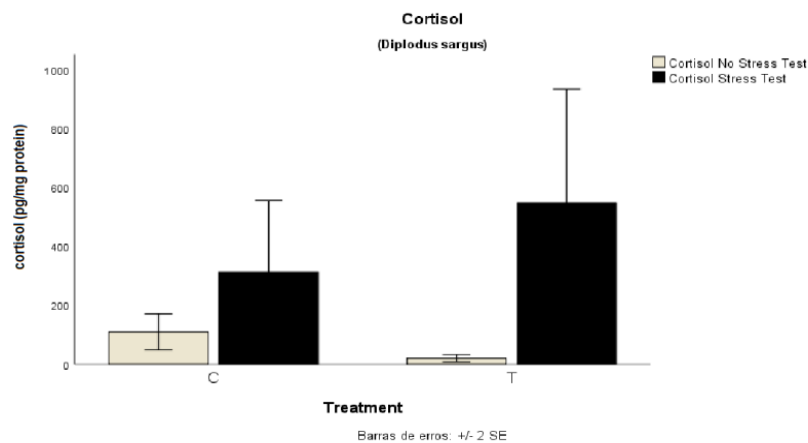


Figura 17. Média de Cortisol, com ou sem teste de stress, por tratamento no sargo

Tabela 4. análise GLM, univariate,para cortisol no sargo.

Cortisol - D. sargus			
	DF	Z	Sig
Tratamento	1	,084	,773
Stress Test	1	159,931	<,001
Treat*Stress	1	,294	,590

Tabela 5. média dos valores de cortisol no sargo com erro padrão.

Média de Cortisol entre tratamentos	
Tratamento com estimulação tátil	
Com teste de stress	547,48 ± 193,35
Sem teste de stress	20,21± 6,08
Controlo	
Com teste de stress	313,1 ± 69,61
Sem teste de stress	109,14 ± 30,54

3.3. Monoaminas cerebrais

a) Douradas

Entre indivíduos que passaram pelo teste de stress, houve diferença significativa nos compostos DOPAC presente no prosencéfalo ($p=0.016$), mesencéfalo ($p=0.002$) e Cérebro posterior($p=0.020$); em razão de DOPAC/DA no mesencéfalo ($p=0.042$) e no cérebro posterior ($p=0.012$).

Enquanto a diferença entre tratamento e controlo, foi significativa em 5HIAA do cérebro posterior($p=0.038$) e em razão de 5HIAA/5HT do cérebro posterior ($p=0.046$). (tabelas 6 e 7 e figuras 18 e 19).

Tabela 6- One-way Anova, monoaminas cerebrais separadas por secção do cérebro, resultados da análise das cabeças coletadas. Onde DF são os graus de liberdade, z é o escore e sig é o nível de significância, em que é considerado significativo quando $<0,05$

	Prosencéfalo			Mesencéfalo			Cérebro posterior		
	DF	Z	Sig	DF	Z	Sig	DF	Z	Sig
NA									
Tratamento	1	,099	,755	1	,314	,085	1	,318	,575
Stress Test	1	,010	,921	1	,007	,933	1	,791	,377
Treat*Stress	1	1,583	,213	1	,429	,515	1	1,116	,295
DOPAC									
Tratamento	1	3,049	,086	1	,469	,496	1	,195	,660
Stress Test	1	6,093	,016	1	10,411	,002	1	5,700	,020
Treat*Stress	1	,023	,879	1	,224	,638	1	,018	,895
DA									
Tratamento	1	1,357	,249	1	,210	,648	1	2,234	,140
Stress Test	1	3,045	,086	1	,532	,469	1	,066	,798
Treat*Stress	1	1,851	,179	1	,564	,456	1	,270	,605
5HIAA									
Tratamento	1	,897	,347	1	,291	,592	1	4,486	0,38
Stress Test	1	1,320	,255	1	,344	,559	1	,825	,367
Treat*Stress	1	1,031	,314	1	,486	,489	1	,406	,526
5HT									
Tratamento	1	,287	,594	1	,270	,605	1	,049	,825
Stress Test	1	,403	,528	1	,242	,624	1	,615	,436
Treat*Stress	1	,117	,734	1	,251	,618	1	,560	,457
DOPAC/ DA Ratio									
Tratamento	1	1,319	,255	1	,193	,662	1	2,099	,153
Stress Test	1	3,182	,080	1	4,316	,042	1	6,765	,012
Treat*Stress	1	,269	,606	1	,129	,721	1	,103	,749
5HIAA/ 5HT Ratio									
Tratamento	1	,700	,406	1	1,379	,245	1	4,150	,046
Stress Test	1	,038	,846	1	3,123	,082	1	,011	,917
Treat*Stress	1	1,034	,313	1	,066	,798	1	,001	,982

Tabela 7. Média das monoaminas por parte do cérebro e tratamento na dourada, em que está demonstrado a média seguido do erro padrão, para cada tratamento e cada monoamina analisada.

	Prosencéfalo	Mesencéfalo	Cérebro Posterior
DA			
Tratamento	83,41 ± 2,48	69,13 ± 2,93	55,41 ± 1,74
Controlo	79,4 ± 2,51	71,0 ± 2,79	59,0 ± 1,61
5HT			
Tratamento	908,14 ± 36,24	489,46 ± 20,37	396,8 ± 13,68
Controlo	937,47 ± 40,13	504,7 ± 20,62	392,64 ± 12,82
DOPAC			
Tratamento	17,33 ± 1,06	8,13 ± 0,40	3,81 ± 0,24
Controlo	15,05 ± 0,83	7,8 ± 0,35	3,68 ± 0,16
5HIAA			
Tratamento	346,38 ± 15,25	136,09 ± 5,64	122,33 ± 5,17
Controlo	327,46 ± 13,0	131,81 ± 5,50	108,9 ± 3,60
Razão de DOPAC/DA			
Tratamento	20,71 ± 1,07	12,21 ± 0,74	7,0 ± 0,46
Controlo	19,06 ± 0,97	11,69 ± 0,96	6,27 ± 0,25
Razão de 5HIAA/5HT			
Tratamento	38,97 ± 1,69	28,04 ± 0,72	31,12 ± 1,1
Controlo	36,78 ± 1,98	26,7 ± 0,91	28,19 ± 0,89

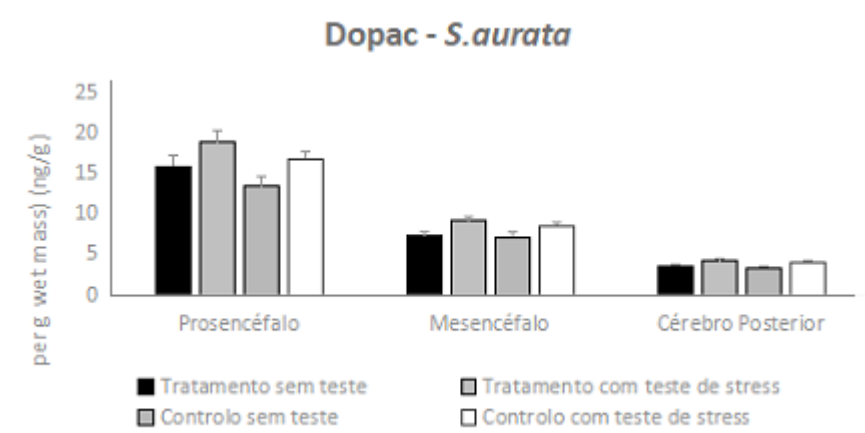


Figura 18. Média de Dopac nas 3 zonas cerebrais, com e sem teste de stress, separados por tratamento, com erro padrão.

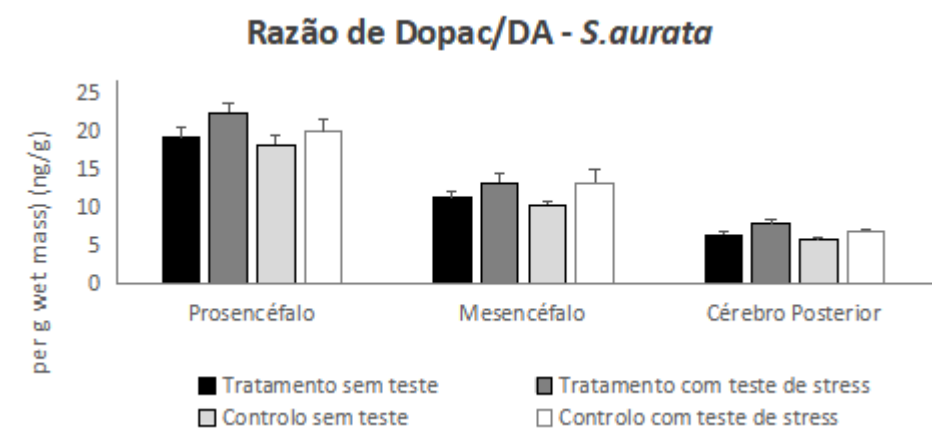


Figura 19. Média da razão de Dopac/DA com e sem teste de stress, separados por tratamento no mesencéfalo e cérebro posterior, com erro padrão.

b) Sargos

Na espécie *Diplodus sargus*, houve diferença significativa nos indivíduos que passaram por teste de stress, em 5HIAA no cérebro posterior e em razão de 5HIAA/5HT no mesencéfalo ($p=0.027$). E não houve nenhuma diferenças significativa entre os tratamentos. (tabelas 8 e 9 e figuras 20 e 21)

Tabela 8. One-way Anova, das monoaminas cerebrais separadas por secção do cérebro nos sargos. Onde DF são os graus de liberdade, z é o escore e sig é o nível de significância, em que é considerável significativo quando $>0,05$

	Prosencéfalo			Mesocéfalo			Cérebro posterior		
	DF	Z	Sig	DF	Z	Sig	DF	Z	Sig
NA									
Tratamento	1	,324	,577	1	,062	,807	1	,021	,886
Stress Test	1	1,683	,213	1	,379	,547	1	3,325	,087
Treat*Stress	1	,420	,526	1	,027	,871	1	,206	,656
DOPAC									
Tratamento	1	,247	,626	1	2,146	,162	1	2,720	,119
Stress Test	1	,690	,419	1	,002	,969	1	3,106	,097
Treat*Stress		,000	,999	1	,723	,408	1	,011	,917
DA									
Tratamento	1	,124	,730	1	1,302	,349	1	,060	,809
Stress Test	1	2,797	,114	1	1,048	,321	1	3,855	,067
Treat*Stress	1	,197	,663	1	2,248	,153	1	1,572	,228
5HIAA									
Tratamento	1	1,237	,283	1	,933	,349	1	,177	,679
Stress Test	1	3,674	,073	1	1,265	,277	1	6,069	,025
Treat*Stress	1	,063	,804	1	3,373	,085	1	3,397	,084
5HT									
Tratamento	1	,037	,850	1	2,726	,118	1	,064	,804
Stress Test	1	,300	,591	1	,978	,337	1	,673	,424
Treat*Stress	1	,002	,966	1	,013	,909	1	,956	,343
DOPAC/ DA Ratio									
Tratamento	1	,220	,646	1	,018	,896	1	3,603	,076
Stress Test	1	,001	,976	1	,420	,526	1	,006	,941
Treat*Stress	1	,309	,586	1	,089	,769	1	4,155	,058
5HIAA/ 5HT Ratio									
Tratamento	1	,549	,469	1	1,362	,260	1	,059	,810
Stress Test	1	1,708	,210	1	5,902	,027	1	1,768	,202
Treat*Stress	1	,371	,551	1	2,884	,109	1	1,199	,290

Tabela 9. Média das monoaminas por parte do cérebro e tratamento nos sargos, em que está demonstrado a média seguido do erro padrão, para cada tratamento e cada monoamina analisada.

	Prosencéfalo	Mesencéfalo	Cérebro Posterior
DA			
Tratamento	49,48 ± 4,60	51,03 ± 2,02	37,01 ± 2,99
Controlo	46,71 ± 7,31	45,67 ± 5,09	35,99 ± 3,28
5HT			
Tratamento	789,1 ± 49,90	362,84 ± 22,98	192,02 ± 10,91
Controlo	807,07 ± 80,08	305,94 ± 22,0	186,95 ± 17,91
5HIAA			
Tratamento	530,10 ± 42,29	241,32 ± 13,22	155,01 ± 10,79
Controlo	467,17 ± 36,05	224,14 ± 11,38	148,46 ± 14,91
Razão de 5HIAA/5HT			
Tratamento	75,03 ± 13,50	68,43 ± 4,04	82,87 ± 6,85
Controlo	61,98 ± 7,87	75,79 ± 6,43	80,53 ± 5,99

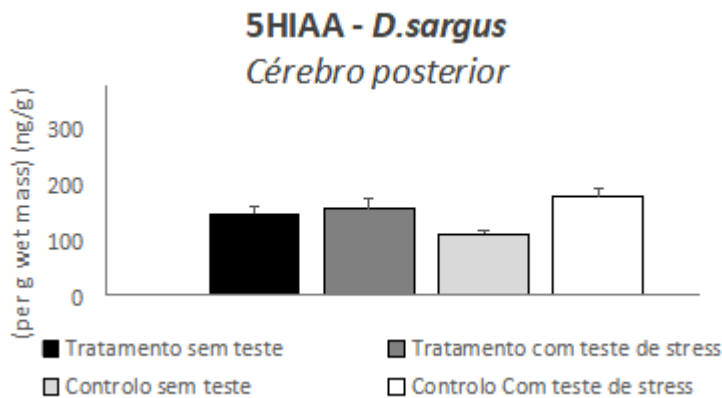


Figura 20. Média de 5HIAA no cérebro posterior dos Sargos, separados por tratamento e teste de stress, com erro padrão.

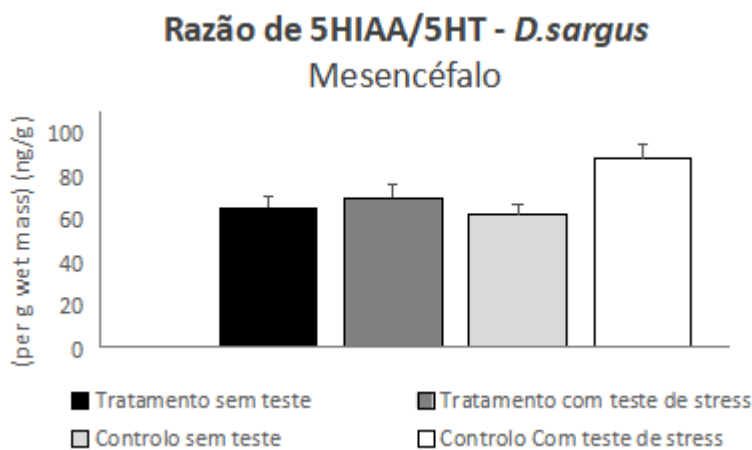


Figura 21. Razão de 5HIAA/5HT no mesencéfalo dos Sargos, separados por tratamento e se passaram ou não por teste de stress, com erro padrão.

3.4. Amostragem e análises bioquímicas

A sobrevivência dos peixes nos três ensaios foi de 100 %.

Quando chegaram os peixes tinham $8,7g \pm 2,0$ (os valores são média $\pm$ desvio padrão), e, no final, no primeiro tratamento tinham $18,32g \pm 2,77$. Sendo a média do tratamento com estimulação tátil $18,82g \pm 3,0$ e $17,82g \pm 2,4$ no controlo. No segundo ensaio os peixes tinham um peso final de $33,70g \pm 4,3$ respetivamente para o tratamento com estimulação tátil $31,56g \pm 4,1$ e $35,85g \pm 3,4$ para o controlo. Juntando os ensaios, a média das douradas foi de $22,02g \pm 6,48$ no tratamento e $22,45g \pm 8,38$ no controlo. Não tendo resultados estatísticos significativos $t(62)=0,10$, $p=0,91$.

No último ensaio, o ensaio com sargos, o peso final era de $40,3g \pm 5,6$ no tratamento com estimulação tátil e $37,8g \pm 5,1$ para o controlo. Também não havendo diferenças significativas $t(18)=1,18$, $p=0,32$.

3.4.1 Composição Proximal

Nas douradas não houve nenhum valor significativo. Estes valores estão demonstrados na figura 22 e na tabela 10.

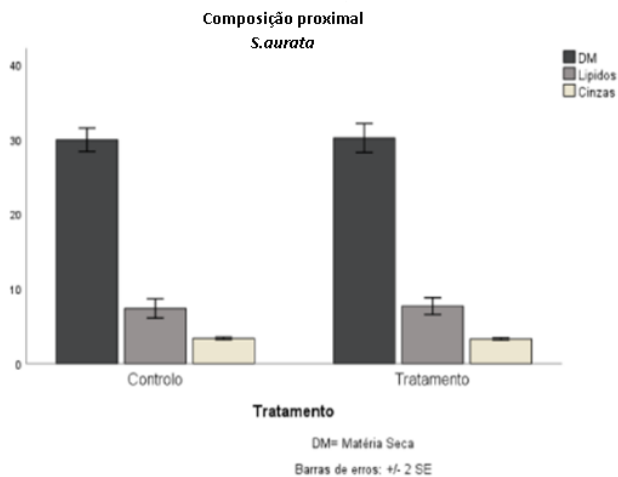


Figura 22. Resultado com as médias das 3 análises da composição proximal feitas, Matéria seca, Lípidos e Cinzas na dourada, com erro padrão.

Tabela 10. Teste-T para análise proximal com erro padrão, na dourada.

DM			
	Média	Z	Sig
Tratamento	30,14 ± 0,96	0,139	0,714
Controlo	29,89 ± 0,79		
Cinzas			
	Média	Z	Sig
Tratamento	3,31 ± 0,76	1,006	0,333
Controlo	3,39 ± 0,92		
Lípidos			
	Média	Z	Sig
Tratamento	7,70 ± 0,56	0,085	0,775
Controlo	7,40 ± 0,65		

Nos sargos a diferença entre tratamentos e controlo na matéria seca foi significativa ($p=0.001$), demonstrado na figura 23 e na tabela 11.

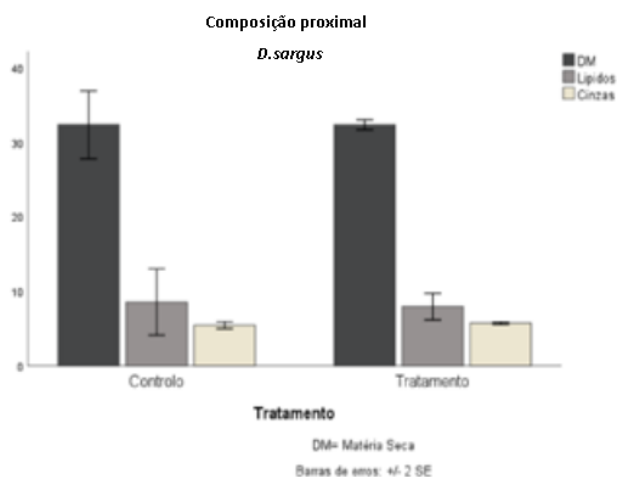


Figura 23. Resultado com as médias das 3 análises da composição proximal feitas, Matéria seca, Lípidos e Cinzas no sargo, com erro padrão.

Tabela 11- Teste-T para análise proximal no sargo, com erro padrão.

DM			
	Média	Z	Sig
Tratamento	32,28 ± 0,33	160,236	0,001
Controlo	32,28 ± 2,27		
Cinzas			
	Média	Z	Sig
Tratamento	5,71 ± 0,72	7,602	0,07
Controlo	5,45 ± 0,23		
Lípidos			
	Média	Z	Sig
Tratamento	7,93 ± 0,89	6,527	0,084
Controlo	8,54 ± 2,22		

4. Discussão

O objetivo deste trabalho foi testar uma forma de enriquecimento ambiental, útil para melhorar o bem-estar dos peixes de aquacultura uma vez que estes são frequentemente sujeitos a agentes de stress, que acarretam, constrangimentos não só para os peixes como, também, para a produtividade da indústria. O efeito do stress nos peixes pode traduzir-se com uma diminuição do crescimento e, em casos mais severos, num aumento da mortalidade, resultando na diminuição da qualidade e eficiência da produção (Broom, 1998; Southgate et al., 2001; FSBI, 2002; Kumar et al., 2012). O método testado neste trabalho para mitigação dos efeitos do stress é a estimulação tátil, já é conhecido o seu efeito positivo em mamíferos. Está agora a ser testada em peixes, já existindo alguns estudos que comprovam efeitos positivos como a diminuição da agressão em tilápia-do-Nilo (Bolognesi et al., 2019; Gauy et al., 2022) e diminuição do stress em peixes cirurgiões dos recifes (Soares et al., 2011). Neste estudo, os resultados não foram fora do esperado, mas há uma diferença nas respostas de cada espécie.

4.1 Comportamento:

No atravessamento houve diferença entre os dias da observação e os tratamentos nas douradas, o que leva a concluir que houve um número crescente de atravessamentos ao longo do tempo, o que pode dever-se à introdução inicial do aparato e desconfiança por parte dos peixes, o que é comprovado pelo número muito reduzido observado nos primeiros dias, que é depois ultrapassado com o tempo e com a estratégia de se utilizar alternadamente cada lado para fornecimento do alimento, o que funciona como estímulo para os peixes atravessarem o aparato para ir buscar alimento. Com o passar do tempo, começam a atravessar diversas vezes sem nenhum estímulo, mostrando um processo de aprendizado (Bolognesi et al., 2019).

Nos Sargos não houve nenhuma diferença significativa, mas como temos um número pequeno de

amostra, é importante observar os gráficos para a interpretação. Em ambas as espécies, o número de atravessamentos foi sempre maior no controlo em comparação ao tratamento com os fios. Isto pode ser explicado porque no controlo o aquário está muito mais livre e sem nada que sirva como um obstáculo que cause alguma dificuldade em ver ou/e atravessar para o outro lado, enquanto com o aparato de estimulação, apesar de os cílios serem transparentes, dificultam a visão do outro lado e também são encarados como um obstáculo. Este maior número de atravessamentos no controlo, também foi visto com o teste em outra espécie, como na tilápia-do-nilo (Gauy et al, 2021; 2022; 2023). Quanto ao tempo de permanência no aparato, não houve diferenças estatísticas. Não foi observado um tempo grande de permanência no aparato, eles atravessavam exclusivamente.

Noutro tipo de comportamentos como as ameaças e agressões, definidos como interações agressivas, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Apesar de ter sido possível observar que a média de interações agressivas nas douradas foi maior no controlo: 27,8 vs 21,51 no tratamento, enquanto nos sargos foi maior no tratamento: 52,4 vs 25,7 no controlo. Durante a análise dos vídeos foram ainda observados alguns comportamentos que parecem ser de defesa do aparato, especialmente nos sargos, muito mais do que nas douradas. Observou-se algumas vezes que um peixe ficava a “tomar conta” do aparato e sempre que algum atravessava ele mostrava um comportamento mais agressivo (sem necessariamente uma agressão efetiva) e o expulsava para o outro lado. Isso pode explicar o número maior de interações agressivas nos aquários com tratamento de estimulação tátil nos sargos, pois é uma espécie mais agressiva em cativeiro (Caballero e Castro-Hdez, 2003, Castro e Caballero, 1998, Karakatsouli et al., 2007). Estudos anteriores sobre o comportamento agressivo de sargos em aquários (Castro e Caballero, 1998, Caballero e Castro-Hdez, 2003) mostraram que, em pequenos grupos cativos, hierarquias de dominância tendem a se desenvolver (Goncalves et al., 2021). Além disso, os sargos, por serem mais parasitados e terem um contacto diferente com o substrato (na natureza com o bentos) são referenciados como visitantes ou clientes de limpadores como por exemplo, *Labroides dimidiatus*, *Bodianus rufu* e *Symphodus melanocercus* que também são considerados limpadores facultativos (Zander et al., 2002; Neto et al., 2015), logo seria de esperar que o aparato se torne importante para eles, e por isso aumente a interação agressiva. Apesar de já haver estudos com tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) em que a agressividade diminui (Bolognesi et al., 2019; Gauy et al., 2022), esse efeito não foi visto nesta experiência. Porém, são espécies biologicamente e com comportamentos muito diferentes, os ciclídeos são espécies muito agressivas e dominantes (Barlow, 2008; Gonçalves-de-Freitas et al., 2019).

4.2. Cortisol:

O cortisol é a principal hormona relacionado com o stress, o que o torna o indicador mais importante de exposição ao stress (López-Patiño et al., 2021). Nas comparações entre tratamentos e teste de stress, vimos que as douradas que estavam no tratamento com estimulação tátil, tiveram um aumento menor do cortisol quando passaram por teste de stress do que as que estavam no controlo, sugerindo que a estimulação tátil foi benéfica, apresentando uma maior resiliência ao stress. O mesmo foi observado em peixes recifais (Soares et al., 2011). Apesar de o número de atravessamentos ter sido mais baixos, ainda sim podemos

observar uma resposta no cortisol.

Já nos sargos, o nível de cortisol era maior nos peixes que estavam no aquário com os aparatos de tratamento de estimulação tátil, o que se pode relacionar ao fato de defenderem os aparatos, se tornarem mais territoriais. Mas que também teve um número de atravessamentos baixo. O que mostra que cada espécie tem a sua resposta e adaptações e um estimulador não levará necessariamente a mesma resposta para todas as espécies de peixes. Essa conclusão também pode ter sido pelo fato dos poucos indivíduos e se for testado com um número maior de réplicas pode haver uma mudança nesses resultados. Essa diminuição de cortisol também foi vista por Soares et al (2011), que descobriu que a estimulação tátil reduziu os níveis de cortisol em peixes recifais. Antes essa diminuição era vista em humanos com tipos diferentes de estimulação tátil como toque e massagem (Field et al., 1996; Field et al., 2005; Jane et al., 2009; Ditzen et al., 2007; Rehn et al., 2014) e em ratos por estimulação neonatal (Freitas et al., 2015).

4.3. Monoaminas cerebrais:

Quanto aos indivíduos que passaram por teste de stress, houve uma diferença significativa nas douradas, em DOPAC (prosencéfalo, mesocéfalo e cérebro posterior) e em razão de DOPAC/DA (mesocéfalo e cérebro posterior). Nos sargos, foi observada uma diferença significativa no composto 5HIAA no cérebro posterior e na razão de 5HIAA/5HT do mesocéfalo. Já na comparação entre tratamentos, nas douradas, o composto que houve diferença significativa foi 5HIAA em cérebro posterior e razão de 5HIAA/5HT no cérebro posterior, nos sargos não houve nenhuma diferença significativa.

Em Abreu et al., (2018), os clientes expostos ao peixe limpador, tiveram 5HIAA do prosencéfalo e mesocéfalo mais altos, DOPAC mais alto e também Dopamina (DA)

ou seja, os compostos que deram aumento nesse estudo foram os mesmos. As monoaminas serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e dopamina (3,4-di-hidroxifenetilamina, DA) são importantes neurotransmissores/neuromoduladores monoaminérgicos no sistema nervoso central (SNC).

A estimulação tátil está associada ao aumento nos níveis de serotonina (Field et al, 2005), estudos mostram que é vista uma diminuição na agressão após a estimulação de produção de serotonina (Lepage et al. 2005), e um aumento na agressão em ciclídeos após a inibição do sistema serotoninérgico (Adams et al., 1996). Juntos, esses dados demonstram que níveis elevados de serotonina estão associados a redução de agressividade nos animais.

4.4 Composição Proximal:

Os resultados obtidos para a composição proximal estão dentro do esperado para as espécies (Pateiro et al., 2020; Osorio et al., 2006; Shymaa et al., 2011). O valor de matéria seca apresentou diferenças significativas para os sargos, apesar da média ser a mesma: 32,38 tanto para o controlo quanto para o tratamento. Por tanto, podemos assumir que visto que a análise foi feita com a soma dos indivíduos de cada aquário pode não ter sido um resultado correto.

5. Conclusão

Esse estudo mostrou que a estimulação tátil teve efeito positivo sobre o bem-estar de peixes na aquacultura, mas é preciso mais estudos. Nas douradas, apesar de não haver muitas diferenças no comportamento, observamos um aumento da dopamina que é relacionado ao bem-estar visto em experiências com estimulação tátil, e vimos também que as douradas que estavam no tanque de controlo tiveram um aumento maior de cortisol após o teste de stress, o que pode significar que os indivíduos que estavam no tanque com o tratamento de estimulação tátil souberam lidar melhor com o stress, o que pode indicar que sim, a estimulação tátil prévia, pode diminuir a resposta ao stress nessa espécie. Já nos sargos os resultados são diferentes visto que é uma espécie que não é indiferente ao tratamento, pois é uma espécie que busca a limpeza na natureza, além de limpar como é o caso dos juvenis. Por isso, se tornaram mais defensivas em relação ao aparato. O que afirma que ambas as espécies reagem de forma diferentes ao aparato. O que pode estar relacionado ao seu modo de vida, ou pode ser devido ao facto de que tivemos um número de amostras muito pequenas, por ser inverno e não termos chances de conseguir mais peixes para usar na experiência. Trabalhos futuros deverão focar, em uma nova experiência com mais sargos para confirmar esse resultado, ou as alterações para esta espécie.

Temos também sempre que levar em conta que mesmo que tenhamos realizado o teste de stress para simular o aumento do mesmo, os animais na aquacultura podem estar mais estressados do que nas condições que o estudo foi feito, principalmente pela densidade dos tanques. Além de que no estudo foram usados apenas peixes juvenis, e no caso destas espécies, ainda eram todos machos. Por isso, é de se esperar que resultados diferentes ocorram em adultos.

Referências Bibliográficas

Abecasis D, Abecasis AR (2015) First report of cleaning behaviour in white sea bream (*Diplodus sargus*).

Mar Freshwat Behav Physiol 48: 71–75

- Abreu, M. S., Messias, J. P., Thörnqvist, P. O., Winberg, S., & Soares, M. C. (2018). Monoaminergic levels at the forebrain and diencephalon signal for the occurrence of mutualistic and conspecific engagement in client reef fish. *Scientific Reports*, 8(1), 7346.
- Abreu, M. S. D., Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T. A., Rosa, J. G. S. D., Gusso, D., ... & Barcellos, L. J. G. (2014). Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PloS one*, 9(7), e103232.
- Adams, C. F., Liley, N. R., & Gorzalka, B. B. (1996). PCPA increases aggression in male firemouth cichlids. *Pharmacology*, 53(5), 328-330.
- Adrio, F., Anadón, R., & Rodríguez-Moldes, I. (1999). Distribution of serotonin (5HT)-immunoreactive structures in the central nervous system of two chondrosteian species (*Acipenser baeri* and *Huso huso*). *Journal of Comparative Neurology*, 407(3), 333-348.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists*. Virginia: Association of Official Analytical Chemists, INC.
- Arechavala-Lopez, P., Cabrera-Álvarez, M. J., Maia, C. M., & Saraiva, J.L. (2021). Environmental enrichment in fish aquaculture: A review of fundamental and practical aspects. *Reviews in Aquaculture*, 14, 704–728.
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3-4), 199-235.
- Azmitia, E. C. (2007). Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *International review of neurobiology*, 77, 31-56.
- Bauchot, M. L. (1986). Sparidae. *Fishes of the Northern-Eastern Atlantic and the Mediterranean*, 2, 883-907.
- Barlow, G. (2008). *The cichlid fishes: nature's grand experiment in evolution*. Basic Books.
- Bernier, N. J., Bedard, N., & Peter, R. E. (2004). Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *General and comparative endocrinology*, 135(2), 230-240.
- Bolognesi, M. C., dos Santos Gauy, A. C., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2019). Tactile stimulation reduces aggressiveness but does not lower stress in a territorial fish. *Scientific Reports*, 9(1), 40.

- Braithwaite, V. A., & Ebbesson, L. O. E. (2014). Pain and stress responses in farmed fish. *The Scientific and Technical Review*, 33(1), 245-253.
- Broom, D. M. (1997). Welfare evaluation. *Applied Animal Behaviour Science*, 54(1), 21-24.
- Broom, D. M. (1991a). Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of animal science*, 69(10), 4167-4175.
- Broom, D.M. (1998). Welfare, stress and the evolution of feelings. *Adv. Study Behav.*, 27, 371-403
- Broom, D. M. (1991b). Assessing welfare and suffering. *Behavioural processes*, 25(2-3), 117-123.
- Brown, C. (2015). Fish intelligence, sentience and ethics. *Animal cognition*, 18(1), 1-17.
- Brown, C., Laland, K., & Krause, J. (2011a). *Fish cognition and behavior*. John Wiley & Sons.
- Brown, G. E., Ferrari, M. C., & Chivers, D. P. (2011b). Learning about danger: chemical alarm cues and threat-sensitive assessment of predation risk by fishes. *Fish cognition and behavior*, 59-80.
- Caballero, C., & Castro-Hdez, J. J. (2003). Effect of competitor density on the aggressiveness of juvenile white seabream (*Diplodus sargus cadenati* de la Paz, Bauchot and Daget, 1974). *Aggressive Behavior: Official Journal of the International Society for Research on Aggression*, 29(3), 279-284.
- Calone, R., Pennisi, G., Morgenstern, R., Sanyé-Mengual, E., Lorleberg, W., Dapprich, P., ... & Gianquinto, G. (2019). Improving water management in European catfish recirculating aquaculture systems through catfish-lettuce aquaponics. *Science of the total environment*, 687, 759-767.
- Castro, J. J., & Caballero, C. (1998). Dominance structure in small groups of juvenile white-seabream (*Diplodus sargus cadenati* de la paz, Bauchot and Daget 1974). *Aggressive Behavior: Official Journal of the International Society for Research on Aggression*, 24(3), 197-204.
- Cavallino, L., Rincón, L., & Scaia, M. F. (2023). Social behaviors as welfare indicators in teleost fish. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1050510.
- Charnetski, C. J., Riggers, S., & Brennan, F. X. (2004). Effect of petting a dog on immune system function. *Psychological reports*, 95(3_suppl), 1087-1091.

Chrousos, G. P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 311-335.

CHSRG - California Hatchery Scientific Review Group (2012) California Hatchery Review Report. US Fish and Wildlife Service and Pacific States Marine Fisheries Commission, online publication, 100 pp.

Coccaro, E. F., Lee, R., & Kavoussi, R. J. (2010). Aggression, suicidality, and intermittent explosive disorder: serotonergic correlates in personality disorder and healthy control subjects. *Neuropsychopharmacology*, 35(2), 435-444.

Conte, F. S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3-4), 205-223.

Damsgård, B., & Huntingford, F. (2012). Fighting and aggression. *Aquaculture and behavior*, 248-285.

D'Anna, G., Giacalone, V. M., Badalamenti, F., & Pipitone, C. (2004). Releasing of hatchery-reared juveniles of the white seabream *Diplodus sargus* (L., 1758) in the Gulf of Castellammare artificial reef area (NW Sicily). *Aquaculture*, 233(1-4), 251-268.

D'Anna, G., Giacalone, V. M., Fernández, T. V., Vaccaro, A. M., Pipitone, C., Mirto, S., ... & Badalamenti, F. (2012). Effects of predator and shelter conditioning on hatchery-reared white seabream *Diplodus sargus* (L., 1758) released at sea. *Aquaculture*, 356, 91-97.

Dawkins, M. S. (1998). Evolution and animal welfare. *The quarterly review of biology*, 73(3), 305-328.

de Abreu, M. S., Messias, J. P., Thörnqvist, P. O., Winberg, S., & Soares, M. C. (2018). The variable monoaminergic outcomes of cleaner fish brains when facing different social and mutualistic contexts. *PeerJ*, 6, e4830.

de Oliveira Fernandes, M., & Volpato, G. L. (1993). Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology & Behavior*, 54(2), 319-323.

Ditzen, B. et al. Effects of different kinds of couple interaction on cortisol and heart rate responses to stress in women. *Psychoneuroendocrinology* 32, 565–574 (2007).

dos Santos Gauy, A. C., Bolognesi, M. C., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2022). Long-term body tactile stimulation reduces aggression and improves productive performance in Nile tilapia groups. *Scientific Reports*, 12(1), 20239.

FAO. 2024. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action*. Rome.

FAO 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. Towards Blue Transformation. FAO .Rome.

FAO. 2006. The state of food and agriculture 2006. FAO .Rome.

FAWC (Farmed Animal Welfare Council), 1996. Report on the Welfare of Farmed Fish. Surbiton, Surrey

Feder, H. M. (1966). Cleaning symbiosis in the marine environment. *Symbiosis*, 1(S M), 327-380.

Fernandes, C. P. (2017). *The consumption of seafood in Portugal: preferences, knowledge and public perception* (Doctoral dissertation).

Field, T. (1995). Infants of depressed mothers. *Infant behavior & development*.

Field, T. M. (1996). Touch therapies for pain management and stress reduction. In R. J. Resnick & R. H. Rozensky (Eds.), *Health psychology through the life span: Practice and research opportunities* (pp. 313–321). *American Psychological Association*.

Field, T., Hernandez-Reif, M., Diego, M., Schanberg, S., & Kuhn, C. (2005). Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy. *International Journal of neuroscience*, 115(10), 1397-1413.

Figueiredo M, Morato T, Barreiros JP, Afonso P, Santos RS (2005) Feeding ecology of the white seabream, *Diplodus sargus*, and the ballan wrasse, *Labrus bergylta*, in the Azores. *Fisheries Research* 75: 107–119

Flagg, T. A., Nash, C. E., Beckman, B. R., Berejikian, B. A., Colt, J., Dickhoff, W. W., ... & Swanson, P. (1999). A conceptual framework for conservation hatchery strategies for Pacific salmonids.

Fox, E., Ridgewell, A., & Ashwin, C. (2009). Looking on the bright side: biased attention and the human serotonin transporter gene. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1663), 1747-1751.

Freitas, D., Antoniazzi, C. T., Segat, H. J., Metz, V. G., Vey, L. T., Barcelos, R. C., ... & Burger, M. E. (2015). Neonatal tactile stimulation decreases depression-like and anxiety-like behaviors and potentiates sertraline action in young rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47, 192-197.

FSBI (Fisheries Society of the British Isles), 2002. Fish Welfare. Breifing Report 2. Granta Information

systems. [http:// www.le.ac.uk/biology/fsbi/welfare.pdf](http://www.le.ac.uk/biology/fsbi/welfare.pdf)

Gauy, A.C.d.S.; Bolognesi, M.C.; Martins, G.D.; Gonçalves-de-Freitas, E. (2021), Preference and Motivation Tests for Body Tactile Stimulation in Fish. *Animals*, 11, 2042.

Gauy, A. C. D. S., Bolognesi, M. C., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2023). Body Tactile Stimulation Reduces the Effects of High Stocking Density on the Welfare of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fishes*, 8(6), 320.

Gesto, M., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2008). Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, β -naphthoflavone and benzo (a) pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 341-351.

Goncalves, A. R., de Sousa, L. C., & Almada, V. C. (2012). Dominance and growth of *Diplodus sargus* (Pisces: Sparidae) in small captive groups. *Applied Animal Behaviour Science*, 137(1-2), 96-100.

Gonçalves-de-Freitas, E., Bolognesi, M. C., Gauy, A. C. D. S., Brandão, M. L., Giaquinto, P. C., & Fernandes-Castilho, M. (2019). Social behavior and welfare in Nile tilapia. *Fishes*, 4(2), 23.

Greaves, K., & Tuene, S. (2001). The form and context of aggressive behaviour in farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 193(1-2), 139-147.

Greenberg, Neil, James A. Carr, and Cliff H. Summers. "Causes and consequences of stress." *Integrative and Comparative Biology* 42.3 (2002): 508-516.

Harmelin-Vivien, M. L., Harmelin, J. G., & Leboulleux, V. (1995). Microhabitat requirements for settlement of juvenile sparid fishes on Mediterranean rocky shores. In *Space Partition within Aquatic Ecosystems: Proceedings of the Second International Congress of Limnology and Oceanography held in Evian, May 25–28, 1993* (pp. 309-320). Springer Netherlands.

Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandøe, P., & Turnbull, J. F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of fish biology*, 68(2), 332-372.

Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., & Schreck, C. B. (1997) *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press.

Jane, S. W., Wilkie, D. J., Gallucci, B. B., Beaton, R. D., & Huang, H. Y. (2009). Effects of a full-body massage on pain intensity, anxiety, and physiological relaxation in Taiwanese patients with metastatic bone pain: a pilot study. *Journal of pain and symptom management*, 37(4), 754-763.

- Karakatsouli, N., Papoutsoglou, S. E., & Manolezou, G. (2007). Combined effects of rearing density and tank colour on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. *Aquaculture Research*, 38(11), 1152-1160.
- Kumar, P., Saurabh, S., Pal, A. K., Sahu, N. P., & Arasu, A. R. T. (2014). Stress mitigating and growth enhancing effect of dietary TRP in rohu (*Labeo rohita*, Hamilton, 1822) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(5), 1325–1338.
- Leitao, F., Santos, M. N., & Monteiro, C. C. (2007). Contribution of artificial reefs to the diet of the white sea bream (*Diplodus sargus*). *ICES Journal of Marine Science*, 64(3), 473-478.
- Lepage, O., Larson, E. T., Mayer, I., & Winberg, S. (2005). Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant–subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, 48(2), 233-242.
- Lesch, K. P., & Mössner, R. (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological psychiatry*, 44(3), 179-192.
- López-Patiño, M. A., Gesto, M., Conde-Sieira, M., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2014). Stress inhibition of melatonin synthesis in the pineal organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is mediated by cortisol. *Journal of experimental biology*, 217(8), 1407-1416.
- López-Patiño, M. A., Skrzynska, A. K., Naderi, F., Mancera, J. M., Míguez, J. M., & Martos-Sitcha, J. A. (2021). High stocking density and food deprivation increase brain monoaminergic activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animals*, 11(6), 1503.
- Losey Jr, G. S. (1987). Review article Cleaning Symbiosis. *Symbiosis*.
- Lima, A. C. M. (2019). Expressão comportamental de leitões durante a estimulação tátil: Um estudo de caso da interação humano-animal no setor de suinocultura da Universidade Federal Rural da Amazônia.
- Magalhães Silva, L. C. (2015). Avaliação dos benefícios da adoção de boas práticas de manejo no bem-estar de bezerras leiteiras.
- Mariani, S. (2001). Cleaning behaviour in *Diplodus* spp.: chance or choice? A hint for future investigations. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 81(4), 715-716.
- Martins, C.I.M., Galhardo, L., Noble, C. *et al.* Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol*

Biochem 38, 17–41 (2012).

Mazeaud, M. M., Mazeaud, F., & Donaldson, E. M. (1977). Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(3), 201-212.

Mendl, M. & Paul, E. S. (2004). Consciousness, emotion and animal welfare: insights from cognitive science. *Animal Welfare*, 13(S1), S17-S25

Morato, T., Afonso, P., Lourinho, P., Nash, R. D. M., & Santos, R. S. (2003). Reproductive biology and recruitment of the white sea bream in the Azores. *Journal of Fish Biology*, 63(1), 59-72.

Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastri, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream, volume 1. FAO, Rome.

Natale, F., Hofherr, J., Fiore, G., & Virtanen, J. (2013). Interactions between aquaculture and fisheries. *Marine Policy*, 38, 205-213.

Naylor, R., Fang, S., & Fanzo, J. (2023). A global view of aquaculture policy. *Food Policy*, 116, 102422.

Näslund, J., & Johnsson, J. I. (2016). Environmental enrichment for fish in captive environments: effects of physical structures and substrates. *Fish and Fisheries*, 17(1), 1-30.

Neto, J., Abecasis, D., Lamarfa, J., Sarmiento, D., & Almada, F. (2015). The ecological significance of juvenile *Diplodus sargus* as ectoparasite fish cleaners in the north-eastern Atlantic. In *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: XV European Congress of Ichthyology*.

Neto, J., Vieira, D., Abecasis, D., Marques, J., Gordo, L., Robalo, J. I., Bispo, R., Araújo, M. & Almada, F. (2019). Facultative cleaning behaviour of juvenile *Diplodus sargus* (Sparidae) and its ecological role in marine temperate waters. *Marine Ecology Progress Series*, 629, 165-177.

Oliveira, R. F., & Bshary, R. (2021). Expanding the concept of social behavior to interspecific interactions. *Ethology*, 127(10), 758-773.

Ozorio, R. O., Valente, L. M., Pousao-Ferreira, P., & Oliva-Teles, A. (2006). Growth performance and body composition of white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets with different protein and lipid levels. *Aquaculture Research*, 37(3), 255-263.

Pateiro, M., Munekata, P. E., Domínguez, R., Wang, M., Barba, F. J., Bermúdez, R., & Lorenzo, J. M. (2020).

Nutritional profiling and the value of processing by-products from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Drugs*, 18(2), 101.

Pauly, D., Froese, R., Palomares, M. L., Stergiou, K. I., & Apostolidis, C. (2008). Fish on line. *A guide to learning and teaching ichthyology using the FishBase Information System, Version, 2*.

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. *General and comparative endocrinology*, 44(4), 487-496.

Pollard D et al (2014) *Diplodus sargus*. The IUCN Red List of threatened species 2014: e.T170155A42736975.

Pottinger, T. G., & Pickering, A. D. (1992). The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology*, 41(3), 435-447.

Puglisi-Allegra, S., & Andolina, D. (2015). Serotonin and stress coping. *Behavioural brain research*, 277, 58-67.

Raleigh, M. J., McGuire, M. T., Brammer, G. L., Pollack, D. B., & Yuwiler, A. (1991). Serotonergic mechanisms promote dominance acquisition in adult male vervet monkeys. *Brain research*, 559(2), 181-190.

Rehn, T., Handlin, L., Uvnäs-Moberg, K., & Keeling, L. J. (2014). Dogs' endocrine and behavioural responses at reunion are affected by how the human initiates contact. *Physiology & behavior*, 124, 45-53.

Robinson, G. E., Fernald, R. D., & Clayton, D. F. (2008). Genes and social behavior. *science*, 322(5903), 896-900.

Rosecchi, E. (1985). L'alimentation de *Diplodus annularis*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris* et *Sparus aurata* (Pisces, Sparidae) dans le golfe du Lion et les lagunes littorales. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*, 49(3-4), 125-141.

Sala, E., & Ballesteros, E. (1997). Partitioning of space and food resources by three fish of the genus *Diplodus* (Sparidae) in a Mediterranean rocky infralittoral ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 152, 273-283.

Santos, M. N., Lino, P. G., Pousão-Ferreira, P., & Monteiro, C. C. (2006). Preliminary results of hatchery-reared seabreams released at artificial reefs off the Algarve coast (southern Portugal): a pilot study. *Bulletin of Marine Science*, 78(1), 177-184.

Schirmer, A., Jesuthasan, S., & Mathuru, A. S. (2013). Tactile stimulation reduces fear in fish. *Frontiers in*

behavioral neuroscience, 7, 167.

Schreck, C. B. (1981). Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. *Stress and fish*.

Shymaa, M., Shalaby, A. Y., Olfat, M. W., & Saoud, I. P. (2011). Growth, feed utilization and body composition of white sea bream *Diplodus sargus* juveniles offered diets with various protein and energy levels. *Journal of King Abdulaziz University-Marine Sciences*. 22: 3–17.

Soares, M. C., Oliveira, R. F., Ros, A. F., Grutter, A. S., & Bshary, R. (2011). Tactile stimulation lowers stress in fish. *Nature Communications*, 2(1), 534.

Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaïskou, N., Magoulas, A., Rossi, A. R., ... & Tsigenopoulos, C. S. (2007). Gilthead seabream—*Sparus aurata*. *Genetic Impact of Aquaculture Activities on Native Populations*. 2007

Southgate, P., & Wall, T. (2001). Welfare of farmed fish at slaughter. *In Practice*, 23(5), 277-284.

Teresa, F. B., & Freitas, E. G. D. (2011). Reproductive behavior and parental roles of the cichlid fish *Laetacara araguaiae*. *Neotropical Ichthyology*, 9, 355-362.

Tanaka, H., Frommen, J. G., Koblmüller, S., Sefc, K. M., McGee, M., Kohda, M., Awata, S., Hori, M., & Taborsky, M. (2018). Evolutionary transitions to cooperative societies in fishes revisited. *Ethology*, 124(11), 777e789.

Von Knorring, A. L., Söderberg, A., Austin, L., & Uvnäs-Moberg, K. (2008). Massage decreases aggression in preschool children: a long-term study. *Acta Paediatrica*, 97(9), 1265-1269.

Winberg, S., & Nilsson, G. E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(3), 597-614.

Zander, D. C., & Sötje, I. (2002). Seasonal and geographical differences in cleaner fish activity in the Mediterranean Sea. *Helgoland Marine Research*, 55, 232-241.

Zander, K., Risius, A., Feucht, Y., Janssen, M., & Hamm, U. (2017). Sustainable Aquaculture Products: Implications of Consumer Awareness and of Consumer Preferences for Promising Market Communication in Germany. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(1), 5–20.

Anexos

Gráficos por Teste de Stress:
S.aurata:

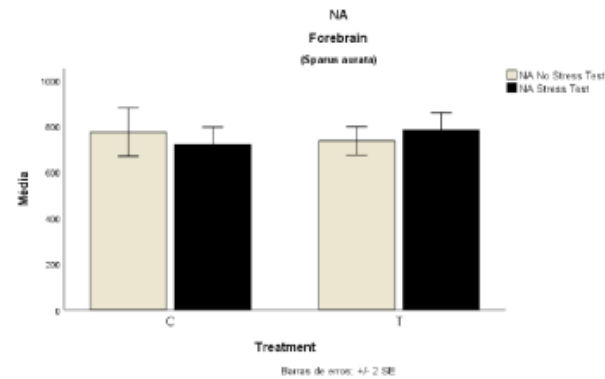


Figura S1. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em NA no prosencéfalo, nas douradas.

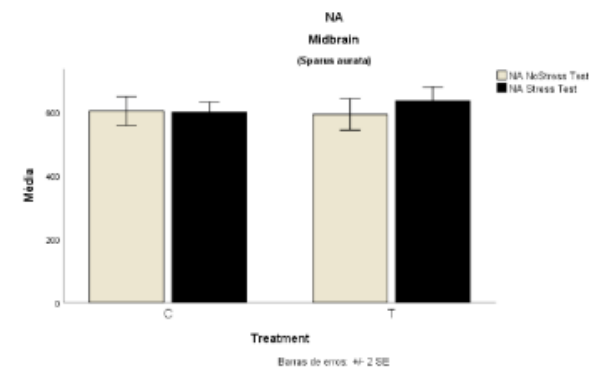


Figura S 2. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em NA no mesencéfalo, nas douradas.

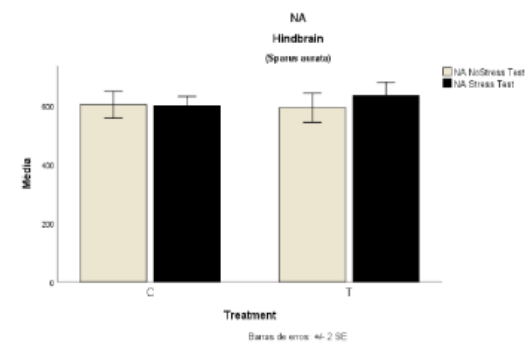


Figura S 3. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em NA no cérebro posterior, nas douradas.

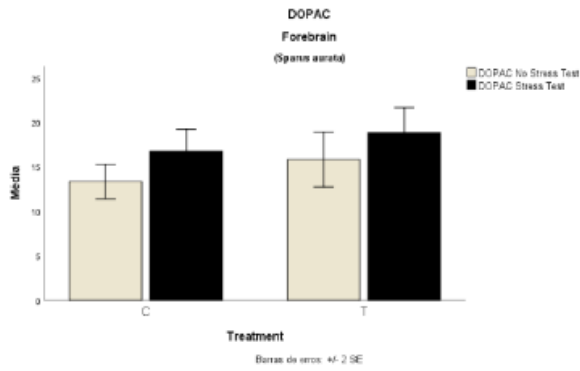


Figura S 4. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DOPAC no prosencéfalo, nas douradas.

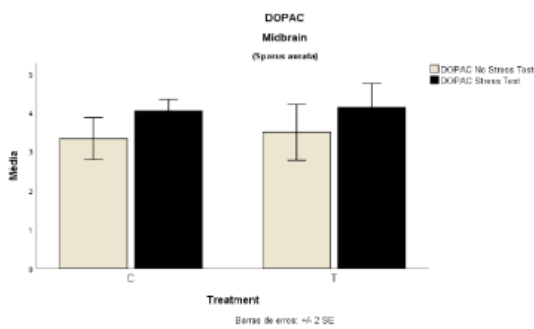


Figura S 5. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DOPAC no mesencéfalo, nas douradas.

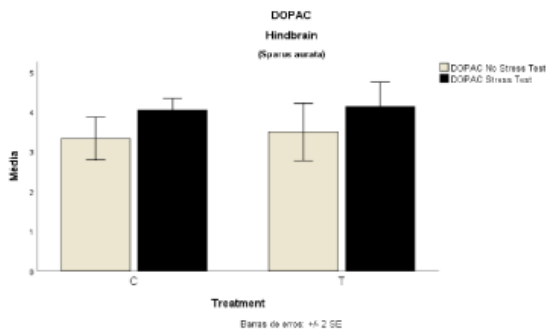


Figura S 6. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DOPAC no mesencéfalo, nas douradas.

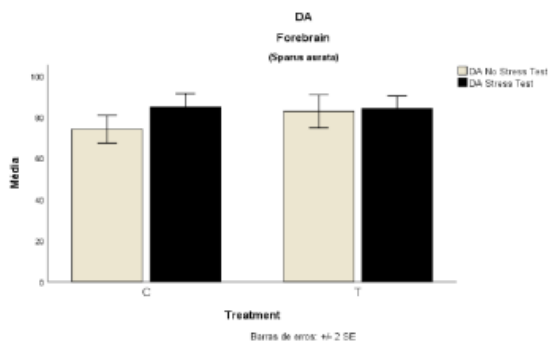


Figura S 7. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DA no prosencéfalo, nas douradas

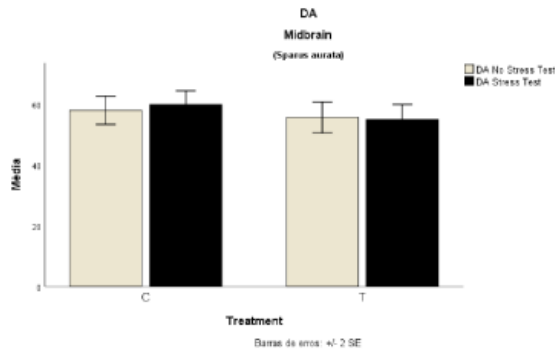


Figura S 8. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DA no mesencéfalo, nas douradas

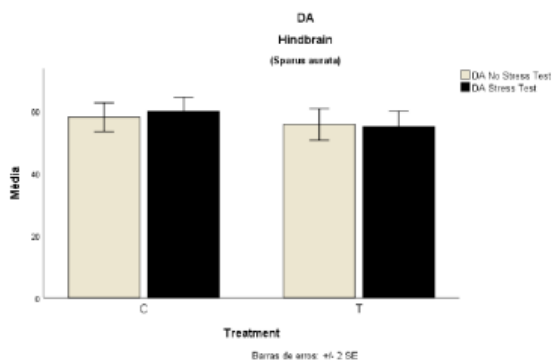


Figura S 9. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DA no cérebro posterior, nas douradas

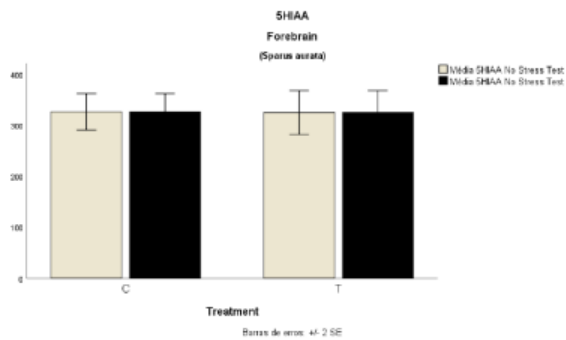


Figura S 10. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HIAA no prosencéfalo, nas douradas

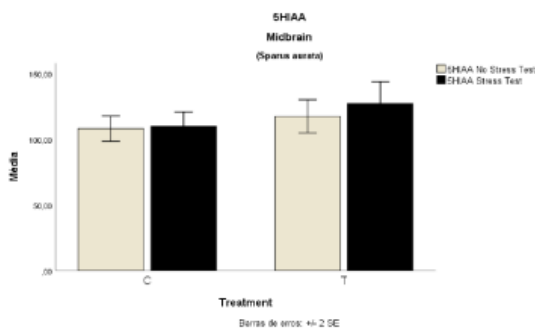


Figura S 11. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HIAA no mesencéfalo, nas douradas

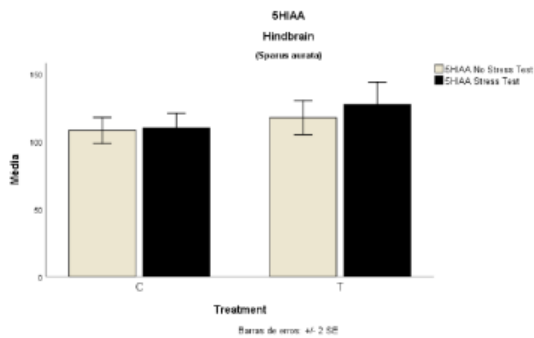


Figura S 12. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HIAA no cérebro posterior, nas douradas

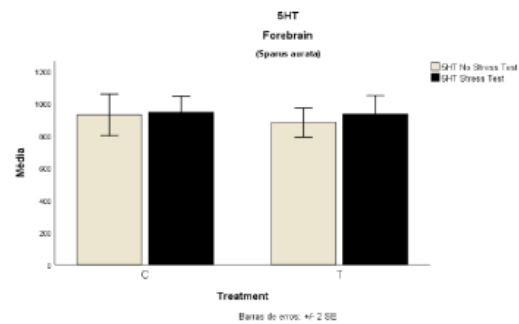


Figura S 13. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HT no prosencéfalo, nas douradas.

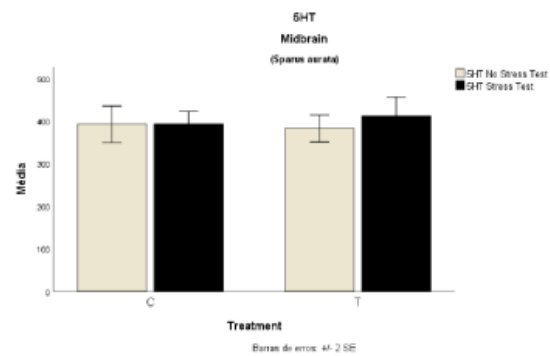


Figura S 14. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HT no mesencéfalo, nas douradas.

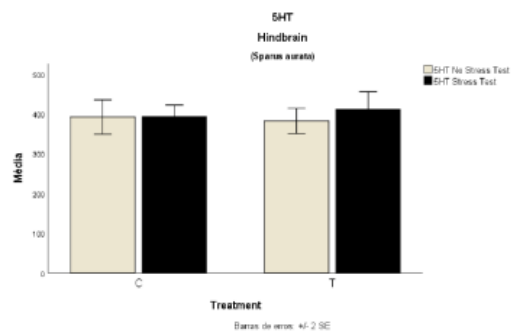


Figura S 151. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HT no cérebro posterior, nas douradas.

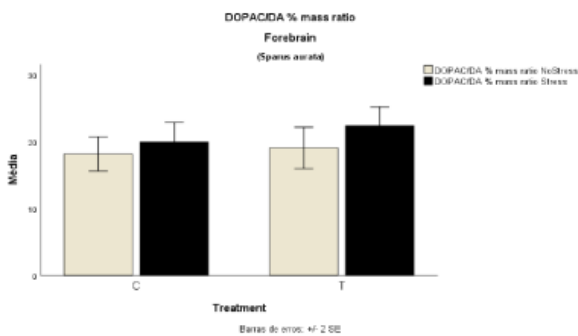


Figura S 16. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de DOPAC/DA no prosencéfalo, nas douradas.

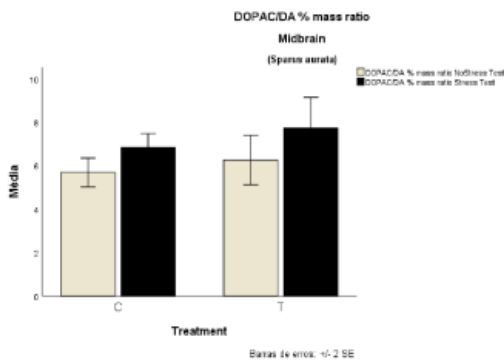


Figura S 17. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de DOPAC/DA no mesencéfalo, nas douradas.

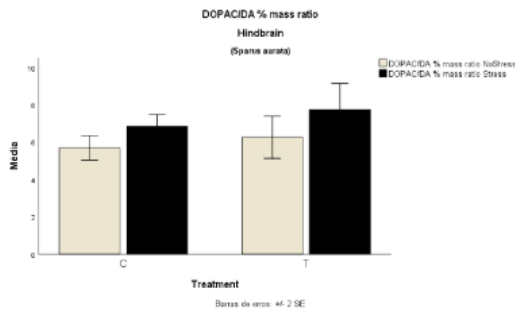


Figura S 18. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de DOPAC/DA no cérebro posterior, nas douradas.

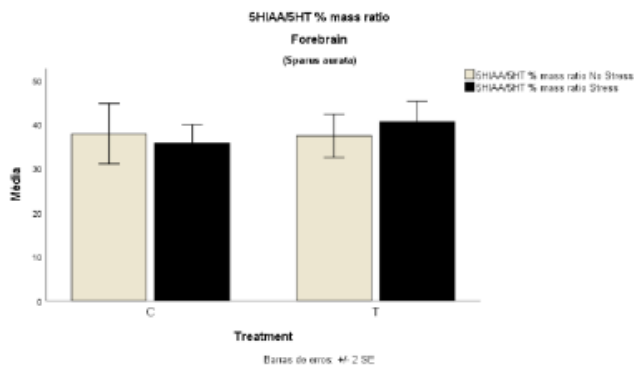


Figura S 19. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de 5HIAA/5HT no prosencéfalo, nas douradas.

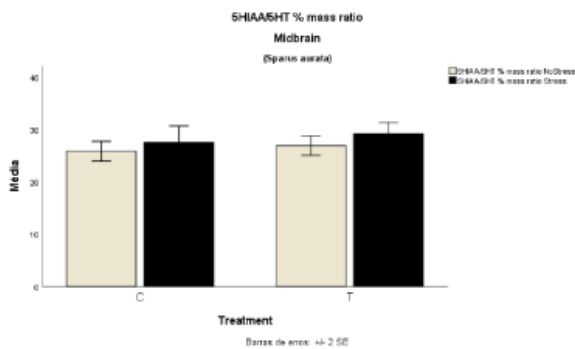


Figura S 20. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de 5HIAA/5HT no mesencéfalo, nas douradas.

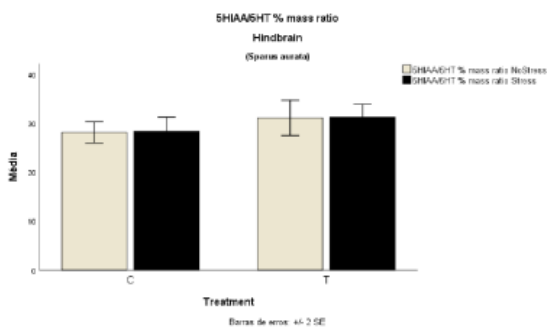


Figura S 21. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de 5HIAA/5HT no cérebro posterior, nas douradas.

D.Sargus:

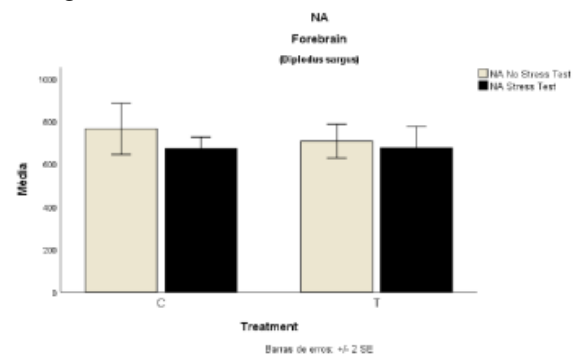


Figura S 22. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em NA no prosencéfalo, nos sargos.

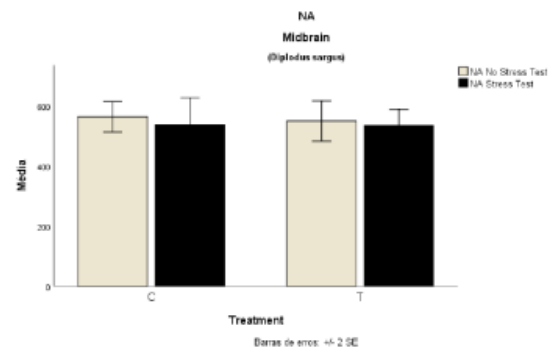


Figura S 23. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em NA no mesencéfalo, nos sargos.

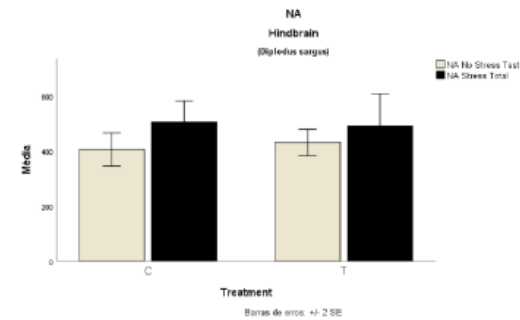


Figura S 24. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em NA no cérebro posterior, nos sargos.

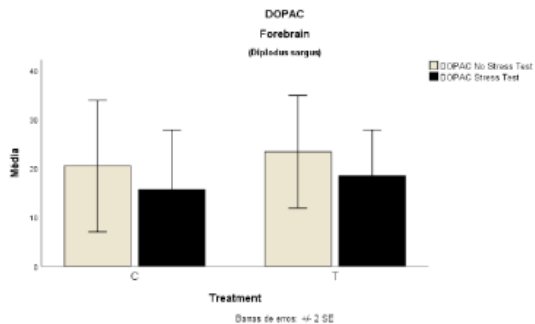


Figura S 25. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DOPAC no prosencéfalo, nos sargos.

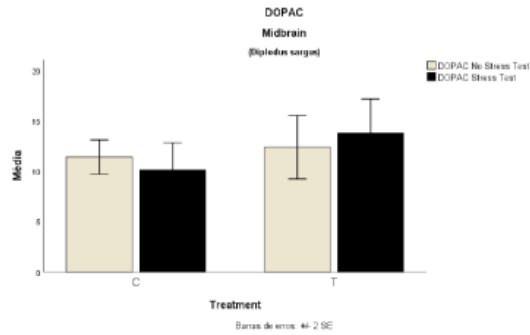


Figura S 26. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DOPAC no mesencéfalo, nos sargos.

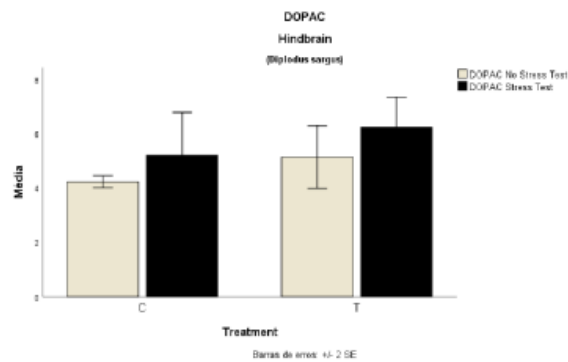


Figura S 27. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DOPAC no cérebro posterior, nos sargos.

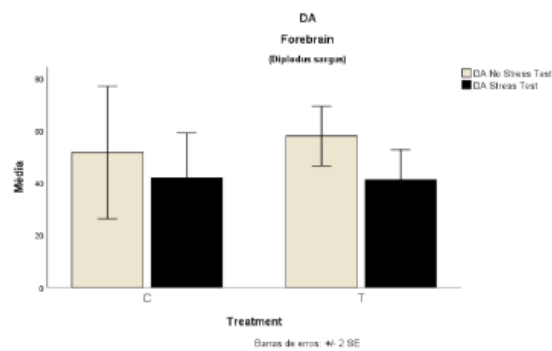


Figura S 28. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DA no prosencéfalo, nos sargos.

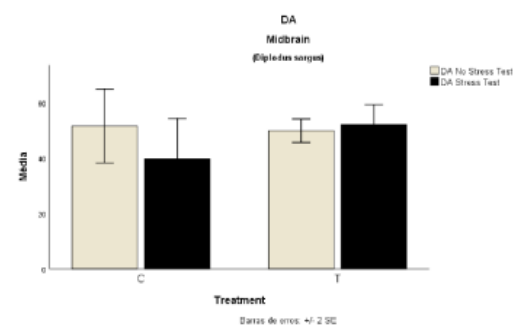


Figura S 29. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DA no mesencéfalo, nos sargos.

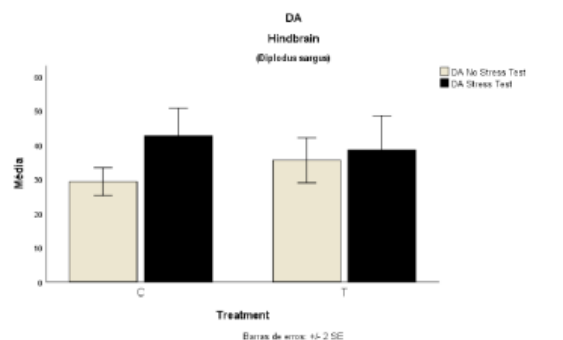


Figura S 3. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em DA no cérebro posterior, nos sargos.

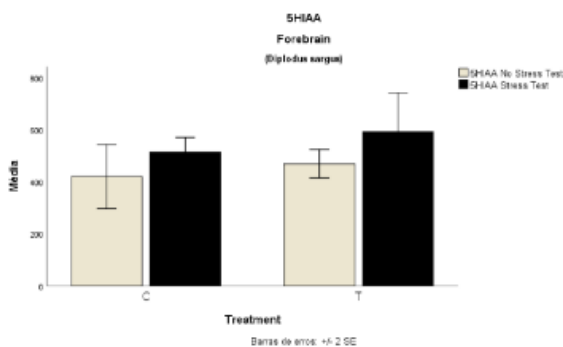


Figura S 31. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HIAA no prosencéfalo, nos sargos.

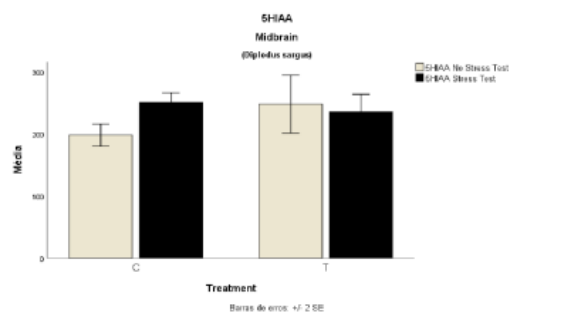


Figura S 32. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HIAA no mesencéfalo, nos sargos.

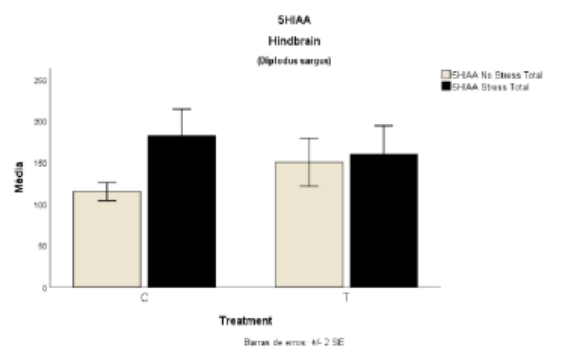


Figura S 33. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HIAA no cérebro posterior, nos sargos.

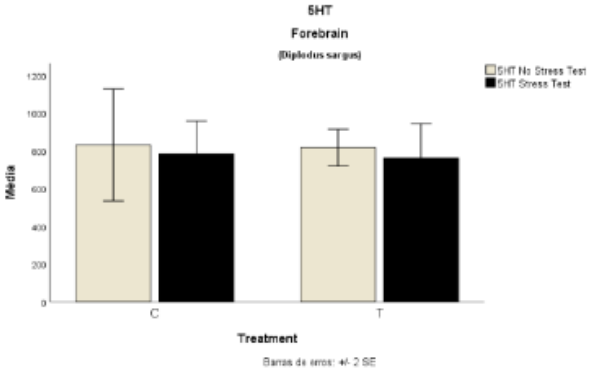


Figura S 34. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HT no prosencéfalo, nos sargos.

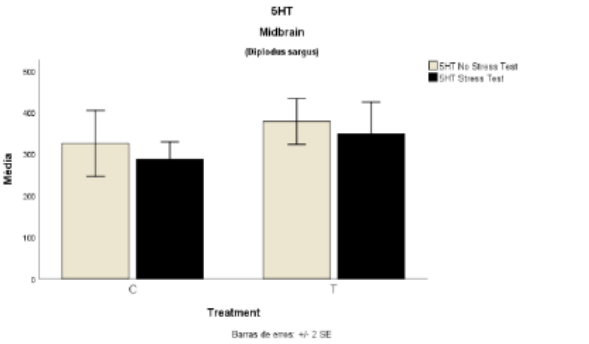


Figura S 35. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HT no mesencéfalo, nos sargos.

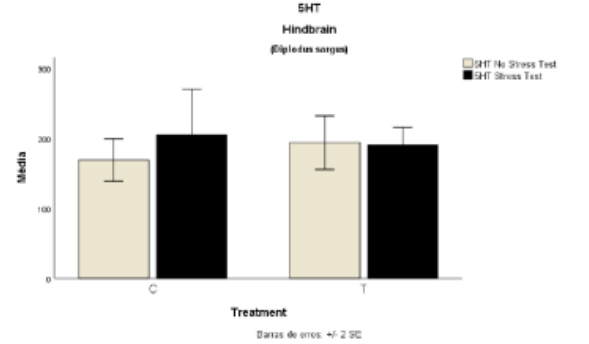


Figura S 36. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em 5HT no cérebro posterior, nos sargos.

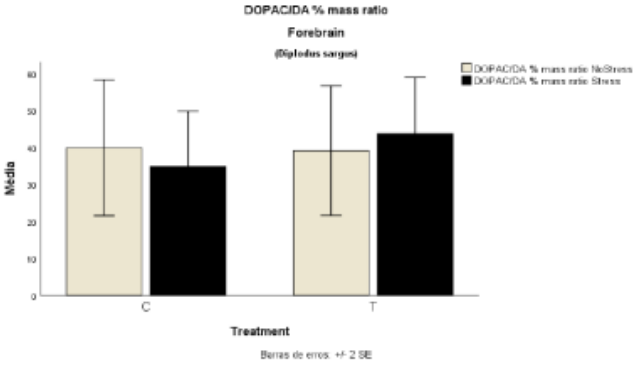


Figura S 37. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de DOPAC/DA no prosencéfalo, nos sargos.

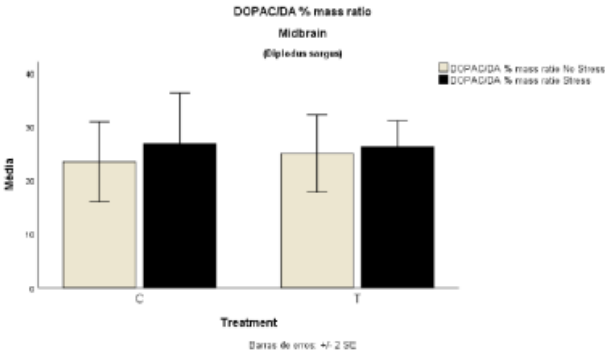


Figura S 38. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de DOPAC/DA no mesencéfalo, nos sargos.

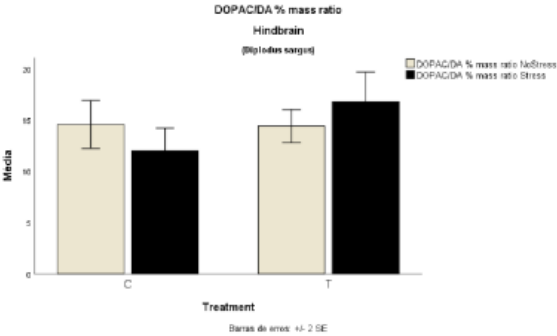


Figura S 39.. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de DOPAC/DA no cérebro posterior, nos sargos.

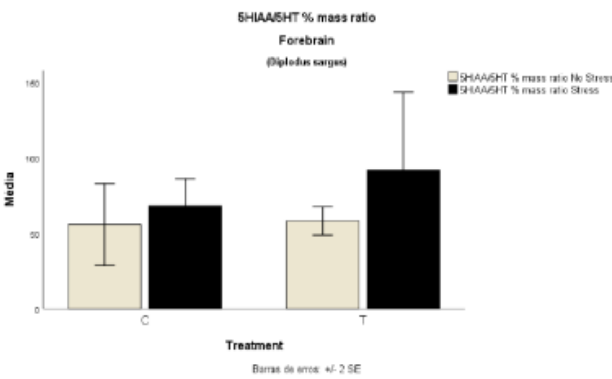


Figura S 40.. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de 5HIAA/5HT no prosencéfalo, nos sargos.

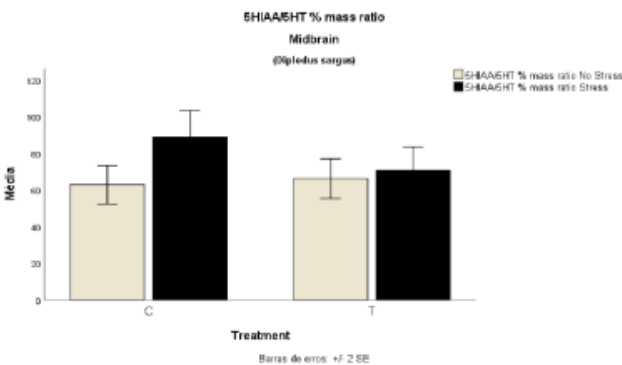


Figura S 41. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de 5HIAA/5HT no mesencéfalo, nos sargos.

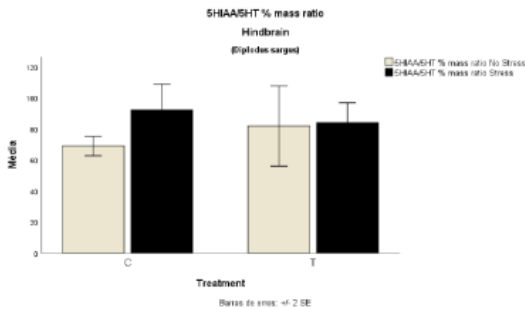


Figura S 42. Gráfico de comparação entre indivíduos que passaram pelo teste de stress e os que não passaram, divididos por tratamento e controlo em razão de 5HIAA/5HT no cérebro posterior, nos sargos.