

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

Campus de Botucatu



EFEITO DO ODOR DO PREDADOR NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE NA TILÁPIA-DO-NILO

Caio Akira Miyai

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto

Apoio



Botucatu -SP

2013

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu**

**EFEITO DO ODOR DO PREDADOR NAS RESPOSTAS DE
ESTRESSE NA TILÁPIA-DO-NILO**

Caio Akira Miyai

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu (SP), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre

Apoio

2011/03216-9

**Botucatu -SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Miyai, Caio Akira.

Efeito do odor de predador nas respostas de estresse na tilápia-do-Nilo / Caio Akira Miyai. – Botucatu : [s.n], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodrigo Egidio Barreto

Capes: 20404000

1. Tilápia (Peixe). 2. Predação (Biologia). 3. Stress (Fisiologia). 4. Peixe (Fisiologia).

Palavras-chave: Comportamento anti-predatório; Comunicação química; Estresse; Frequência respiratória; Odor de predador.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais e irmã, Paulo, Mary e Livia, pelo grande apoio e por sempre acreditarem em mim. Um enorme e mais que especial obrigado à Bruna, pela grande ajuda em tudo, desde os testes infinitos de glicose até as sugestões no manuscrito e sempre por estar ao meu lado, me apoiando e incentivando, mesmo nas horas mais difíceis. Ao Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto, pelos ensinamentos e orientação no desenvolvimento e execução do presente estudo e em toda a minha formação acadêmica. Gostaria de agradecer também meus amigos e colegas acadêmicos, Fábio e Cândido pelas conversas, discussões e enorme contribuição na coautoria do projeto. À “veterana” Renata, Ana Livia e Camila, pelos bons momentos de descontração e grande ajuda nos experimentos. Às meninas lá do lab. (Grazi, Paty, Mônica, Carol e Fernanda), por sempre nos emprestar todo tipo de equipamento e litros de água sanitária. Ao Jorge e seus churrascos, com muitas conversas e risadas (sobre ciência, claro!). Ao Hélio, Tardivo e professora Clélia, pelo grande auxílio nos experimentos e análises de cortisol e glicose. Por fim, à Rosemeire, pelo grande favor em relação à conclusão da ficha catalográfica e ao César, da piscicultura Poletini, pela doação dos peixes utilizados no presente estudo.

Sumário

| | |
|--|----|
| Resumo | 2 |
| 1. Introdução..... | 3 |
| 2. Materias e métodos | 7 |
| 2.1. Animais e condições de estoque..... | 7 |
| 2.2. Delineamento Experimental | 7 |
| 2.3. Procedimentos gerais | 10 |
| 2.4. Análise dos dados | 13 |
| 3. Resultados..... | 14 |
| 4. Discussão | 18 |
| 5. Referências bibliográficas..... | 22 |

Resumo

Diversas espécies de peixes exibem respostas antipredatórias quando expostas a substâncias químicas que indicam risco de predação. Uma dessas substâncias é o odor de um possível predador que pode induzir respostas de defesa na presa em potencial. No presente estudo, mostramos que as pistas químicas contidas no odor de peixe predador induzem respostas de defesa e resposta aguda primária de estresse em coespecíficos dessa presa. A tilápia-do-Nilo quando exposta ao odor de predador diminuiu a movimentação e aumentou a taxa respiratória, mas não houve aumento nos níveis plasmáticos de cortisol e glicose. Embora o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal não ter sido ativado, a resposta respiratória sugere um ajuste antecipatório para preparar o corpo para uma resposta defensiva metabolicamente mais exigente, como fugir ou enfrentar o predador.

Palavras chave: Comportamento antipredatório; Comunicação química; Odor de predador; Estresse; Frequência respiratória

1. Introdução

Em situações de interação presa-predador, a capacidade de reconhecer antecipadamente a ameaça de um predador em potencial tem papel fundamental na sobrevivência da presa para qualquer espécie animal (Endler, 1986). A detecção precoce da presença de um predador pode ser considerada o primeiro passo do mecanismo antipredatório, pois permite que a presa tome medidas necessárias para se livrar da ameaça. Isso não difere em sistemas aquáticos, nos quais as presas avaliam o risco de predação utilizando-se de indicadores ambientais. Tais indicadores estão diretamente associados ao universo sensorial desses animais, sendo comumente estímulos elétricos (Franchina & Stoddard, 1998), visuais (Barreto et al., 2003; Jordão, 2004), químicos (Giaquinto & Volpato, 2001; Ide et al., 2003; Barreto et al., 2010; Barbosa et al., 2010).

Considerando os sinais químicos, são ricas as fontes de informações sobre o ambiente, principalmente em ambientes aquáticos, no qual a água serve como um eficiente meio de dissolução e dispersão das pistas químicas (Liley, 1982; Wisenden & Sargent, 1997). Da mesma forma, essa característica acaba sendo extremamente útil em ambientes de visibilidade limitada, devido à turbidez ou baixa luminosidade, ou mesmo quando o organismo possui visão pouco desenvolvida (Wisenden, 2000).

Pistas químicas indicando perigo de predação podem ser emitidas diretamente de predadores, coespecíficos feridos e às vezes vindo de uma espécie simpátrica (Petranka et al., 1987; Mathis & Smith, 1993a; Chivers & Smith, 1998; Kats & Dill, 1998). Presas podem usar um desses sinais ou a combinação deles para avaliarem o risco de predação (Chivers & Smith,

1998; Kats & Dill, 1998; Bryer et al., 2001; Smith & Belk, 2001; Freitas & Volpato, 2008).

Considerando-se tais sinais, basicamente duas maneiras de perceberem o predador evoluíram nos peixes. As presas podem ser alertadas por um co-específico (Chivers & Smith, 1998) ou podem detectar diretamente a presença de um predador pelo seu odor (Kats & Dill, 1998; Ferrari et al., 2010).

No caso de alguns peixes, indiretamente, durante o ataque e captura de uma presa por um predador, alguns fatores químicos são liberados na água por meio de trauma físico da epiderme da presa (Pfeiffer, 1977; Wisenden, 2000; Barreto et al., 2010). Tais fatores químicos informam às outras presas em potencial que um predador está forrageando naquele determinado momento, sendo, tais substâncias, denominadas substâncias de alarme (Chivers & Smith, 1998; Wisenden, 2000). Assim, quando outros indivíduos detectam a presença da substância na água, imediatamente deflagram resposta antipredatória, a reação de alarme (Chivers & Smith, 1998). Embora menos freqüentemente estudados, peixes com a pele não lesada também são capazes de alertarem coespecíficos por pistas químicas (Jordão & Volpato, 2000; Barcellos et al., 2011; Giaquinto & Hoffmann, 2012).

A detecção direta depende do reconhecimento de odor específico do predador. Vários estudos reportam essa possibilidade (Magurran, 1989; Mathis & Smith, 1993b; Kats & Dill, 1998; Jachner & Janecki, 1999; Jachner, 2001; Hawkins et al., 2004a; Ylonen et al., 2007; Ferrari et al., 2010). Os peixes presas, contudo, detectam o odor do predador mais facilmente, como explicitado pela deflagração de resposta anti-predatória mais drástica, se

esse se alimentou de alguns tipos de presa em particular, especialmente coespecíficos da presa que está em situação de risco (Mathis & Smith, 1993b; Hirvonen et al., 2000; Mirza & Chivers, 2003a,b) ou se o predador se alimentou recentemente (Jachner, 1997).

Em peixes, o comportamento anti-predatório mais comum em respostas às pistas químicas de predador é a utilização de um refúgio se uma toca estiver presente (Lehtiniemi, 2005) ou diminuição da atividade natatória, se a toca não estiver presente (Chivers & Smith, 1998; Ide et al., 2003; Mirza & Chivers, 2003a). Embora respostas de defesa são observadas quando algum odor de predador está presente, pouco se sabe sobre as respostas fisiológicas associadas às reações comportamentais.

De fato, a percepção de um potencial predador tem sido relatada como estressor em peixes. Nesse contexto, a exposição visual a um predador aumenta a frequência ventilatória - FV (Metcalfe et al., 1987; Barreto et al., 2003; Hawkins et al., 2004 b), cortisol plasmático (Woodley & Peterson, 2003; Barcellos et al., 2007) e glicose plasmática (Polednik et al., 2008). O pareamento com o predador (percepção sensorial total do predador) também leva ao aumento da FV (Queiroz & Magurran, 2005) cortisol (Rehnberg & Schreck, 1987; Breves & Specker, 2005; Soares et al., 2012) e glicose plasmáticos (Rehnberg & Schreck, 1987; Jarvi, 1990).

Todavia, no ambiente aquático, onde muitas vezes a visibilidade não permite a visualização do predador ou o mesmo não se encontra próximo o suficiente da presa permitindo sua percepção mecânica, os estímulos químicos se fazem extremamente relevantes. No contexto da comunicação química entre presa e predador, há poucos relatos sobre o odor do predador

como estímulo químico estressante em peixes. Foi relatado em Hawkins et al., (2004 a e 2007) que o odor do predador aumenta a FV e a taxa metabólica (Sunardi et al., 2007). Não há evidências de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal devido ao odor do predador em peixes, levando a uma resposta primária de estresse (aumento do cortisol plasmático) e, dessas, derivando uma resposta secundária (aumento da glicose plasmática).

Neste estudo, avaliamos as respostas comportamentais e fisiológicas de estresse ao odor de predador usando como modelo experimental a tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Acanthopterygii; Perciformes; Cichlidae). Especificamente, confirmamos na tilápia que ela reage comportamentalmente ao odor do predador e aumenta a frequência ventilatória (a exemplo do peixe *Pseudorasbora parva*; Sunardi et al., 2007) e ainda, avaliamos se essa pista química induz aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose.

2. Materias e métodos

2.1. Animais e condições de estoque

As tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e os bagres africanos (*Clarias gariepinus*) foram adquiridos em piscicultura e aclimatados em tanques de estoque distintos, de aproximadamente 310 litros cada, por no mínimo 30 dias antes dos procedimentos experimentais, em densidade populacional adequada (densidade de estoque de 0,5 g/L d'água). Os tanques foram mantidos com temperatura média de $26 \pm 1,5^{\circ}$ C, nos quais os níveis de amônia (<0.5 ppm) e nitrito (<0.05 ppm) foram controlados através de filtragem biológica e constantes trocas parciais de água. O fotoperíodo foi mantido constante com 12 horas claro e 12 horas escuro. Os peixes foram alimentados uma vez por dia em excesso com ração comercial para peixes de 32% de proteína. Nenhum exemplar de tilápia-do-Nilo utilizado nos experimentos teve contato prévio com os bagres africanos.

2.2. Delineamento Experimental

2.2.1. Aspectos gerais

Tilápias-do-Nilo, provenientes da população de estoque, foram aleatoriamente escolhidos e alojados isolados em aquários de vidro de aproximadamente 22 L (40x24x23 cm ; 1 peixe por aquário) para período de aclimação de 60 horas e alimentados diariamente para posterior experimentação. As variáveis avaliadas como potenciais indicadores de resposta antipredatória na tilápia-do-Nilo foram: taxa ventilatória (Barreto et al., 2003) atividade natatória (Barreto et al., 2013) e inibição de agressão (Barreto et al., 2010) As quantificações dos comportamentos nos

experimentos descritos posteriormente foram feitas através de análises das filmagens dos peixes. Além dessas variáveis, foram também quantificados alguns parâmetros fisiológicos como os níveis plasmáticos de cortisol e glicose, para avaliação de estresse.

2.2.2. Avaliação dos efeitos do odor de predador no comportamento individual

A estratégia foi avaliar o comportamento das tilápias-do-Nilo expostas a odor de bagre africano (predador) que se alimentou de outras tilápias-do-Nilo (co-específicos) em comparação a indivíduos expostos ao controle (à água deionizada). Para tal, 24 peixes foram individualmente alojados em aquários de vidro por 60 horas consecutivas. Após esse procedimento, os valores basais dos parâmetros comportamentais foram avaliados durante 5 minutos consecutivos. Imediatamente após as medidas basais, 50 ml de água condicionada com odor de predador alimentado com co-específico (n = 10) ou água deionizada (n = 9) foi injetado na superfície da água do aquário do peixe teste, usando-se uma seringa, sendo o comportamento dos peixes observado por mais 5 minutos consecutivos.

A locomoção das tilápias-do-Nilo que foram expostas ao odor de predador foi avaliada como indicadora de resposta antipredatória. Para se estimar a atividade natatória foi utilizado um desenho de grade fixado na parte traseira do aquário no qual permitiu a quantificação da atividade natatória através da frequência de mudanças de quadrantes (Barreto et al., 2010). O desenho possui nove quadrantes (13,3 cm x 8 cm) que possibilitou

estimar a locomoção de cada peixe através do número de vezes que mudaram de quadrante.

2.2.3. Avaliação dos efeitos do odor de predador nas interações agressivas

Duplas de peixes foram pareadas para se analisar o efeito do odor de bagre africano (predador) que se alimentou de outras tilápias-do-Nilo (coespecíficos) nas interações agonísticas entre indivíduos de mesmo tamanho. Os peixes, provenientes de estoques distintos para se evitar a familiaridade, foram submetidos ao paradigma de residente-intruso, impondo uma situação de residência prévia em um indivíduo, o que possibilitou uma clara relação de agressividade entre os pares. Os 46 peixes provenientes dos estoques (número amostral de 12 pares para o grupo que recebeu o odor de predador e 11 pares para o grupo de água deionizada) foram isolados em aquários de 22 litros por 60 horas para período de aclimação. Após esse período, os peixes intrusos foram retirados de seus aquários com o auxílio de uma rede, logo em seguida foi feita uma marca com tinta insolúvel em água na extremidade nadadeira caudal para facilitar seu reconhecimento e assim, introduzidos em aquários de coespecíficos residentes. Os peixes residentes também sofreram o manejo de forma similar para se controlar os possíveis efeitos de manuseio. Foi analisado o número de ataques com contato, número de ameaças, número de ataques totais e latência de retorno ao confronto após o estímulo (Alvarenga & Volpato, 1995).

O comportamento agressivo foi analisado a partir das filmagens feitas durante o pareamento, sendo 5 minutos basais e 5 minutos após a introdução do estímulo em ambos os grupos.

2.2.4. Efeitos do odor de predador na taxa ventilatória e nos níveis plasmáticos de cortisol e glicose

Foi avaliado se o odor de predador modula os níveis plasmáticos de cortisol e glicose (n=10) (Barton, 2002), assim como a taxa ventilatória (Barreto & Volpato, 2004), indicadores bem estabelecidos de estresse em peixes. Para tal, os peixes foram individualmente alojados em aquários de vidro por 60 horas. Foram utilizados 120 peixes para as medições de cortisol e glicose. Os níveis de cortisol e glicose foram avaliados 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min e 240 min após a exposição aos estímulos químicos (n=10 em cada condição experimental).

Outros 28 peixes foram expostos a 50 mL de odor de predador ou água deionizada e a taxa ventilatória foi observada a cada minuto durante 5 minutos basais, e 5 minutos após o estímulo (n=13 para odor de predador; n=15 para água deionizada). A taxa ventilatória foi avaliada em um mesmo peixe (tanto os valores basais quanto os valores pós-estímulo) ao passo que as variáveis plasmáticas foram medidas em indivíduos diferentes devido aos procedimentos de coleta de sangue para obtenção do plasma, que impossibilita a coleta de sangue no mesmo indivíduo nos diferentes tempos.

2.3. Procedimentos gerais

2.3.1. Condições físico-químicas dos aquários experimentais

Todos os aquários experimentais foram suplementados com aeração contínua. Durante a experimentação, a temperatura da água foi mantida em 26 ° C e a concentração de amônia e nitrito em níveis baixos (<0.5 ppm e

<0.05 ppm respectivamente). O fotoperíodo foi mantido constante com 12 horas claro e 12 horas escuro.

2.3.2. *Odor de predador*

Para a coleta dos odores, foram utilizados dois bagres africanos *Clarias gariepinus*, (16,2cm e 16,6cm de tamanho padrão; 35,93g e 43,75g de peso, respectivamente), predador natural e, portanto, simpátrico à tilápia-do-Nilo (Boulenger, 1907).

Os bagres foram mantidos isolados em aquário de aproximadamente 42 litros (40x30x35cm; 1 peixe/aquário) com aeração constante, filtragem biológica, temperatura controlada em 26 °C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais permaneceram por seis dias nessas condições e foram alimentados 2 vezes nesse período (no segundo e no quarto dia) com filés frescos (com pele) de tilápias-do-Nilo (aproximadamente 3% do peso do respectivo bagre em cada alimentação). Após esse período, no sétimo dia os peixes foram transferidos para aquários de 22 litros (40x24x23cm; 1 peixe por aquário) com água limpa e mantidos com as mesmas condições descritas anteriormente, exceto pela presença de filtro biológico, onde permaneceram por 24h sem serem alimentados. Passado esse período, cada peixe foi retirado e a água foi filtrada em alíquotas de 50 ml e congeladas, até seu uso ser requisitado para o teste experimental. Esses procedimentos foram adaptados de Ferrari et al., (2006).

2.3.3. *Taxa ventilatória*

Foi estimado a taxa ventilatória através da quantidade de batimentos operculares ou movimentos respiratórios bucais realizados por minuto (bo/min), quantificando-se o número de batimentos operculares realizados durante os primeiros 15 segundos de cada minuto observado e depois multiplicando o valor obtido por 4.

2.3.4. *Coleta de sangue, processamento das amostras e análise do cortisol e glicose plasmáticos*

Para coleta de sangue, cada peixe foi capturado dos aquários experimentais com uma rede e colocado em um recipiente contendo solução de água com benzocaína (80 mg/L). Após anestesia parcial (Gontijo et al., 2003), o sangue foi amostrado por punção cardíaca, utilizando-se seringas de 1 mL heparinizadas para evitar que o sangue coagulasse. O sangue foi centrifugado (3000 rpm por 10 minutos) e o plasma coletado foi transferido para tubos com tampa e congelado (~ -20 °C) até serem requeridos para análises. Os níveis plasmáticos de cortisol foram determinados com kit comercial de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay kit - cortisol test), conforme procedimentos validados para peixes (Sink et al., 2008; Barcellos et al., 2010). Já os níveis plasmáticos de glicose foram avaliados pelo método colorimétrico de Trinder (1969).

2.4. Análise dos dados

Antes das análises, foram identificados e retirados os dados discrepantes (outliers) das amostras através do teste de Chauvenet, que consiste na média dos valores ± 2 vezes o desvio padrão. Em seguida, os dados foram analisados quanto à sua homocedasticidade utilizando-se teste de Levene. Confirmando-se a homocedasticidade dos mesmos, esses foram comparados utilizando-se Student's T-test em situações com duas condições experimentais independentes. Caso contrário, teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Para os dados de movimentação, foi analisada a diferença entre o total de mudanças de quadrantes realizadas após a introdução de estímulo e o total de mudanças de quadrantes do período basal. O número de mudanças de quadrantes foi estatisticamente menor para o grupo de tilápias-do-nilo expostas ao odor de predador comparado ao grupo controle de água deionizada (Mann-Whitney U Test $p = 0,027$; Fig. 1).

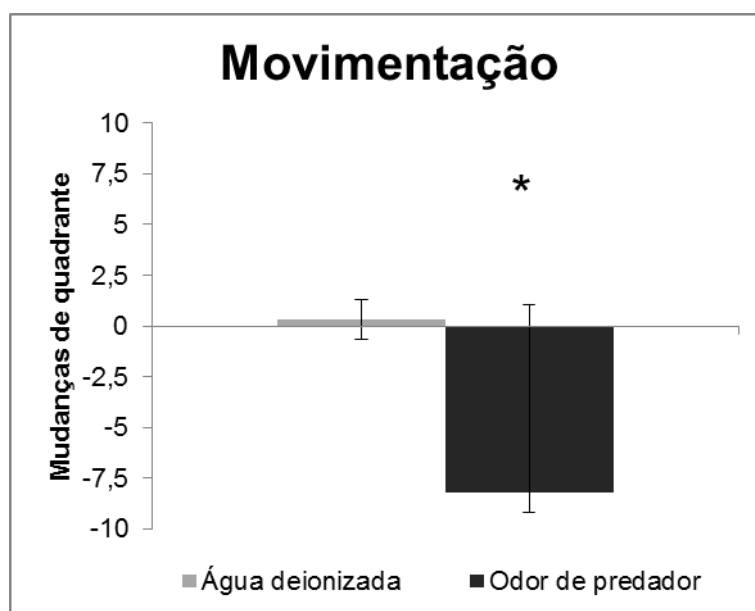


Figura 1: Número de mudanças de quadrantes em peixes expostos ao odor de predador e à água deionizada. Foi analisada a diferença entre o total de mudanças de quadrantes realizadas após a introdução de estímulo e o total de mudanças de quadrantes do período basal. Valores expressados em médias \pm desvio padrão. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos (Mann-Whitney U Test $p = 0,027$).

Para aos dados correspondentes aos ataques com contato, ameaças e ataques totais foi feita a diferença entre os valores obtidos após estímulo e os valores basais. Não houve diferença significativa para os dados de ataques com contato (Student's T-test, $t(20) = 0,472$ $p = 0,641$; Fig. 2A), ameaças (Mann-Whitney U Test $p = 0,186$; Fig. 2B), ataques totais (Student's

T-test, $t(21) = 0,614$, $p = 0,545$; Fig. 2C) e latência para retornar a luta após a inserção do estímulo (Student's T-test, $t(21) = 0,061$, $p=0,951$; Fig. 2D).

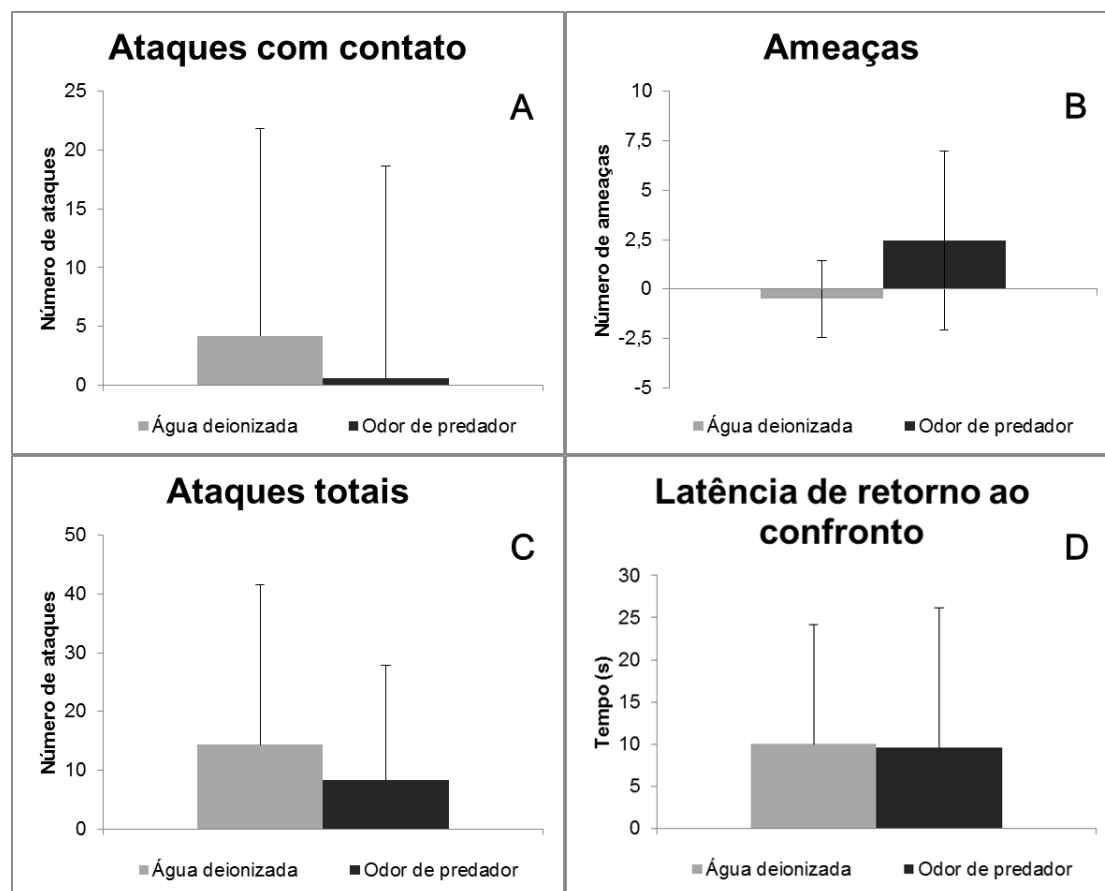


Figura 2: Variáveis do comportamento agressivo (A – Ataques com contato; B – Ameaças; C – Ataques totais; D – Latência de retorno ao confronto) em peixes expostos ao odor de predador e água deionizada. Foram analisadas as diferenças entre as quantidades de interações realizadas após a introdução de estímulo e as quantidades de interações do período basal. Valores expressados em médias \pm desvio padrão (Student's T-test (A, C e D); Mann-Whitney U Test (B) $p > 0,05$).

Usamos a diferença entre a média da taxa ventilatória dos 5 minutos após o estímulo e a média da taxa ventilatória nos 5 minutos basais para a comparação a seguir. Notamos que houve um aumento dos batimentos operculares nas tilápias-do-nilo que foram expostas ao odor de predador quando comparado aos peixes que receberam água deionizada (Student's T-test, $t(26) = -2,877$, $p = 0,007$; Fig. 3).

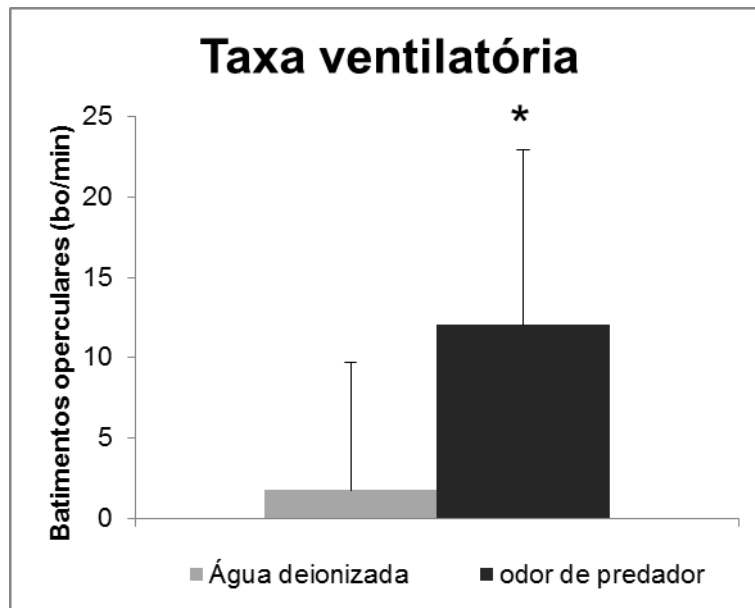


Figura 3: Taxa ventilatória em peixes expostos ao odor de predador e água deionizada. Foi analisada a diferença entre a média da taxa ventilatória dos 5 minutos após o estímulo e a média da taxa ventilatória nos 5 minutos basais. Valores expressados em médias \pm desvio padrão. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos (Student's T-test, $p = 0,007$).

Não houve influência do odor de predador nos níveis de cortisol e glicose em nenhum dos momentos (0, 15, 30, 60, 120 e 240 min) pós-estímulo testados (Student's T-test, $p > 0,05$; Fig. 4).

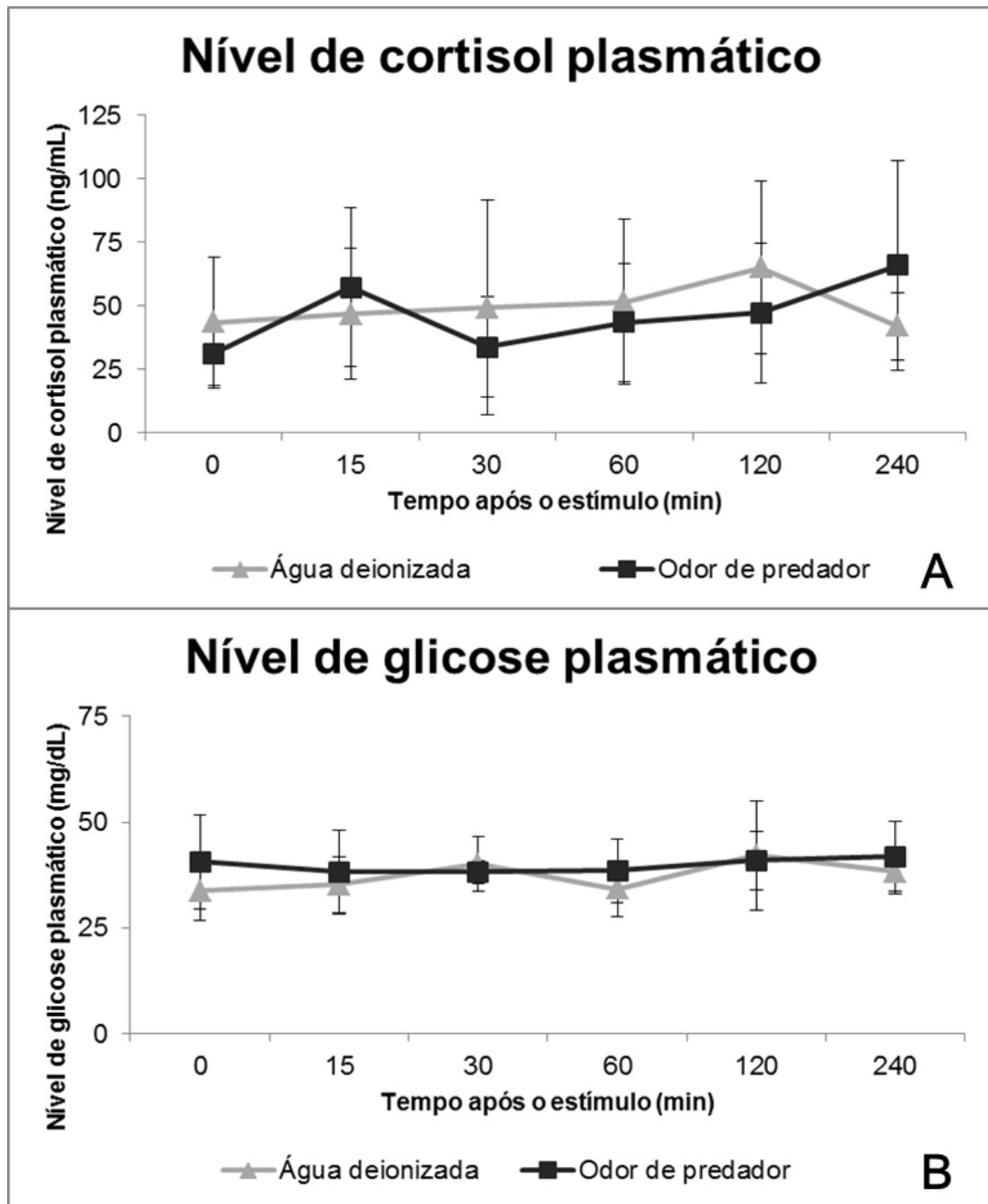


Figura 4: Nível de cortisol (A) e glicose (B) plasmáticos variando ao longo do tempo em peixes expostos ao odor de predador e água deionizada. Valores expressados em médias \pm desvio padrão (Student's T-test $p > 0,05$).

4. Discussão

No presente estudo, mostramos que as pistas químicas contidas no odor de peixe predador, induzem respostas de alarme e de estresse em coespecíficos dessa presa. A tilápia-do-Nilo quando exposta ao odor de predador diminuiu a movimentação e teve um aumento da taxa respiratória, mostrando que a utilização do odor de predador como estímulo químico de ameaça é válida por conseguir deflagrar estas respostas antipredatórias.

A obtenção de odor de predador foi realizada conforme a metodologia aceita em outros trabalhos que demonstraram a deflagração de respostas antipredatórias drásticas nos peixes presas que receberam ou apenas o odor de predador que se alimentou de coespecíficos da presa (Mathis & Smith, 1993 a,b; Mirza & Chivers, 2003 a,b; Hirvonen et al., 2000) ou de pistas químicas presente nas suas fezes (Brown et al., 1995; Godard et al., 1998, Brown & Dreier, 2002; Brown & Zachar, 2002; Vilhunen & Hirvonen 2003; Roberts & Garcia de Leaniz, 2011), ambas situações que podem revelar de maneira eficiente o conteúdo da dieta do predador, e portanto, o reconhecimento do risco de predação que isso significa para a presa em potencial (Smith, 1997). Assim, há uma forte evidência que a substância de alarme é também quimicamente conservada no predador, mesmo passando através de seu sistema digestivo (Godard et al., 1998), validando nossos resultados que apresentam respostas antipredatórias ao odor de predador que se alimentou de coespecíficos sem a utilização de suas fezes.

A locomoção das tilápias-do-Nilo que foram expostas ao odor de predador foi avaliada como indicadora de resposta antipredatória. A atividade natatória é fortemente afetada por pistas químicas que indicam ameaça de

predação ao peixe presa e a sua diminuição é considerada um tipo de resposta defensiva. (Chivers & Smith, 1998, Giaquinto & Volpato, 2001; Barreto et al., 2010). Nossos dados mostram que a diminuição da atividade natatória da tilápia-do-nilo, perante o estímulo químico proveniente do odor de predador que se alimentou de coespecíficos, se assemelha com outros relatos de diminuição de atividade locomotora. Como exemplo, visto em outras espécies de peixes, temos fathead minnows (*Pimephales promelas*; Mathis & Smith 1993 b), brook charr (*Salvelinus fontinalis*; Mirza & Chivers, 2003 a) e salmão do atlântico (*Salmo salar*; Roberts et al 2011) ou a outros tipos de estímulos associados com predação como o reconhecimento visual de predadores também em fathead minnows (Mathis et al 1993) e pela substância de alarme e sangue liberados por um coespecífico em tilápias-do-Nilo (Barreto & Hoffmann, 2007; Barreto et al., 2010; Barreto et al., 2013). A diminuição da atividade do peixe presa após o reconhecimento da pista química que indica risco de predação resulta numa menor probabilidade de encontro com um possível predador (Endler, 1986; Sih, 1987; Lima, 1988; Bronmark & Hansson, 2000) e/ou diminuição do risco de detecção pelo predador (Mathis & Smith, 1993 b; Eklov & Persson, 1995; Smith, 1997) indicando que o comportamento encontrado é uma típica reação de alarme.

Apesar de alguns estudos demonstrarem a diminuição da agressividade em ciclídeos expostos ao extrato de pele de coespecíficos (Wisenden & Sargent, 1997; Brown et al., 2004; Barreto et al., 2010), a utilização de um estímulo químico proveniente do odor de predador nunca havia sido testada para tal finalidade. No presente estudo, não foi observada diminuição da agressividade entre as tilápias-do-Nilo expostas ao odor de

predador em relação ao grupo controle. As tilápias-do-Nilo são ciclídeos extremamente agressivos e territoriais, sendo que a intensidade dos encontros agressivos depende da motivação do indivíduo para lutar e está relacionada ao valor do recurso e do risco envolvido na disputa (Ridley, 1995). A posse de um território pelo peixe residente é considerada um recurso de alto valor (Smith & Riechert, 1984) e a motivação agressiva para sua defesa perante o invasor foi maior do que o potencial risco de predação apresentado pelo odor de predador. Por esta razão, é plausível supor que não ocorreu modificação da resposta agressiva frente ao odor do predador devido à agressividade da tilápia em relação a um intruso de território, sendo o intruso um estímulo, neste caso, mais potente que o odor do predador.

Há fortes evidências demonstrando que a detecção química de um potencial predador é estressante para o peixe presa (Lima & Dill, 1990; Smith, 1992; Chivers & Smith, 1998; Kats & Dill, 1998; Bronmark & Hansson, 2000). Mudanças fisiológicas para lidar com a situação de perigo, incluindo taquicardia (Hojesjo et al., 1999) e aumento da taxa ventilatória (Metcalfe et al., 1987; Barreto et al., 2003; Hawkins et al., 2004 b; Queiroz & Magurran, 2005), indicam que a presa possui mecanismos sensoriais necessários para a detecção do predador, permitindo assim, a realização de uma variedade de respostas comportamentais antipredatórias (Kats & Dill, 1998).

Numa primeira análise, há adequação das medidas basais fisiológicas nesse experimento quando comparados com outros estudos. Foi obtido um valor médio basal de 116 bo/min, sendo a taxa ventilatória um parâmetro inversamente proporcional ao tamanho do corpo (Schmidt-Nielsen, 1996), Volpato et al.,(1989) encontraram 76 a 81 bo/min em peixes maiores na

mesma espécie; ~ 50 bo/min em peixes muito maiores (cerca de 3.5 vezes maiores, Fernandes and Rantin,1989) e cerca de 120 bo/min(Alvarenga and Volpato, 1995) e 117 a 124bo/min (Barreto et al., 2003) em tilápias-do-Nilo do mesmo tamanho (~ 6,8cm) utilizado neste estudo. Do mesmo modo, os dados basais obtidos de cortisol tiveram uma média de 50,01 ng/mL, valor dentro do esperado para uma condição não estressada de *O. niloticus*, que variou de 5 a 60 ng/mL em outros estudos (Barcellos et al., 1999 a,b; Volpato & Barreto, 2001; Barreto & Volpato, 2004; Biswas et al., 2004). O mesmo ocorreu para a média do valor basal de glicose obtido, na mesma espécie, 37,34 mg/dL, similar ao encontrado por outros autores (34.54 a 130 mg/dL; Fernandes & Volpato, 1993; Yavuzcan et al., 1997; Barcellos et al., 1999a; Barreto & Volpato, 2006). Apesar de não haver diferença nas medidas de cortisol e glicose nas tilápias-do-Nilo após receberem o odor de predador, os valores basais encontrados no presente estudo confirmam uma condição não estressada.

Embora o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal não ter sido ativado pela exposição das tilápias ao odor de predador, as tilápias-do-Nilo apresentaram um aumento da taxa respiratória quando submetida a este estímulo. O aumento da taxa ventilatória está relacionado com a necessidade de um maior consumo de oxigênio pelo peixe (Fernandes and Rantin, 1994), o que é uma resposta fisiológica essencial na preparação do corpo para uma possível atividade aeróbia repentina (fuga, por exemplo) subsequente à detecção do risco de predação (Hawkins et al., 2004b).

5. Referências bibliográficas

- Alvarenga CMD, Volpato GL, 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology & Behavior*. 57, 75-80.
- Barbosa A, Magalhães EJ, Hoffmann A, Ide LM, 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Ethologica*. 13 (02), 119-126.
- Barcellos LJG, Marqueze A, Trapp M, Quevedo RM, Ferreira D. 2010. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundia *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*. 300, 231-236.
- Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhier F. 1999a. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research*. 30, 437–444.
- Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhier F. 1999b. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture Research*. 30, 887–892002E
- Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, da Silva LB, Bedin AC. 2007. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*, 272 , 774–778.
- Barcellos LJG, Volpato GL, Barreto RE, Coldebella I, Ferreira D. 2011. Chemical communication of handling stress in fish. *Physiology and Behaviour*. 103(3-4), 372-375.
- Barreto RE, Barbosa A, Giassi ACC, Hoffmann A 2010. The 'club' cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 43, 75-81.
- Barreto RE, Hoffmann A 2007. Behavioural responses to conspecific skin extract in the Nile tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*. 148, Suppl 1, S38.
- Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL. 2003. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behavioural Processes*. 60, 235-239.
- Barreto RE, Miyai CA, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC. 2013. Blood Cues Induce Antipredator Behavior in Nile Tilapia Conspecifics. *PLoS ONE* 8(1), e54642.

- Barreto RE, Volpato GL. 2004. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behavioural Processes*. 66, 43-51.
- Barreto RE, Volpato GL. 2006. Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39(12), 1605-1612.
- Barton BA 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525.
- Biswas, AK, Maita M, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2004. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. *Journal of Fish Biology*. 65, 811-821.
- Boulenger GA 1907. *The Fishes of the Nile*. Published by Hugh Ress Ltd., London. Inglaterra
- Breves JP, Specker JL. 2005. Cortisol stress response of juvenile winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum) to predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 35(1), 1-7.
- Bronmark C, Hansson LA. 2000. Chemical communication in aquatic systems: an introduction. *Oikos*. 88, 103–109.
- Brown GE & Dreier VM. 2002. Predator inspection behavior and attack cone avoidance in a characin fish: the effects of predator diet and prey experience. *Animal Behaviour* 63(6), 1175–1181.
- Brown GE & Zachar MM. 2002. Chemical predator inspection in a characin fish (*Hemigrammus erythrozonus*, Characidae, Ostariophysi): the effects of mixed predator diets. *Ethology*. 108 (5), 451-461.
- Brown GE, Chivers DP, Smith RJF. 1995. Fathead minnows avoid conspecific and heterospecific alarm pheromones in the faeces of northern pike. *Journal of Fish Biology*. 47, 387–393.
- Brown GE, Foam PE, Cowell HE, Guevara-Fiore P, Chivers DP. 2004. Production of chemical alarm cues in juvenile convict cichlids: the effect of diet, condition, and ontogeny. *Annales Zoologici Fennici*, 41, 487-499.
- Bryer PJ, Mirza RS, Chivers DP. 2001. Chemosensory assessment of predation risk by slimy sculpins, *Cottus cognatus*: responses to alarm, disturbance and predator cues. *Journal of Chemical Ecology*. 27, 533-546.

- Chivers DP, Smith RJF. 1998. Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. *Ecoscience* 5, 338-352.
- Eklov P, Persson L. 1995. Species-specific antipredator capacities and prey refuges: interaction between piscivorous perch (*Perca fluviatilis*) and juvenile perch and roach (*Rutilus rutilus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 37, 169–178.
- Endler JA 1986. Defense against predators. In: M.E. Feder & G.V.Lauder (ed.). *Predator-prey relationships: Perspectives and approaches from the study of lower vertebrates*. Chicago: University of Chicago, EUA. P.109-134
- Fernandes MN & Rantin FT. 1989. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. *Journal of Fish Biology*. 35, 509-519.
- Fernandes MN & Rantin FT. 1994. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. *Aquaculture*. 127, 339-346.
- Fernandes, M.O. & Volpato, G. L. 1993. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology and Behavior* 54, 319–323.
- Ferrari MCO, Messier F, Chivers DP 2006. The nose knows: minnows determine predator proximity and density through detection of predator odours. *Animal Behaviour* 72, 927-932.
- Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP. 2010. Chemical ecology of predator-prey interactions in aquatic ecosystems: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*. 88, 698–724.
- Franchina CR & Stoddard PK. 1998. Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus* - I. Quantification of day-night changes. *Journal of Comparative Physiology A Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 183, 759-768.
- Freitas RHA & Volpato GL 2008. Behavioral response of Nile tilapia to an allopatric predator. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41, 267-272.
- Giaquinto PC & Hoffmann A. 2012. The scent of stress: Pintado catfish differentially respond to chemical cues from stressed conspecifics. *Behaviour*. 149(9), 941-951.

- Giaquinto PC & Volpato GL. 2001. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behaviour* 138, 1205-1214.
- Godard RD, Bowers BB, Wannamaker C. 1998. Responses of golden shiner minnows to chemical cues from snake predators. *Behaviour*. 135, 1213–1228.
- Gontijo AMMC, Barreto RE, Speit G, Reyes VAV, Volpato GL, Salvadori DMF 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutation Research*. 534, 165-172.
- Hawkins LA, Armstrong JD, Magurran AE. 2004b. Predator-induced hyperventilation in wild and hatchery Atlantic salmon fry. *Journal of Fish Biology*. 65, 88-100 Suppl.
- Hawkins LA, Magurran AE, Armstrong JD 2004a. Innate predator recognition in newly-hatched Atlantic salmon. *Behaviour*. 141, 1249-1262.
- Hawkins LA, Magurran AE, Armstrong JD. 2007. Innate abilities to distinguish between predator species and cue concentration in Atlantic salmon. *Animal Behaviour*. 73(6), 1051–1057.
- Hirvonen H, Ranta E, Piironen J. 2000. Behavioural responses of naive Arctic charr young to chemical cues from salmonid and non-salmonid fish. *Oikos* 88, 191-199.
- Hojesjo J, Johnsson J.I, Axelsson M. 1999. Behavioural and heart rate responses to food limitation and predation risk: an experimental study on rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 55, 1009–1019.
- Ide LM, Urbinati EC, Hoffmann A. 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *Journal of Fish Biology*. 63, 332-343.
- Jachner A & Janecki T 1999. Feeding and growth response of roach, *Rutilus rutilus*, to alarm substance. *Environmental Biology of Fishes*. 54, 433-437.
- Jachner A. 1997. The response of bleak to predator odour of unfed and recently fed pike. *Journal of Fish Biology*. 50, 878-886.
- Jachner A. 2001. Anti-predator behaviour of naive compared with experienced juvenile roach. *Journal of Fish Biology*. 59, 1313-1322.
- Jarvi T. 1990. Cumulative acute physiological stress in Atlantic salmon smolts: the effect of osmotic imbalance and the presence of predators. *Aquaculture*. 89,337–350.

- Jordao LC & Volpato GL. 2000. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour*. 137, 681-690.
- Jordão LC. 2004. Disturbance chemical cues determine changes in spatial occupation by the convict cichlid *Archocentrus nigrofasciatus*. *Behavioural Processes*. 67:453–459.
- Kats LB & Dill LM 1998. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*. 5, 361-394.
- Lehtiniemi M. 2005. Swim or hide: predator cues cause species specific reactions in young fish larvae. *Journal of Fish Biology*. 66, 1285–1299.
- Liley NR. 1982. Chemical communication in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 39, 22-35.
- Lima SL & Dill LM. 1990. Behavioural decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*. 69, 619–640.
- Lima SL. 1988. Vigilance during the initiation of daily feeding in dark-eyed juncos. *Oikos*. 53, 12–16.
- Magurran AE. 1989. Acquired recognition of predator odor in the European minnow (*Phoxinus phoxinus*). *Ethology*. 82, 216-223.
- Mathis A & Smith RJF. 1993. Fathead minnows, *Pimephales promelas*, learn to recognize northern pike, *Esox lucius*, as predators on the basis of chemical stimuli from minnows in the pike's diet. *Animal Behaviour*. 46, 645–656.
- Mathis A & Smith RJF. 1993. Intraspecific and cross-superorder responses to chemical alarm signals by brook stickleback. *Ecology*. 74, 2395-2404.
- Mathis A, Chivers DP, Smith RJF. 1993. Population Differences In Responses Of Fathead Minnows (*Pimephales-Promelas*) to visual And Chemical Stimuli From Predators. *Ethology*. 93(1), 31-40.
- Metcalf NB, Huntingford FA, Thorpe J.E. 1987. The influence of predation risk on the feeding motivation and foraging strategy of juvenile Atlantic salmon. *Animal Behaviour* 35, 901–911.
- Mirza RS & Chivers DP. 2003a. Predator diet cues and the assessment of predation risk by juvenile brook charr: do diet cues enhance survival? *Canadian Journal of Zoology*. 81, 126-132.

- Mirza RS & Chivers DP. 2003b. Fathead minnows learn to recognize heterospecific alarm cues they detect in the diet of a known predator. *Behaviour*. 140,1359-1369.
- Petranka JW, Kats LB, Sih A. 1987. Predator-prey interactions among fish and larval amphibians: use of chemical cues to detect predatory fish. *Animal Behaviour*. 35, 420-425.
- Pfeiffer W. 1977. Distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*. 4, 653-665.
- Poledník L, Rehulka J, Kranz A, Poledníková K, Hlavac V, Kazihnitkova H. 2008. Physiological responses of over-wintering common carp (*Cyprinus carpio*) to disturbance by Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Fish Physiology and Biochemistry* 34(3), 223–234.
- Queiroz H, Magurran AE. 2005. Safety in numbers? Shoaling behaviour of the Amazonian red-bellied piranha. *Biology Letters*. 1, 155–157.
- Rehnberg BG & Schreck CB. 1987. Chemosensory detection of predators by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): behavioural reaction and the physiological stress response. *Canadian Journal of Zoology*. 65(3): 481-485.
- Ridley M. 1995. *Animal Behavior: An Introduction to Behavioral Mechanisms, Development, and Ecology*, 2ª Edição. Atlanta, Geórgia, EUA. p. 288.
- Roberts LJ & Garcia de Leaniz C. 2011. Something smells fishy: predator-naïve salmon use diet cues, not kairomones, to recognize a sympatric mammalian predator. *Animal Behaviour*. 82 (2011), 619e625.
- Schmidt-Nielsen K. 1996. *Animal Physiology: Adaptations and Environment*. Cambridge University Press, Cambridge. Inglaterra. p. 607.
- Sih A. 1987. *Predators and prey lifestyle: an evolutionary and ecological overview*. Hanover, New Hampshire: University Press of New England EUA. P.203-224.
- Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiology and Biochemistry*. 34, 95-101.
- Smith JM. & Riechert SE. 1984. A conflicting-tendency model of spider agonistic behavior—hybrid-pure population line comparisons. *Animal Behaviour*. 32, 564–578.

- Smith ME & Belk MC 2001. Risk assessment in western mosquitofish (*Gambusia affinis*): do multiple cues have additive effects? *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 51, 101-107.
- Smith RJF. 1992. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2, 33-63.
- Smith RJF. 1997. Avoiding and deterring predators. In: Godin, J.-G. J. (ed.), *Behavioural ecology of teleost fishes*. Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra. p. 163-190.
- Soares MC, Bshary R, Cardoso SC, Côté IM, Oliveira RF. 2012. Face Your Fears: Cleaning Gobies Inspect Predators despite Being Stressed by Them. *PLoS ONE* 7(6): e39781.
- Sunardi, Asaeda T, Manatunge J. 2007. Physiological responses of topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva*, to predator cues and variation of current velocity. *Aquatic Ecology*. 41(01), 111-118.
- Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*. 22, 158-161.
- Vilhunen S & Hirvonen H. 2003. Innate antipredator responses of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) depend on predator species and their diet. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 55(1), 1-10.
- Volpato GL, Frioli PMA, Carrieri MP. 1989. Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanisms. *Boletim de Fisiologia Animal*. 13, 7-22.
- Volpato, GL & Barreto RE. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34,1041-1045.
- Wisenden BD & Sargent RC. 1997. Antipredator behaviour and suppressed aggression by convict cichlids in response to injury-released chemical cues of conspecifics but not to those of an allopatric heterospecific. *Ethology*. 103, 283-291.
- Wisenden BD. 2000. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*. 355, 1205-1208.

- Woodley CM, Peterson MS. 2003. Measuring responses to simulated predation threat using behavioral and physiological metrics: the role of aquatic vegetation. *Oecologia*. 136(1), 155-160.
- Yavuzcan YH, Pulatsu S, Kurtoglu F. 1997. Baseline haematological and serological parameters of healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Animal science paper report*. 15, 213–217.
- Ylonen H, Kortet R, Myntti J. 2007. Predator odor recognition and antipredatory response in fish: does the prey know the predator diel rhythm? *Acta oecologic*. 31, 1-7.