

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Instituto de Biociências de Botucatu



## **RESPOSTA DE ESTRESSE À SUBSTÂNCIA DE ALARME NA TILÁPIA-DO-NILO**

**Fabio Henrique Carretero Sanches**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Egidio Barreto

Apoio:



Processo número: 2011/03218-1

Botucatu – SP

2013

Universidade Estadual Paulista

Instituto de Biociências de Botucatu

**RESPOSTA DE ESTRESSE À SUBSTÂNCIA DE ALARME NA  
TILÁPIA-DO-NILO**

Fabio Henrique Carretero Sanches

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), do Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Apoio:



Processo número: 2011/03218-1

Botucatu – SP

2013

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

Sanches, Fabio Henrique Carretero.

Resposta de estresse à substância de alarme na tilápia-do-Nilo / Fabio Henrique Carretero Sanches - Botucatu, 2013

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

Orientador: Rodrigo Egydio Barreto

Capes: 20404000

1. Tilápia (Peixe). 2. Peixe - Fisiologia. 3. Predação (Biologia). 4. Stress - Fisiologia. 5. Epiderme.

Palavras-chave: Célula 'club'; Extrato de pele; Pista química; Resposta antipredatória.

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, Henrique e Nilsen, pela criação, ensinamentos, valores passados, apoio e incentivo, sem os quais eu não estaria aqui hoje. Eles são grades exemplos a se seguir. As minhas irmãs, Ana Paula e Milene, por ouvir minhas piadas na hora do almoço, pela companhia, incentivo e também pelos ensinamentos passados ao longo de minha vida. Aos meus avós, tios e primos que também foram muito importantes na minha formação pessoal e que tiveram influência, de certa forma, na minha escolha de profissão.

A minha querida namorada Tamara, por todo companheirismo, paciência, apoio e, principalmente, por ter me ajudado nos momentos mais difíceis durante o mestrado.

Ao Rodrigo, meu orientador, por todo ensinamento passado, tanto de caráter científico quanto pessoal. Ao professor Gilson, Percília e Helton, que também me passaram ensinamentos e influenciaram, direta ou indiretamente, para seguir nessa carreira.

Ao Caio (Shibinha), por ter me ajudado em todos os momentos do mestrado, pelas discussões e ideias dos experimentos e pela convivência harmoniosa em casa. Aos amigos do laboratório, Candido (Kiboa), Camila (Judi) e Ana Livia (Mutley), os quais me ajudaram muito durante todos os momentos dos experimentos. As meninas do lab do Gilson, Grazi, Paty, Monica, Carol e Fernanda, pela recepção em Botucatu, pela ajuda em alguns momentos e principalmente pelos litros de água sanitária emprestados. Aos técnicos, Hélio e Tardivo, pela ajuda nas análises de cortisol e glicose.

Ao amigo Jorge, pela ajuda na mudança de casa em um momento difícil, e os churrascos que deram sorte para o Coringão ser campeão. Agradeço a todos meus amigos, que também tiveram influência em quem eu sou hoje e me apoiaram e incentivaram durante esse período, mesmo não podendo estar presentes em todos os momentos.

Por fim, agradeço a FAPESP (número do processo: 2011/03218-1) pelo apoio financeiro à pesquisa.

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>7</b>
<i>2.a. Animais e condição de estoque .....</i>	<i>7</i>
<i>2.b. Delineamento Experimental.....</i>	<i>7</i>
2.b.1. Avaliação dos efeitos da substância de alarme no comportamento da tilápia-do-Nilo .....	7
2.b.2. Efeitos da substância de alarme nos indicadores de estresse na tilápia-do-Nilo .....	8
<i>2.c. Procedimentos específicos .....</i>	<i>8</i>
2.c.1. Extrato de pele de coespecíficos e heteroespecíficos .....	8
2.c.2. Condições físico-químicas dos aquários experimentais .....	9
2.c.3. Avaliação do comportamento .....	9
2.c.4. Frequência ventilatória .....	10
2.c.5. Coleta de sangue, processamento das amostras e análise do cortisol e glicose plasmáticos .....	10
<i>2.d. Análise dos dados.....</i>	<i>11</i>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>12</b>
<i>3.a. Avaliação dos efeitos da substância de alarme no comportamento da tilápia-do-Nilo .....</i>	<i>12</i>
<i>3.b. Efeitos dos estímulos químicos nos indicadores de estresse.....</i>	<i>14</i>
<b>4. Discussão .....</b>	<b>16</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>20</b>

## **Resumo**

Algumas espécies de peixe supostamente produzem e armazenam em células localizadas na epiderme (células ‘club’) substância de alarme que quando liberada na água induz respostas defensivas em coespecíficos. A substância de alarme não é secretada e só é liberada na água na ocorrência de um ataque de um predador que leva a injúria física da epiderme. Em situações de ameaça, ajustes fisiológicos são necessários para o organismo lidar com essa situação aversiva (resposta de estresse). Até o momento, as evidências sobre os efeitos da substância de alarme nas respostas de estresse em peixes permitem apenas uma restrita generalização, visto que poucas espécies foram avaliadas e tal estímulo pode induzir resposta primária e secundária de estresse ou não. No presente estudo, mostramos que a substância de alarme induz resposta primária de estresse, no que tange aumento na frequência ventilatória e nos níveis de cortisol, mas não secundária (aumento de glicose), divergindo das respostas de estresse em relação à substância de alarme relatadas. Isso sugere que esse fenômeno em peixes é espécie-específico.

**Palavras-chave:** Célula ‘club’; Extrato de pele; Pista química; Resposta antipredatória.

## **1. Introdução**

Durante as interações entre presa e predador, a habilidade 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 para se livrar da ameaça. Isso não é diferente para os 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 visuais (Barreto et al., 2003), elétricos (Franchina & Stoddard, 1998) ou químicos (Giaquinto & Volpato, 2001; Ide et al., 2003; Barreto et al., 2010; Barbosa Júnior et al., 2010).

Os sinais químicos representam fonte de importantes informações sobre o ambiente, especialmente nos ambientes aquáticos, onde a água facilita a dispersão de pistas químicas (Liley, 1982; Wisenden & Sargent, 1997). Além disso, são extremamente úteis em ambientes de visibilidade limitada, devido à turbidez ou baixa luminosidade, ou mesmo quando o organismo possui visão pouco desenvolvida (Wisenden, 2000). Considerando-se tais sinais, basicamente duas maneiras de perceberem o predador evoluíram nos peixes. Uma indireta, onde as presas podem ser alertadas pelas pistas químicas liberadas por um coespecífico (Chivers & Smith, 1998) ou podem detectar diretamente a presença de um predador pelo seu odor (Kats & Dill, 1998).

Indiretamente, no caso de alguns peixes, durante o ataque e captura de uma presa por um predador, alguns fatores químicos são liberados na água devido a traumas físicos da epiderme da presa (Pfeiffer, 1977; Wisenden, 2000; Giaquinto & Volpato, 2001; Ide et al., 2003; Barreto et al., 2010; Barbosa Júnior et al., 2010). Tais fatores

químicos informam às presas em potencial que um predador está forrageando naquele determinado momento, sendo, portanto, denominados 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). Já foi demonstrado em alguns estudos histológicos que as substâncias de alarme podem estar presentes em células epidérmicas especializadas, denominadas células ‘club’, sendo liberadas somente quando a pele do peixe é lesada, já que nas células que estão distribuídas ao longo da pele não há acesso a superfície do corpo através de poros (Pfeiffer, 1977; Smith, 2000).

As substâncias de alarme são características presentes em peixes da Superordem Ostariophysi, um grupo que contém cerca de 65% de todos os peixes de água doce (Nelson, 1984). Contudo, mais recentemente, alguns exemplos têm sido também observados em peixes acantopterígios, como por exemplo, nas famílias Gobiidae (Smith, 1989; Smith et al., 1991) e Cichlidae (Wisenden & Sargent, 1997; Brown et al., 2004; Foam et al., 2005; Barreto et al., 2010).

As reações de alarme são respostas anti-predatorias, que podem incluir uma série de alterações comportamentais como natação rápida e desordenada, diminuição da atividade de natação, freezing, eriçamento da nadadeira dorsal, modulação da frequência ventilatória, entre outras (Pfeiffer, 1977; Pandey, 1984; Chivers & Smith, 1998). Além dessas respostas, a substância de alarme induz mudança na prioridade em responder a estímulos relevantes do ambiente, como diminuir as atividades agressivas durante a defesa de território (Barreto et al., 2010; Wisenden & Sargent, 1997) ou diminuir o forrageamento (Foam et al., 2005).

Em relação aos correlatos fisiológicos de estresse, poucos estudos mostram como são os ajustes corpóreos quando os peixes estão expostos à substância de alarme.



Quando a homeostasia está ameaçada por um estímulo potencialmente nocivo (estressor), observamos alguns ajustes fisiológicos comuns aos vertebrados para lidar com essa situação e restaurar total ou parcialmente as condições corpóreas iniciais. Um estressor pode aumentar a atividade do sistema nervoso autônomo simpático, culminando com aumento de níveis plasmáticos de catecolaminas e rápidos ajustes cardiorrespiratórios. Persistindo os efeitos do estressor, é comum observamos a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (tecido inter-renal em peixes) levando ao aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides, como o cortisol, no caso dos peixes. Fruto do aumento dos níveis de glicocorticoides, é possível observar mudanças metabólicas secundárias, como aumento dos níveis plasmáticos de glicose. Caso os efeitos do estressor se tornem crônicos, respostas terciárias deletérias podem surgir, como imunossupressão severa e inibição da atividade reprodutiva. Nesse contexto, a substância de alarme altera a frequência ventilatória, podendo tanto aumentá-la (Gibson & Mathis, 2006; Barreto et al., 2010; ), quanto diminuí-la (Barbosa Jr. et al., 2010; Barreto et al., 2012). . Contudo, a substância de alarme, embora induza resposta antipredatória, pode tanto aumentar os níveis de cortisol e glicose, como observado para o salmão do pacífico (coho salmon - *Onchorhynchus kisutch* - Rehnberg & Schreck, 1987) e para o peixe pérola de água doce (pearl dace - *Margariscus margarita* - Rehnberg et al., 1987), quanto não induzir essas respostas, como observado para o Matrinxã (*Brycon cephalus* - Ide et al., 2003). Considerando esta disparidade de respostas, que sugere, por exemplo, algo espécie-específico, é necessário, num sentido comparativo, o conhecimento dos efeitos da substância de alarme nesses indicadores de estresse em mais espécies de peixes. No presente estudo, testamos esse objetivo usando-se a tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* como modelo experimental. Essa espécie de peixe possui células ‘club’ em sua epiderme e apresenta resposta antipredatória induzida

pela substância de alarme (Barreto et al., 2010). Além disso, as respostas de estresse frente a outros estressores são bem documentadas (Fernandes & Volpato, 1993; Alvarenga & Volpato, 1995; Barcellos et al., 1999; Volpato & Barreto, 2001; Corrêa et al., 2003; Barreto & Volpato, 2004, 2006a, 2006b ; Barreto et al., 2010).

## **2. Materiais e métodos**

### *2.a. Animais e condição de estoque*

Tilápias-do-Nilo foram adquiridas em pisciculturas e permaneceram em tanques de estoque de 310 L por no mínimo 30 dias antes dos procedimentos experimentais em densidade populacional de estoque de 1 peixe/ 2 L d'água. A temperatura média da água dos estoques foi de aproximadamente  $26 \pm 1,5$  °C, com oxigenação constante. Os níveis de amônia (<0.5 ppm) e nitrito (<0.05 ppm) permaneceram em baixas quantidades devido filtragem biológica e constantes trocas parciais de água. O fotoperíodo foi de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes (32% proteína) oferecida uma vez por dia em excesso.

### *2.b. Delineamento Experimental*

#### *2.b.1. Avaliação dos efeitos da substância de alarme no comportamento da tilápia-do-Nilo*

A estratégia básica foi avaliar o comportamento dos peixes expostos a 1 ml ou 5 ml de extrato de pele de coespecíficos (substância de alarme) em comparação a indivíduos expostos a extrato de pele de heteroespecífico, o espadinha (*Xiphophorus helleri*,) que não possui células 'club' (Mathis & Smith, 1993), sendo o odor controle, ou somente à água deionizada, veículo utilizado na obtenção dos extratos de pele. Para isso, peixes provenientes da população de estoque foram aleatoriamente escolhidos e alojados em aquários de vidro (22 L de água; 40 x 24 x 23cm; 1 peixe por aquário) por 60 horas para aclimação antes das observações comportamentais. A avaliação comportamental durou 15 minutos consecutivos por peixe, divididos em 3 momentos, como explicado a seguir. Após a aclimação, avaliamos o comportamento dos peixes

por 5 minutos (linha basal). Em seguida, 1 ou 5 ml de um dos estímulos químicos foi injetado na superfície da água e o comportamento dos peixes foi observado por mais 5 minutos consecutivos. Ao término desse período, foi fornecido aos peixes alimento e o comportamento dos mesmos foi monitorado por mais 5 minutos.

### *2.b.2. Efeitos da substância de alarme nos indicadores de estresse na tilápia-do-Nilo*

Foi avaliado se os estímulos químicos (conforme determinado no experimento anterior) modularam a frequência ventilatória (Barreto & Volpato, 2004), bem como os níveis plasmáticos de cortisol e glicose (Barton, 2002), indicadores bem estabelecidos de estresse em peixes. Para tal, os peixes foram individualmente alojados nos aquários de vidro também por 60 horas. Após esse período, os peixes foram expostos a 5 mL de extrato de pele de tilápia ou água deionizada e a frequência ventilatória foi observada a cada minuto durante 5 minutos antes (linha basal) e 5 minutos após o estímulo (n = 15 para extrato de pele de tilápia; n = 13 para água deionizada). Os níveis plasmáticos 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 (10 réplicas independentes em cada intervalo de tempo).

### *2.c. Procedimentos específicos*

#### *2.c.1. Extrato de pele de coespecíficos e heteroespecíficos*

O extrato de pele foi preparado baseado e adaptado de Brown et al. (2004), Foam et al. (2005) e Barreto et al. (2010). Para tal, utilizou-se 3 peixes doadores de cada espécie sacrificados por secção da medula espinhal sem a utilização de anestésicos para evitar interferência química. Em seguida, a pele do peixe foi cuidadosamente retirada

com auxílio de pinça e bisturi, de ambos os lados, e imediatamente colocada em 50 mL de água deionizada. A pele foi homogeneizada e posteriormente filtrada utilizando-se Perlon em um funil de vidro para remover fragmentos remanescentes de tecido. O volume final foi ajustado com adição de água deionizada e a concentração final, tanto do extrato de pele de tilápia, quanto do extrato de espadinha, foi de 2,602 mm<sup>2</sup> de pele por mL de água deionizada (Barreto et al. 2010). Os extratos foram armazenados em tubos falcon de 50 mL e congelados (~ -20°C) até requeridos para experimentação.

### *2.c.2. Condições físico-químicas dos aquários experimentais*

Os aquários experimentais foram suplementados com aeração contínua e aquecedores de 30 W acionados por 30 minutos a cada duas horas, mantendo a temperatura da água aproximadamente em  $26 \pm 1,5^\circ \text{C}$ . O pH ficou em torno de 7,0; e os níveis de amônia (<0.5 ppm) e nitrito (<0.05 ppm) permaneceram em baixas quantidades. O fotoperíodo foi constante com 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

### *2.c.3. Avaliação do comportamento*

A atividade natatória foi estimada pela quantificação da frequência de mudanças de quadrantes (Barreto et al., 2010). Um desenho de grade foi colocado na parede traseira do aquário. Esse desenho possui nove quadrantes (13,3 cm x 8 cm), permitindo estimar a locomoção de cada peixe pelo número de vezes que mudaram de quadrante.

Um tipo de resposta defensiva é apresentar natação rápida em rota de fuga, porém em um aquário isso não é possível, mas ocorre um nado rápido e desordenado de um lado a outro do aquário ('dashes') (Giaquinto & Volpato, 2001), assim, quantificamos a frequência de ocorrência de 'dashes'.

A tilápia-do-Nilo possui espinhos dorsais e quando pareadas com um predador tendem a manter a nadadeira dorsal eriçada, conseqüentemente, os espinhos também (Freitas & Volpato, 2008). Assim, quantificamos o tempo em que a nadadeira dorsal permaneceu eriçada como outro mecanismo de defesa.

Outro fator que pode representar uma resposta antipredatória é o tempo que o peixe passa sem se alimentar, uma vez que a diminuição da atividade de forrageamento representa uma alteração em responder a estímulos ambientais relevantes (Foam et al., 2005). Baseado nisso, quantificamos o tempo total sem a execução de atividade alimentar.

#### *2.c.4. Frequência ventilatória*

Estimou-se os batimentos operculares por minuto (bo/min), quantificando-se o número de batimentos operculares realizados durante 15 segundos e o multiplicando por 4.

#### *2.c.5. 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 rede para aquário e colocado em um compartimento contendo solução de 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. Para tal, 1 mL de heparina foi introduzida na seringa e expelida de volta ao seu frasco. O excesso foi removido puxando e expelindo ar da seringa algumas vezes. Centrifugou-se o sangue a 3000 rpm por 10 min, e o plasma coletado foi transferido com a utilização de uma micropipeta para tubos com tampa e congelados a ~ -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.d. Análise dos dados*

Antes das análises, foram retirados dados discrepantes (outliers) das amostras, identificados pelo teste de Chauvenet, que consiste em identificar os valores acima do valor da média  $\pm 2$  vezes o desvio padrão da amostra. Também, os dados foram analisados quanto à sua homocedasticidade utilizando-se testes de F-max e/ou Levene. Confirmando-se a homocedasticidade dos mesmos, esses foram comparados utilizando-se teste T de Student para amostras independentes quando havia duas condições experimentais ou análise de variância de uma via para três condições independentes, complementado pelo teste de Newman-Keuls quando necessário. Caso contrário, os dados foram transformados utilizando-se raiz quadrada ou logaritmo, adicionando-se uma constante a cada valor para eliminar os valores negativos. A constante era o número positivo equivalente ao menor valor negativo mais 1. Quanto aos dados que ainda assim não apresentaram distribuição homogênea, também foram empregada análise de variância de uma via, complementada por teste de Duncan, utilizando-se fator de correção de Bonferroni, para diminuir a chance de erro do tipo I; ou foram avaliados pela análise de variância de Kruskal-Wallis, complementada pelo teste de Dunn ou teste de Newman-Keuls utilizando-se a soma dos ranks. Foram consideradas diferenças estatísticas quando  $P < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.a. Avaliação dos efeitos da substância de alarme no comportamento da tilápia-do-Nilo

Para o volume de 1 mL, a movimentação foi maior para os indivíduos expostos ao extrato de espadinha comparados aos expostos a extrato de tilápia e água deionizada (ANOVA de uma via,  $F_{(2;31)} = 5,734$ ,  $p = 0,008$ ; Fig. 1A), que por sua vez não diferiram entre si. No caso dos peixes expostos a 5 mL dos estímulos, também foi observada maior movimentação aos expostos ao extrato de espadinha comparado ao extrato de tilápia (ANOVA de uma via,  $F_{(2;55)} = 9,506$ ,  $p = 0,0003$ ; Fig. 1B) e ao grupo de água deionizada. Na comparação entre esses dois últimos grupos, a movimentação foi menor no caso da água deionizada.

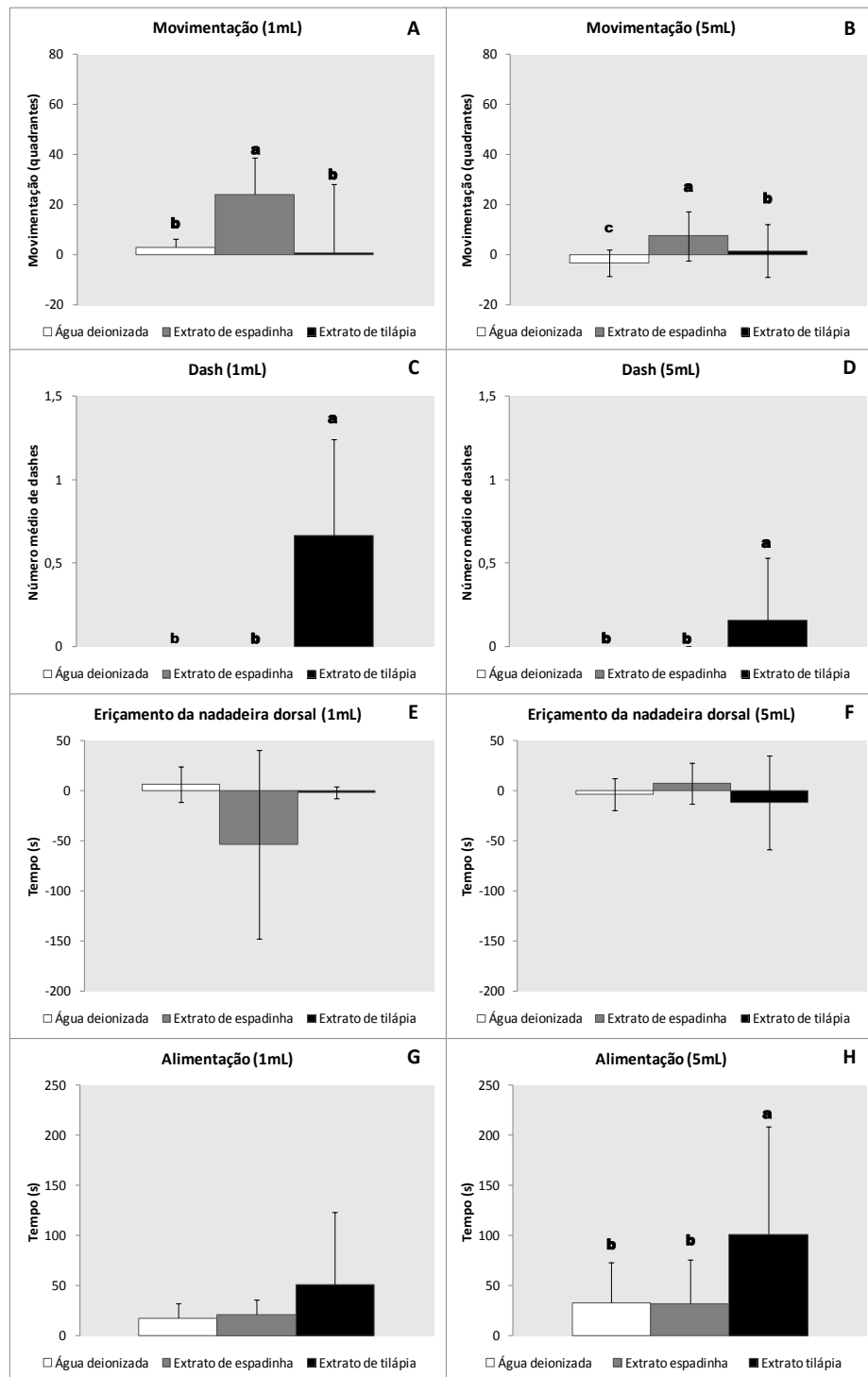
Apenas os indivíduos que receberam o extrato de tilápia deflagraram dashes após a introdução dos estímulos, diferindo dos demais grupos tanto para 1 mL (Kruskal-Wallis ANOVA,  $H_{(2,36)}=13,897$ ,  $p=0,001$ ; Fig. 1C) quanto para 5 mL (Kruskal-Wallis ANOVA,  $H_{(2,56)}=8,238$ ,  $p=0,016$ ; Fig. 1D).

Já para o tempo de eriçamento da nadadeira dorsal, foi analisada a diferença entre o tempo de eriçamento após a introdução do estímulo e o tempo de eriçamento basal. Não houve diferença entre os estímulos aos expostos a 1 mL de extrato (Kruskal-Wallis ANOVA,  $H_{(2,33)}=2,439$ ,  $p=0,295$ ; Fig. 1E), assim como entre os grupos expostos a 5 mL de extrato (Kruskal-Wallis ANOVA,  $H_{(2,55)}=2,540$ ,  $p=0,280$ ; Fig. 1F).

Quanto ao tempo que o animal permaneceu sem atividade de forrageamento não houve diferença entre os grupos para o volume de 1 mL de extrato (Kruskal-Wallis ANOVA,  $H_{(2,35)}=0,632$ ,  $p=0,729$ ; Fig. 1G). Já para 5 mL, o extrato de tilápia



influenciou na resposta do grupo exposto ao extrato de tilápia, que demorou mais tempo para se alimentar (ANAVA de uma via,  $F_{(2;51)} = 4,108$ ,  $p = 0,022$ ; Fig. 1H).



**Figura 1 – Variáveis comportamentais (A, B – movimentação após estímulo menos movimentação basal; C, D – dashes após estímulo; E, F - eriçamento da nadadeira dorsal após estímulo menos eriçamento da nadadeira dorsal basal; G, H - tempo sem se alimentar) em peixes expostos a 1mL (n=12) e 5 mL (n=20) de água deionizada, extrato de espadinha e extrato de tilápia. Valores expressados em médias  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística quando comparado entre os estímulos para a mesma variável (ANAVA de uma via; Kruskal-Wallis ANAVA,  $p < 0,05$ ).**

### 3.b. Efeitos dos estímulos químicos nos indicadores de estresse

O extrato de tilápia causou aumento dos batimentos operculares em relação à água deionizada (teste T não pareado;  $t(25)=2,473$ ;  $p=0,021$ ; Fig. 2). A média dos valores basais foi de 108 bo/min.

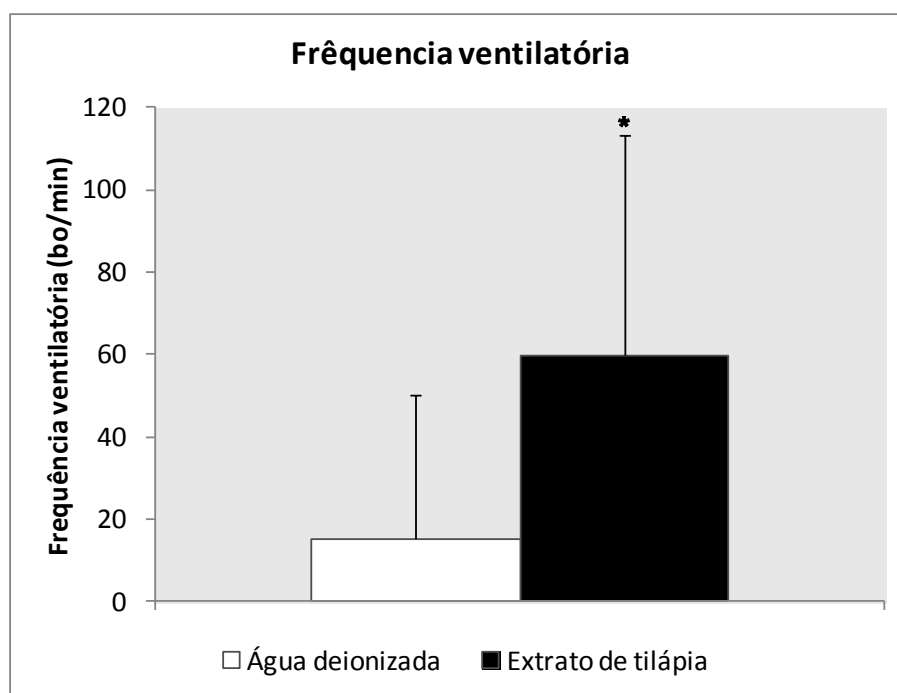


Figura 2 – Frequência ventilatória após estímulo menos frequência ventilatória basal em peixes expostos a 5 mL de água deionizada (n=13) e extrato de tilápia (n=15). Valores expressados em médias  $\pm$  desvio padrão. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos (teste T não pareado,  $p<0,05$ ).

O nível plasmático de cortisol foi estatisticamente maior apenas aos 15 minutos após a injeção do ao extrato de pele na água em comparação com a condição que recebeu água deionizada (teste T não pareado,  $t(17) = 2,325$ ,  $p = 0,033$ ; Fig. 3A). Quanto aos níveis de glicose, não houve diferença significativa em nenhum dos momentos avaliados entre as condições experimentais (teste T não pareado,  $p > 0,05$ ; Fig. 3B).

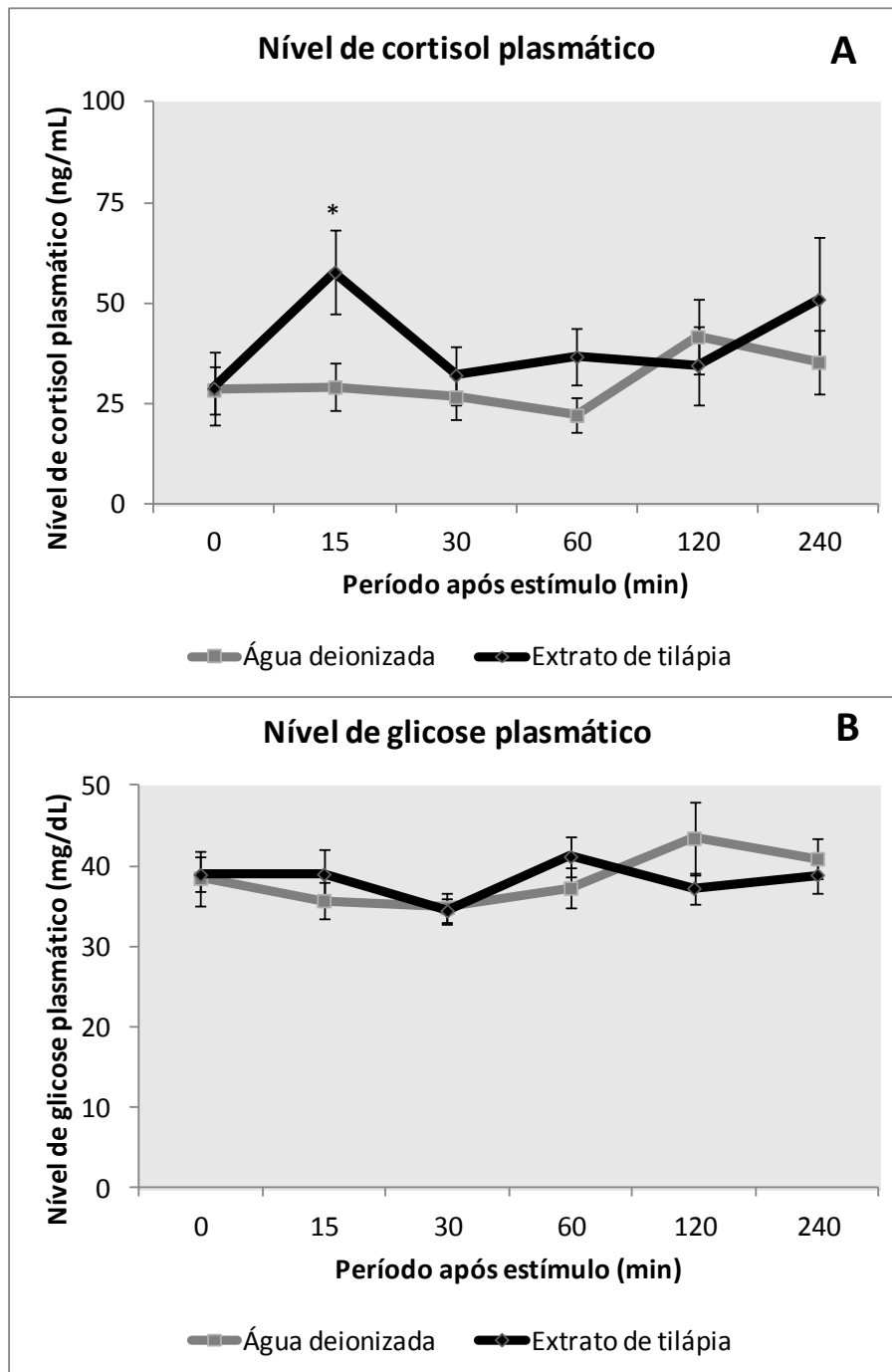


Figura 3 – Nível de cortisol (A) e glicose (B) plasmáticos ao longo do tempo em peixes expostos a 5 mL de água deionizada e extrato de tilápia. (n=10) Valores expressados em médias  $\pm$  erro padrão Asterisco indica diferença significativa entre os grupos no mesmo instante (teste T não pareado,  $p < 0,05$ ).

#### **4. Discussão**

Nesse estudo, mostramos que a substância de alarme induz resposta primária de estresse em tilápias-do-Nilo, mas não secundárias. Observamos que a substância de alarme aumenta tanto a frequência ventilatória quanto causa uma rápida elevação do cortisol plasmático, sem alterações nos níveis plasmáticos de glicose.

Primeiramente confirmamos que a substância de alarme induz resposta defensiva na tilápia-do-Nilo. Avaliamos o efeito de 2 volumes de substância de alarme (1 e 5 ml) e observamos que o volume maior é mais eficaz em induzir resposta defensiva. Ambos os volumes de extrato induziram ‘dashes’, mas não interferem no tempo em que os espinhos dorsais ficaram eriçados. Apesar do eriçamento dos espinhos dorsais ter sido descrito como indicador de resposta defensiva na tilápia-do-Nilo (Freitas & Volpato 2008), esse comportamento pode ter outras funções, como auxiliar na locomoção (Fish & Lauder, 2006). De fato, observamos efeitos da substância de alarme na locomoção. Nesse caso, o maior volume aumentou a atividade natatória e diminuiu a atividade de forrageamento. Em relação a esses 2 últimos comportamentos devemos fazer uma análise conjunta deles para validá-los como uma resposta defensiva. É esperada a diminuição tanto da atividade natatória quanto da atividade alimentar na tilápia-do-Nilo frente a um estímulo químico de alarme (Barreto et al., 2010 e 2013). No presente estudo, utilizamos como estímulo controle extrato de pele de espadinha, que é um extrato comumente usado como controle nesse contexto experimental (Brown et al. 2004; Pollock et al., 2005). Esse extrato controle, por sua vez, induziu aumento da atividade natatória em uma magnitude maior do que o observado para o extrato de pele de tilápia-do-Nilo, sugerindo tratar-se de uma resposta defensiva pronunciada. Contudo, o extrato de espadinha não interferiu no comportamento alimentar, sugerindo então que o aumento da atividade natatória observada frente ao extrato de espadinha está

envolvido com atividades de forrageamento, algo também descrito para outro ciclídeo o *Archocentrus nigrofasciatus* (Pollock et al., 2005). No caso da tilápia, como houve diminuição da atividade alimentar, o aumento da atividade natatória sugere um comportamento exploratório. Visto isso, além do extrato de pele de tilápia ter sido o único a induzir ‘dashes’, concluímos que a tilápia apresenta resposta defensiva à substância de alarme e a avaliação deste estímulo como um potencial estressor é, portanto, válido.

Os valores dos indicadores de estresse quantificados antes da exposição à substância de alarme ao estímulo (basais) tanto da frequência ventilatória, quanto dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose, estão de acordo com os valores esperados para essas variáveis em condições sem estresse. Neste estudo, o comprimento médio dos peixes foi de 8 cm e os valores médios dos batimentos operculares antes da exposição a um estímulo químico foram de 108 bo/min. O batimento opercular para tilápia de ~14.5 cm variou de 69 a 81 bo/min (Volpato et al., 1989; Barreto & Volpato, 2006), e para tilápias de ~6,8 cm foi cerca de 120 bo/min (Alvarenga & Volpato, 1995). A frequência ventilatória é inversamente proporcional ao tamanho do corpo (Schmidt-Nielsen, 1996). Assim, considerando o comprimento médio dos peixes utilizados, consideramos que o valor médio dos batimentos operculares observados está em um patamar que pode ser considerado basal para essa espécie. Aqui, o valor médio de cortisol plasmático foi de 28,7 ng/mL, ficando dentro de um intervalo (de 16,43 a 46,32 ng/mL) de valores basais quantificados em outros estudos para tilápia-do-Nilo foi (Barcellos et al., 1999; Volpato & Barreto, 2001; Biswas et al., 2004). O mesmo ocorreu para a média do valor de glicose (38,51 mg/dL). Valores basais de glicose quantificados em outros estudos variaram entre 34,54 e 130 mg/dL (Fernandes & Volpato, 1993; Yavuzcan et al., 1997; Barcellos et al., 1999; Barreto & Volpato, 2006).

A resposta de estresse induzida pela substância de alarme aqui sugere que isso possa ser um fenômeno espécie-específico. Embora, a substância de alarme possa diminuir a FV em outras espécies de peixe (Barbosa Jr. et al., 2010; Barreto et al., 2012), no caso da tilápia-do-Nilo, já tinha sido relatado que tal estímulo causava um aumento da FV (Barreto et al., 2010), efeito este confirmado neste estudo. A substância de alarme causa aumento nos níveis plasmáticos de cortisol e glicose, como observado para o salmão do pacífico (coho salmon - *Onchorhynchus kisutch* - Rehnberg & Schreck, 1987) e para o peixe pérola de água doce (pearl dace - *Margariscus margarita* - Rehnberg et al., 1987), mas não induz esse efeito no Matrinxã (*Brycon cephalus* - Ide et al., 2003). No presente estudo, observamos apenas aumento do cortisol, sem efeitos nos níveis de glicose. Os níveis plasmáticos de cortisol estavam elevados apenas 15 minutos após a exposição à substância de alarme, retornando a níveis basais já aos 30 minutos após a exposição. Em geral, como o cortisol é um hormônio hiperglicemiante em peixes (Mommsem et al., 1999), espera-se que seu aumento leve a neoglicogênese e aumento dos níveis de glicose. Contudo, não observamos aumento da glicose plasmática. Essa resposta rápida em relação aos níveis de cortisol com pico aos 15 minutos foi observada para o peixe pérola de água doce (pearl dace - *Margariscus margarita* - Rehnberg et al., 1987). Contudo, a glicose exibiu um perfil similar ao cortisol conforme esses autores. Já para o salmão do pacífico a resposta foi mais tardia, ou seja, observou-se aumento dos níveis de cortisol e glicose 1h após a substância de alarme (coho salmon - *Onchorhynchus kisutch* - Rehnberg & Schreck, 1987). Uma possível explicação para isso seria que embora o aumento do cortisol deve estar associado à preparação do corpo antecipadamente para manter uma resposta de defesa. A tilápia, diferentemente dessas 2 outras espécies, é sedentária e em geral restringe suas atividades a territórios, não necessitando de um aumento imediato na glicose plasmática, visto que uma resposta de

fuga poderia ser executada anaerobicamente (Hawkins et al., 2004). Contudo, essa explicação é refutada quando comparamos com a resposta do matrinxã, uma vez que esse peixe apresenta alta atividade natatória e não teve nem um aumento de cortisol nem de glicose frente a substância de alarme. Nesse contexto, não temos evidências suficientes para entendermos o caráter espécie-específico da resposta de estresse à substância de alarme e mais estudos devem ser realizados para esclarecer esse assunto.

## 5. Referências

- Alvarenga CMD, Volpato GL. 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiol Behav*, 57, 75-80.
- Barbosa Júnior A, Magalhaes EJ, Hoffmann A, Ide LM. 2010. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Etholog*, 13 (2), 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. 1999. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquac Res*, 30, 437-444.
- 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. *Mar Freshw Behav Phy*, 43, 75-81.
- Barreto RE, Barbosa A, Hoffmann A. 2012. Ventilatory responses to skin extract in catfish. *Aquat Biol*, 15 (3), 205-214.
- Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL. 2003. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behav Process*, 60, 235-239.
- Barreto RE, Miyai CA, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL. 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. *Behav Process*, 66, 43-51.



- Barreto RE, Volpato GL. 2006. Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors. *J Exp Anim Sci*, 43, 189–196.
- Barton BA. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrat Comp Biol*, 42, 517-525.
- Biswas A, Maita M, Yoshizaki G, Takeuchi T. 2004. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. *J Fish Biol*, 65, 811–821.
- Brown GE, Foam PE, Cowell HE, Fiore PG, Chivers DP. 2004. Production of chemical alarm cues in convict cichlids: the effects of diet, body condition and ontogeny. *Ann. Zool Fennici*, 41, 487-499.
- Chivers DP, Smith RJF. 1998. Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. *Ecoscience*, 5, 338-352.
- Corrêa SA, Fernandes MO, Iseki KK, Negrão JA. 2003. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz J Med Biol Res*, 36, 1725–1731.
- 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*. pp. 109-134. Chicago: University of Chicago.
- Fernandes MO, Volpato GL. 1993. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiol Behav*, 54, 319–23.
- Fish FE, Lauder GV. 2006. Passive and Active Flow Control By Swimming Fishes and Mammals. *Annu Rev Fluid Mech*, 38, 193–224.
- Foam PE, Mirza RS, Chivers DP, Brown GE. 2005. Juvenile convict cichlids (*Archocentrus nigrofasciatus*) allocate foraging and antipredator behaviour in response to temporal variation in predation risk. *Behaviour*, 142, 129-144.

- Franchina CR, Stoddard PK. 1998. Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus* - I. Quantification of day-night changes. *J Comp Physiol A*, 183, 759-768.
- Freitas RHA, Volpato GL. 2008. Behavioral response of Nile tilapia to an allopatric predator. *Mar Freshw Behav Phy*, 41, 267–272.
- 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.
- Gibson AK, Mathis A. 2006. Opercular beat rate for rainbow darters *Etheostoma caeruleum* exposed to chemical stimuli from conspecific and heterospecific. *J Fish Biol*, 69, 224–232.
- 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. *Mutat Res*, 534, 165-172.
- Hawkins LA, Armstrong JD, Magurran AE. 2004. Predator-induced hyperventilation in wild and hatchery Atlantic salmon fry. *J Fish Biol*, 65, 88-100.
- Ide LM, Urbinati EC, Hoffmann A. 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *J. Fish Biol*, 63, 332-343.
- Kats LB, Dill LM. 1998. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*, 5, 361-394.
- Liley, NR. 1982. Chemical communication in fish. *Can J Fish Aquat Sci*, 39, 22-35.
- Mathis A, Smith RJF. 1993: Chemical alarm signals increase the survival time of fathead minnow (*Pimephales promelas*) during encounters with northern pike (*Esox lucius*). *Behav Ecol*, 4, 260–265

- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fisher*, 9, 211–268.
- Nelson J. 1984. *Fishes of the world*. 2nd edn. New York, NY: Wiley Interscience.
- Pandey AK. 1984. Chemical signals in fishes: theory and application. *Acta Hydrog Hydrob*, 12, 463–478.
- Pfeiffer W. 1977. Distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia* 4, 653-665.
- Pollock MS, Friesen RG, Pollock RJ, Kusch RC, Chivers DP. 2005. The avoidance response of fathead minnows to chemical alarm cues: understanding the effects of donor gender and breeding condition. *Chemoecology*, 15, 205–209.
- Rehnberg BG, Schreck CB. 1987. Chemosensory detection of predators by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): behavioral reaction and the physiological stress response. *Can J Zoolog*, 65, 481–485.
- Rehnberg BG, Smith RJF, Sloley BD. 1987. The reaction of pearl dace (Pisces, Cyprinidae) to alarm substance: time-course of behavior, brain amines, and stress physiology. *Can J Zoolog*, 65, 2916–2921.
- Schmidt-Nielsen K. 1996. *Animal Physiology: Adaptations and Environment*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 607.
- 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 Physiol Biochem*, 34, 95-101.

- Smith RJF, Lawrence BJ, Smith MJ. 1991. Cross-reaction to skin extract between 2 gobies, *Asterropterix semipuncatus* and *Brachygobius sabanus*. *J Chem Ecol*, 17 (11), 2253-2259.
- Smith RJF. 1989. The response of *Asterropterix semipuncatus* and *Gnatholepis anjerensis* (Pisces, Gobiidae) to chemical stimuli from injured conspecifics, an alarm response in gobies. *Ethol*, 81 (4), 279-290.
- Smith, ME. 2000. Alarm response of *Arius felis* to chemical stimuli from injured conspecifics. *J Chem Ecol*, 26, 1635–1647.
- Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol*, 22, 158-161.
- 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.
- Volpato GL, Frioli PMA, Carrieri MP. 1989. Hetero-geneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, and a general view about the causal mechanisms. *Biol Fisiol Anim*, 13, 7-22.
- 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. *Philosophic Trans Royal Soc London B - Biol Sci*, 355, 1205-1208.
- Yavuzcan HY, Pulatsu S, Kurtoglu F. 1997. Baseline of haematological and serological parameters of healthy Nile tilapia. *Anim Sci Pap Rep*, 15, 213-217.