



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**Efeito da suplementação dietética com triptofano no comportamento agressivo  
em juvenis de tilápia-do-Nilo.**

Aluna: Bruna Renata Meletti Vieira

Curso: Ciências Biológicas

Orientação: Profa. Dra. Percília Cardoso Giaquinto

Botucatu – SP

2013

## Resumo

Níveis elevados de agressividade estão diretamente relacionados ao crescimento heterogêneo e ao canibalismo, podendo levar a perdas significativas na produção no setor da aquicultura. Uma alternativa para redução da agressividade poderia ser o aumento da produção de serotonina por meio da suplementação dietética com o aminoácido triptofano (TRP). A serotonina é um neurotransmissor que regula diversos processos comportamentais, dentre eles, a agressividade e o estresse. Assim, neste estudo avaliamos o efeito da suplementação dietética com triptofano TRP no comportamento agressivo em juvenis de tilápia-do-Nilo. Os peixes foram mantidos em aquários individuais durante sete dias e alimentados uma vez ao dia “ad libitum” com as dietas: T1(controle: 0,32% de TRP), T2 (1,28% de TRP) e T3 (2,56% de TRP).

O índice de agressividade foi avaliado com base na resposta do peixe à sua imagem no espelho. Contabilizamos o número de ataques (mordidas) à imagem de um espelho posicionado em uma das laterais do aquário durante vinte minutos. Os peixes alimentados com T3 apresentaram menor frequência de mordidas ( $P = 0,010849$ ) durante o período de observação, em comparação ao grupo controle. Concluímos que a dieta contendo 25,6mg/g TRP altera a agressividade em juvenis de tilápia-do-Nilo e que as rações suplementadas com TRP podem ser uma estratégia eficiente no manejo de pisciculturas. Também avaliamos os efeitos do TRP exógeno na ansiedade (teste do objeto novo) e estresse (teste do confinamento) em juvenis da tilápia-do-Nilo, porém não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*; comportamento agressivo; triptofano; serotonina.

## 1. Introdução

Segundo Moyle e Cech (1988), espécies de peixes consideradas territorialistas apresentam interações agressivas que consistem no ataque direto de um indivíduo ao outro (comportamento agonístico). A tilápia-do-Nilo, por ser um peixe territorialista, estabelece uma hierarquia de dominância entre conspecíficos, gerando uma situação de estresse nos dominantes e, principalmente, nos submissos (Fernandes, 1997).

Adicionado a isto, observa-se a ocorrência de um crescimento diferencial entre indivíduos, denominado “crescimento heterogêneo” que está associado às condições de dominância e submissão (Volpato et al., 1989). Assim, a diminuição do comportamento agressivo de dominantes em juvenis de tilápia-do-Nilo poderia permitir aos indivíduos submissos mais acesso à comida, levando ao crescimento mais homogêneo dos peixes. Além disso, poderia minimizar outros efeitos da subordinação social e estresse, como a redução de apetite (Øverli et al., 1998) e aumento da suscetibilidade a doenças (Barton, 1997).

A serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT) é responsável por modular diferentes atividades neuronais e, conseqüentemente, diversas funções fisiológicas e comportamentais, como o controle da agressividade, suscetibilidade ao estresse, ingestão de alimentos e ansiedade. Segundo Fernstrom (1983), o aminoácido essencial triptofano (TRP) é o único precursor da serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT), um neurotransmissor que tem sua biossíntese no encéfalo limitada pela disponibilidade do aminoácido TRP (Boadle-Biber, 1993), sendo possivelmente o teor de TRP o fator limitante para a produção de 5-HT. Assim, acredita-se que uma ingestão elevada de TRP possa aumentar a concentração do aminoácido no encéfalo, aumentando conseqüentemente a biossíntese de serotonina no encéfalo de peixes (Aldegunde et al, 1998; Aldegunde et al, 2000; Johnston et al, 1990; Lepage et al, 2002; Winberg et al, 2000). Similarmente, segundo Winberg, Overli e Lepage (2001), o aumento do teor de TRP na dieta de peixes resulta no aumento da atividade serotoninérgica no cérebro e diminui o comportamento agressivo de trutas arco-íris

(*Onchorhynchus mykiss*), sugerindo que a disponibilidade de TRP está diretamente relacionada à produção de 5-HT em peixes.

Muitos estudos têm apontado para o efeito da suplementação com TRP no controle da agressividade (Höglund et al. 2005) e na atenuação do estresse em algumas espécies de peixes (Lepage et al. 2002). Diversos estudos em vertebrados constatam que a serotonina age inibindo o comportamento agressivo por meio do aumento da atividade serotoninérgica (Fuller 1996; Hseu et al. 2003; Perreault et al. 2003; Höglund et al. 2005). Além disso, é provável que tais efeitos sejam mais acentuados em indivíduos dominantes, que consomem maior quantidade de ração oferecida (Winberg et al. 2001). Conseqüentemente, a suplementação dietética com TRP permitiria um crescimento mais homogêneo entre os indivíduos e reduziria o canibalismo, como foi recentemente mostrado em juvenis de garoupa, *Pinephelus coioides* (Hseu et al., 2003).

O objetivo do presente estudo foi avaliar se rações suplementadas com TRP são alternativas efetivas para reduzir o comportamento agressivo em juvenis de tilápia-do-Nilo, espécie de relevante valor econômico na piscicultura. Tais efeitos podem oferecer uma ferramenta potencial para diminuir a heterogeneidade e o canibalismo nas criações intensivas que optarem por essa espécie. Além disso, estudos recentes em vertebrados demonstraram que níveis elevados de 5-HT podem reduzir a ansiedade (Rouvinem, et al. 1999) e o estresse (Lepage, O.; Tottmar, O.; Winberg, S., 2002). Portanto, também procuramos avaliar os efeitos sob os peixes de rações suplementadas com TRP nos comportamentos relacionados ao estresse e ansiedade.

## **2.1. Materiais e métodos**

### *2.1. Animais e condições de estoque*

Foram utilizados juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) provenientes do Biotério de Peixes do Departamento de Fisiologia (Unesp-Botucatu), com tamanho variável entre 7,7 e 11,4 cm. Os peixes já estavam aclimatados e mantidos em tanques de plástico de 500 litros (25 peixes/L) com temperatura entre 26 a 28°C e fotoperíodo (12 horas de claro/12 horas de escuro). O pH permaneceu próximo de 7 e os tanques eram providos de aeração contínua com biofiltros e renovação constante da água, com o objetivo de manter a qualidade da mesma. Os peixes foram alimentados *ad libitum* uma vez ao dia com ração peletizada convencional com 32% de proteína e 0,32% de triptofano, atendendo às exigências nutricionais segundo as recomendações de NCR (2011).

### *2.1. Delineamento experimental e procedimentos*

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais:

T 1: Controle comercial (0,32% de triptofano);

T 2: ração acrescida de TRP em 4 vezes (1,28% de triptofano);

T 3: ração acrescida de TRP em 8 vezes (2,56% de triptofano).

Os peixes foram mantidos em aquários individuais (23L; 40 x 23 x 25 cm) com aeração constante, temperatura próxima de 26°C e alimentados *ad libitum* com as rações de acordo com o grupo experimental de cada indivíduo. Os aquários eram sifonados a cada dois dias, retirando as fezes e restos de ração com a finalidade de manter a qualidade da água.

### *Teste do espelho*

Os peixes foram mantidos nos aquários individuais e alimentados uma vez ao dia com as rações correspondentes a cada tratamento durante 7 dias antes do experimento. O número experimental foi de 30 peixes (10 indivíduos em cada tratamento), sendo 21 machos e 9 fêmeas. O objetivo foi mensurar a agressividade através do teste do espelho (Francis, 1990). O peixe não reconhece a própria imagem refletida no espelho e a ataca como se fosse um intruso (Rowland, 1999). Assim, a agressividade foi mensurada considerando-se o número de ataques (mordidas) à imagem do peixe no espelho. O espelho foi posicionado do lado externo de uma das laterais do aquário e uma folha de papel opaco foi colocada entre ambos com o objetivo de evitar a visão do peixe no espelho. A folha de papel foi então retirada para o início do teste. Nos próximos vinte minutos, contabilizamos o número de vezes que cada peixe mordeu o espelho. O ato de morder partes do corpo do oponente durante um confronto representa um comportamento agonístico (Alvarenga & Volpato, 1995) e, portanto, está relacionado à agressividade. Dessa maneira, o objetivo nesse experimento foi avaliar se a intensidade da resposta agressiva difere entre os animais tratados com níveis crescentes de triptofano na dieta.

### *Confinamento por restrição de espaço*

Os peixes foram aclimatados por aproximadamente dois meses, sendo 21 animais (12 machos e 9 fêmeas) divididos em 3 tratamentos (7 réplicas cada, contendo 4 machos e 3 fêmeas). Antes do experimento foram quantificadas as frequências basais de cada indivíduo, para tal foi medido o tempo (em segundos) necessário para 20 movimentos operculares ou bucais sucessivos. Posteriormente foi feito o cálculo para se obter a frequência ventilatória por minuto, como utilizado por Alvarenga & Volpato (1995). O confinamento foi realizado deslocando-se o peixe para um dos cantos do aquário por meio de uma placa de acrílico opaca e vazada. Cada peixe foi confinado durante vinte

segundos e as frequências ventilatórias foram novamente medidas após 1 minuto, 5 minutos e 15 minutos do estímulo estressor.

#### *Teste do objeto novo*

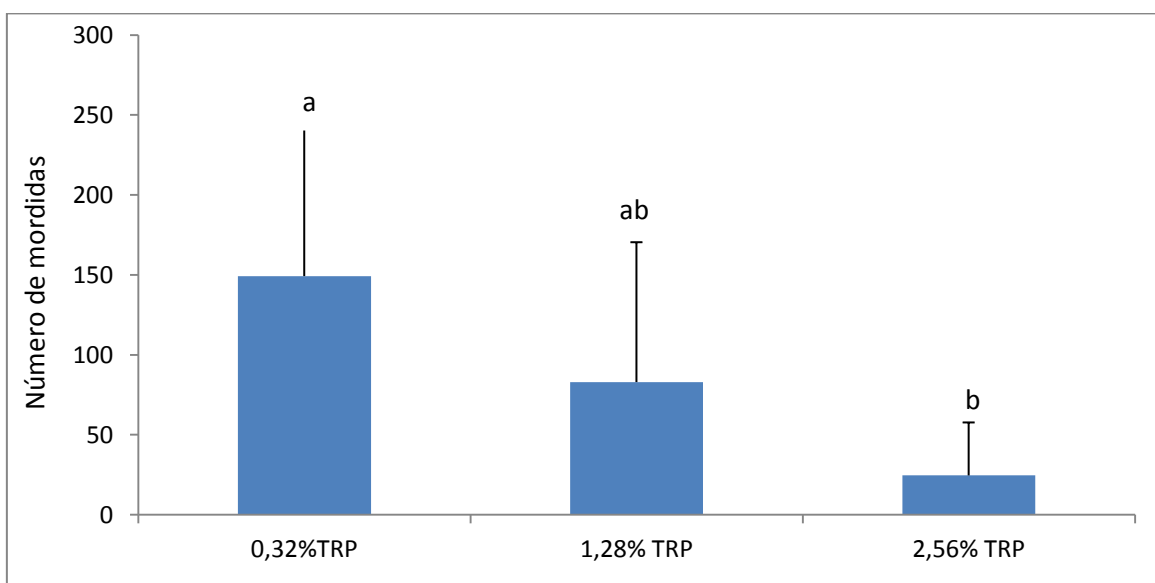
Os peixes foram aclimatados e alimentados durante quinze dias antes do experimento. O número experimental de 30 peixes foi escolhido ao acaso quanto ao gênero. Neste teste, avaliamos a reação do peixe frente a um objeto não familiar inserido no aquário. Os aquários foram marcados por três linhas verticais feitas com caneta marcador permanente, dividindo o aquário em quatro partes. Quando o peixe se encontrava em um dos cantos do aquário, o objeto novo (cilindro vermelho de PVC de 6 cm x 8 cm) era inserido no canto oposto. A reação foi filmada por 5 minutos e analisamos a aproximação do peixe ao objeto novo a partir das seguintes condições: tempo para ultrapassar a primeira linha (L1), tempo para ultrapassar a segunda linha (L2), tempo para ultrapassar a terceira linha (L3), tempo gasto perto do objeto e o tempo em movimento.

#### *Análises estatísticas*

No teste do espelho, a normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk's e a homocedasticidade por meio do teste de Levene's, considerando-se  $P = 0,05$ . Os dados foram homocedásticos ( $P = 0,08$ ) e as diferenças entre os tratamentos e os grupos foram testadas usando a Análise de Variância Simples (One-way ANOVA). No teste de confinamento por restrição de espaço foi feita análise de variância com medidas repetidas e no teste do objeto novo foi feita Análise de Variância Simples (One-way ANOVA). Em todos os testes foram retirados das análises estatísticas todos os valores individuais que se distanciavam da média em mais de duas vezes o desvio padrão ("outliers").

### **3. Resultados**

A suplementação com TRP reduziu significativamente o número de mordidas à imagem refletida no espelho em juvenis de tilápia-do-Nilo durante o tempo total de observação. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos T1 e T2 ( $P = 0,19$ ) e entre os tratamentos T2 e T3 ( $P = 0,27$ ). A única diferença significativa encontrada foi entre os tratamentos T1 e T3 ( $P = 0,01$ ), mostrando que os peixes alimentados com a ração contendo 2,56% TRP morderam menos vezes o espelho em comparação ao grupo controle. Esses dados se encontram na Figura 1.



**Figura 1. Agressividade na tilápia-do-Nilo – Teste do espelho.** Dados médios (+ DP,  $n = 7$  machos e 3 fêmeas para cada tratamento) computados durante 20 minutos após apresentação do espelho ao animal. Dados com letra diferente são diferentes estatisticamente (Tukey,  $p = 0,01$ )

Nos testes do objeto novo e confinamento por restrição de espaço não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

#### 4. Discussão

A tilápia-do-Nilo é conhecida pelo seu comportamento agressivo e territorialista, além de ser uma das espécies de maior relevância econômica na piscicultura mundial. Dessa maneira, é importante a busca de alternativas que reduzam níveis muito



elevados de agressividade, que levariam à perdas na produção. Neste estudo verificamos que a suplementação com TRP na dieta reduziu o comportamento agressivo em juvenis de tilápia-do-Nilo, assim como foi demonstrado em estudos similares realizados em outras espécies de peixes (Höglund et al, 2005; Wolkers et al., 2012) e em mamíferos (Blanchard et al., 1991, 1998).

Conhecimentos sobre o controle da síntese de 5-HT em vertebrados não mamíferos ainda são escassos. Entretanto, segundo Höglund et al. (2005) a relação entre o TRP presente no cérebro e a atividade serotoninérgica sugere que a síntese e atividade da 5-HT são levadas à saturação em juvenis de bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) alimentados com ração suplementadas com 28,8mg/g de TRP. Neste caso, é provável que doses ainda menores de TRP poderiam gerar aumento da atividade serotoninérgica e diminuir o comportamento agressivo. Neste estudo o teor mais elevado de TRP utilizado foi 25,6mg/g, sugerindo que o valor de saturação de TRP para a tilápia-do-Nilo seja doses maiores do que esta. Além disso, peixes alimentados com ração de teor de TRP 12,8mg/g não apresentaram diminuição do comportamento agressivo, indicando que, possivelmente, esta concentração não é suficiente para induzir de maneira significativa a atividade serotoninérgica no cérebro de juvenis da tilápia-do-Nilo. Em comparação, Winberg et al. (2001) demonstrou que trutas arco-íris apresentaram a mesma supressão de agressividade quando alimentadas com rações suplementadas com 8,38 e 74,3mg/g de TRP.

A 5-HT também parece estar diretamente relacionada à suscetibilidade ao estresse, e o aumento da síntese desse neurotransmissor pode reduzir os níveis plasmáticos de cortisol, hormônio diretamente envolvido na resposta ao estresse, como demonstrado por Lepage, O.; Tottmar, O.; Winberg, S. (2002). Neste estudo não avaliamos os parâmetros fisiológicos do estresse, como os níveis de cortisol e glicose. A avaliação do estresse foi feita a partir da resposta comportamental dos indivíduos submetidos ao teste do espelho, mas não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos T1, T2 e T3. O teste foi feito uma vez por semana durante um mês e, em nenhuma

das situações, houve diferença entre os tratamentos. Possivelmente, o teor de TRP oferecido nas rações não foi suficiente para a síntese de 5-HT necessária para induzir resposta nos mecanismos relacionados à resposta ao estresse. Há ainda a possibilidade de os peixes terem se familiarizado com as condições do teste, uma vez que este foi repetido ao longo de quatro semanas. Mais estudos são necessários para compreender melhor a relação entre TRP, 5-HT e estresse na tilápia-do-Nilo.

Segundo Rouvinen, K. et al. (1999) o TRP reduz o medo e aumenta o comportamento exploratório em fêmeas de raposas (*Vulpes vulpes*), contrastando com os resultados obtidos em nosso estudo. Entretanto, Bosch, G. et al. (2009), concluiu que dietas suplementadas com TRP não alteram os comportamentos relacionados à ansiedade em cães domésticos, sugerindo que a ausência de efeitos poderia ter sido devido a um conteúdo inadequado de TRP na dieta oferecida.

Este estudo mostra que rações suplementadas com o precursor da serotonina, o aminoácido essencial triptofano, pode diminuir o comportamento agressivo em juvenis de tilápia-do-Nilo, peixe de grande interesse econômico mundial. Além disso, pode fornecer subsídios para novos estudos a fim de melhorar o desempenho de pisciculturas que optem por esta espécie.

## 5. Referências Bibliográficas

Aldegunde, M.; Garcia, J.; Soengas, J. L.; Rozas, G. (1998). Uptake of tryptophan into brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Zool., 282, 285–289.

Aldegunde, M.; Soengas, J. L.; Rozas, G. (2000). Acute effects on tryptophan hydroxylation rate in brain regions (hypothalamus and medulla) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Zool., 286, 131–135.

Alvarenga, C. M. & Volpato, G. L. (1995). Agonistic profile and metabolism in alevins of Nile tilapia. Physiology & Behavior, 57, 75-80.

Barton, B.A., (1997). Stress in finfish: past, present and future—a historical perspective. Em: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), Fish Stress and Health in Aquaculture (pp. 1-33). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Blanchard, D.C., Cholvanich, P., Blanchard, R.J., Clow, D.W., Hammer Jr., R.P., Rowlett, J.K., Bardo, M.T., (1991). Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. Brain Res. 568, 61–66.

Blanchard, D.C., Griebel, G., Rodgers, R.J., Blanchard, R.J., (1998). Benzodiazepine and serotonergic modulation of antipredator and conspecific defense. Neurosci. Biobehav. Rev. 22, 597– 612.

Boadle-Biber, M. C. (1993). Regulation of serotonin synthesis. Prog. Biophys. Mol. Biol., 60, 1–15.

Fernandes, M.L.V.(1997). Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

Fernstrom, J.D., (1983). Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol. Rev.* 63, 484–546.

Francis, R. C. (1990). Temperament in fish, a longitudinal study of the development of individual differences in aggression and social rank in the Midas cichlid. *Ethology*, 86, 311-325.

Fuller, R. W. (1996). The influence of fluoxetine on aggressive behavior. *Neuropsychopharmacol*, 14(2), 77-81.

Höglund, E., Bakke, M. J.; Øverli, Ø; Winberg, S.; Nilsson, G. E. (2005). Suppression of aggressive behavior in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture*, 249, 525-531.

Hseu, J. R.; Lu Fi.; Su, H.M.; Wang, L.S.; Tsai, C.L.; Hwang P.P. (2003). Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 1, 1-12.

Johnston, W. L.; Atkinson, J. L.; Hilton, J. W.; Were, K. E. (1990). Effect of dietary tryptophan on plasma and brain tryptophan, brain serotonin, and brain 5-hydroxyindoleacetic acid in rainbow trout. *J. Nutr. Biochem.*, 1, 49–54.

Lepage, O.; Tottmar, O.; Winberg, S.(2002). Elevated dietary intake of l-tryptophan

counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol., 205, 3679– 3687.

Moyle, P. B.; Cech Junior, J. J. (1988). Fishes: An Introduction to ichthyology (2a ed.). New Jersey: Prentice Hall.

Øverli, Ø., Winberg, S., Damsgaard, B., Jobling, M., (1998). Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic char (*Salvelinus alpinus*): role of brain serotonergic activity and social interactions. Can. J. Zool. 76, 1366– 1370.

Perreault, H. A. N.; Semsar, K; Godwin, J. (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. Physiol. Behav. 79, 719– 724.

Rouvinem, K.; Archbold, S.; Laffin, S.; Harri, M. (1999). Long-term effects of tryptophan on behavioural response and growing-furring performance in silver fox (*Vulpes vulpes*). Applied Animal Behaviour Science 63, 65–77.

Rowland, W. J. (1999). Studying visual cues in fish behavior: a review of ethological techniques. Environmental Biology of Fish, 56, 285-305.

Volpato, G. L. (1989). The unexploited potential of tilapia hybrids in aquaculture. Aquaculture and Fisheries Management, 25, 781-788.

Winberg, S., Øverli, Ø., Lepage, O., (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by dietary tryptophan. J. Exp. Biol. 204, 3867–3876.

Wolkers, C. P. B.; Serra, M.; Hoshiba, M. A.; Urbinati, E. C.(2012). Dietary l-tryptophan alters aggression in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus*. Fish Physiol Biochem. 38, 819-827.