

COMPORTAMENTOS QUE ALIVIAM ESTRESSE NOS ANIMAIS:
UMA REVISÃO E ALGUNS DADOS NOVOS NA TILÁPIA-DO-
NILO

EVELINE MOLICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Rodrigo Egydio Barreto

**BOTUCATU – SP
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

COMPORTAMENTOS QUE ALIVIAM ESTRESSE NOS ANIMAIS:
UMA REVISÃO E ALGUNS DADOS NOVOS NA TILÁPIA-DO-
NILO

EVELINE MOLICO

RODRIGO EGYDIO BARRETO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Rodrigo Egydio Barreto

**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 - CRB 8/5651

Molico, Eveline.

Comportamentos que aliviam estresse nos animais: uma revisão e alguns dados novos na tilápia-do-Nilo /Eveline Molico. Botucatu – 2013

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

Orientador: Rodrigo Egidio Barreto

Capes: 20404000

1. Tilápia (Peixe) - Comportamento. 2. Reprodução animal. 3. Stress (Fisiologia). 4. Animais - Proteção.

Comportamento; Escavação;Estresse; tilápia-do-Nilo.

DEDICATÓRIA

A Deus pela vida e pelas maravilhosas oportunidades que me concedeu.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo amor incondicional e confiança na realização dos meus sonhos.

Ao meu pai, pelas palavras de encorajamento e confiança na minha caminhada.

Ao Maiko, meu noivo, por todo o incentivo e palavras de carinho e por estar sempre ao meu lado.

À minha irmã Aline, por me acompanhar nessa minha caminhada.

À minha família, que sempre me deu apoio financeiro e psicológico.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Egidio Barreto, pela orientação deste trabalho, também por acreditar nos meus propósitos e pela amizade constante.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia: Daniele, Fábio, Diogo e Fernanda pelo auxílio durante os experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada-IBB-UNESP e seus colaboradores pela agilidade e competência.

Aos professores, Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dr. Helton Carlos Delício e Dr.ªPercília Cardoso Giaquinto pela contribuição no exame de qualificação.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada à todos.

EPÍGRAFE

*"Três regras básicas: no caos está a
simplicidade. No conflito está a
harmonia. No meio da dificuldade está a
oportunidade". Albert Einstein*

SUMÁRIO

Capítulo 01- Respostas de estresse e comportamentos que aliviam estresse nos animais

| | |
|--|----|
| 1. RESUMO..... | 01 |
| 2. ABSTRACT..... | 02 |
| 3. CONCEITO GERAL SOBRE ESTRESSE..... | 03 |
| 4. PRINCÍPIOS GERAIS DAS RESPOSTAS DE ESTRESSE..... | 03 |
| 4.1. PRIMÁRIAS..... | 04 |
| 4.2. SECUNDÁRIAS..... | 05 |
| 4.3. TERCIÁRIAS..... | 07 |
| 5. CONSEQUÊNCIAS DO ESTRESSE À SAÚDE E BEM-ESTAR ANIMAL..... | 07 |
| 6. EVOLUÇÃO DOS COMPORTAMENTOS DE ALÍVIO DO ESTRESSE..... | 08 |
| 7. COMPORTAMENTOS PARA ALÍVIO DO ESTRESSE..... | 09 |
| 7.1. COMPORTAMENTOS EM ANIMAIS NÃO HUMANOS..... | 09 |
| 7.2. COMPORTAMENTOS EM ANIMAIS HUMANOS..... | 10 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 11 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 12 |

Capítulo 02 - Comportamento de escavar e estresse na tilápia-do-Nilo

| | |
|--|----|
| 1. RESUMO..... | 17 |
| 2. ABSTRACT..... | 18 |
| 3. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 22 |
| 4.1. Animais e condições de estoque..... | 22 |
| 4.2. Delineamento experimental..... | 23 |
| 4.3. A coleta de sangue e análise de cortisol..... | 23 |
| 4.4. Condições dos aquários..... | 24 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 4.5. Análise dos dados..... | 24 |
| 5. RESULTADOS..... | 24 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 26 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 27 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 28 |

**CAPÍTULO 01 - RESPOSTAS DE ESTRESSE E COMPORTAMENTOS QUE
ALIVIAM ESTRESSE NOS ANIMAIS**

1. RESUMO

O termo Estresse se caracteriza como reações comportamentais e neurovegetativas de defesa dos animais em resposta a estímulos do meio que ameaçam a homeostasia. Essas respostas de estresse têm sido selecionadas ao longo da evolução para capacitar os organismos a enfrentar situações que requerem algum tipo de ação emergencial para superar o estressor ou ameaça. Nesse sentido, é fundamental compreender o papel essencial do estresse na preparação física para proteção e sobrevivência de qualquer organismo vivo. No entanto, conforme a intensidade e frequência de ocorrência do estressor, podem haver comprometimentos graves à saúde e ao bem-estar animal envolvendo problemas de crescimento, de reprodução e imunológicos, aumentando a incidência de doenças e podendo levar à morte. O alívio do estresse envolve redução da atividade do eixo HPA/HPI (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal/Hipotálamo-Pituitária-Interrenal) com conseqüente diminuição dos níveis de glicocorticoides. Assim, comportamentos que promovem alívio de estresse evoluíram nos animais, pois é adaptativo evitar o progresso do estresse para níveis de respostas que são deletérias.

Palavras-chave: estresse; comportamento; bem-estar.

2. ABSTRACT

The term stress is characterized as neurodegenerative and behavioral reactions animal rights in response to threats from the environment. These stress responses have been selected during evolution to enable organizations to face situations that require some type of emergency action to overcome the stressor or threat. In this sense, it is essential to understand the essential role of stress in physical preparation for protection and survival of any living organism. However, as the intensity and frequency of occurrence of the stressor, there may be severe compromise the health and welfare problems involving growth, reproductive and immune systems, increasing the incidence of disease and can lead to death. The stress relief involves reducing HPA activity / HPI (Hipotálamo-Pituitária-Adrenal/Hipotálamo-Pituitária-Interrenal) with consequent reduction in the levels of glucocorticoids. Thus, behaviors that promote stress relief must have evolved in animals because it is adaptive to prevent progress to levels of stress responses that are deleterious.

Keywords: stress; behavior; welfare.

3. CONCEITO GERAL SOBRE ESTRESSE

Do ponto de vista evolutivo o termo Estresse se caracteriza como reações de defesa dos animais em resposta a ameaças do meio. Essas respostas são comportamentais e neurovegetativas. Foi o canadense Hans Selye (fisiologista) em 1936 que introduziu o termo “stress” no campo da saúde para designar a resposta geral e inespecífica do organismo a um estímulo ou situação que poderia potencialmente perturbar a homeostasia. Estímulos dessa natureza foram posteriormente chamados de estressores e o termo estresse, então, passou a ser utilizado para designar a situação que desencadeia os efeitos dos estressores. Nesse sentido, qualquer estímulo que perturbe a homeostasia de um animal, é um agente estressante. Conforme a intensidade e frequência de ocorrência do estressor pode haver comprometimentos graves à saúde e ao bem-estar (SPRAKER, 1993).

4. PRINCÍPIOS GERAIS DAS RESPOSTAS DE ESTRESSE

Apesar das reais consequências do estresse à saúde e bem-estar dos organismos, sabe-se que as respostas de estresse têm sido selecionadas ao longo da evolução para capacitar os organismos a enfrentar situações que requerem algum tipo de ação emergencial para superar o estressor ou ameaça. Assim, os mecanismos de estresse existem desde o início da história da vida. Embora as reações de estresse possam se tornar prejudiciais à saúde e ao bem-estar do animal, é fundamental a compreensão de seu valor adaptativo, ou seja, compreender as situações em que as respostas de estresse podem ser úteis. Nesse âmbito, é essencial o papel do estresse na preparação física para proteção e sobrevivência de qualquer organismo vivo (NESSE E YOUNG, 2000).

São vários os aspectos envolvendo o Estresse, bem como, são diversas as reações desencadeadas por um agente estressor. Estas respostas estão relacionadas com a busca de soluções e condutas adequadas e levam a alterações fisiológicas de maneira a preparar o

organismo para agir de maneira a lidar com o estressor. Tais respostas podem ser primárias, secundárias e terciárias.

4.1. PRIMÁRIAS

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. Como respostas primárias, um estressor pode aumentar a atividade do sistema nervoso central através de circuitos cerebrais que integram as respostas emocionais. Em mamíferos estruturas como o giro do cíngulo, o córtex pré-frontal, o septo, hipocampo, a amígdala e o hipotálamo fazem parte do **sistema límbico**, a unidade responsável pelas emoções e comportamentos sociais. A amígdala é o centro identificador do perigo gerando medo e provocando situações de alerta. O hipotálamo tem papel fundamental no aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático (SNS), culminando com aumento de níveis plasmáticos de catecolaminas. As catecolaminas são liberadas pelas células cromafins presentes na medula adrenal ou no tecido inter-renal no caso dos peixes. Essas células se comunicam com neurônios pré-sinápticos do SNS e, embora as células cromafins sejam células especializadas, elas conservam similaridades funcionais aos neurônios pós-sinápticos do SNS. Da interação dessas células com vasos sanguíneos, é possível a liberação na corrente sanguínea de tais substâncias quando ocorre aumento da atividade do SNS (STOLTE *et al.*, 2008 E BARTON, 2002).

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 glicocorticóides, como o cortisol (**figura 1**). Isso é possível devido à liberação do hormônio CRH (Hormônio liberador da corticotrofina), que estimula a hipófise a liberar outro hormônio, o ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) na corrente sanguínea. Dessa forma, o ACTH estimula a glândula adrenal a produzir e liberar os hormônios glicocorticóides (BARTON, 2002).

Além dos glicocorticóides, neurotransmissores, como a serotonina, por exemplo, são importantes reguladores da atividade do eixo nas respostas endócrinas de mamíferos e também em peixes, tendo papel importante no controle dos comportamentos agressivos (SIVIY, 1998).

O funcionamento desses eixos é responsável pela estimulação de rápidos ajustes das funções cardiovasculares e respiratórias, assim como aumento da síntese de glicose, desvio de sangue para os músculos, aumento da tensão muscular, e de coagulação sanguínea para o fornecimento de energia, força muscular e reparo de tecidos, o que permite ao animal comportamentos, comumente, envolvendo mecanismos de ‘luta e fuga’ (BARTON, 2002).

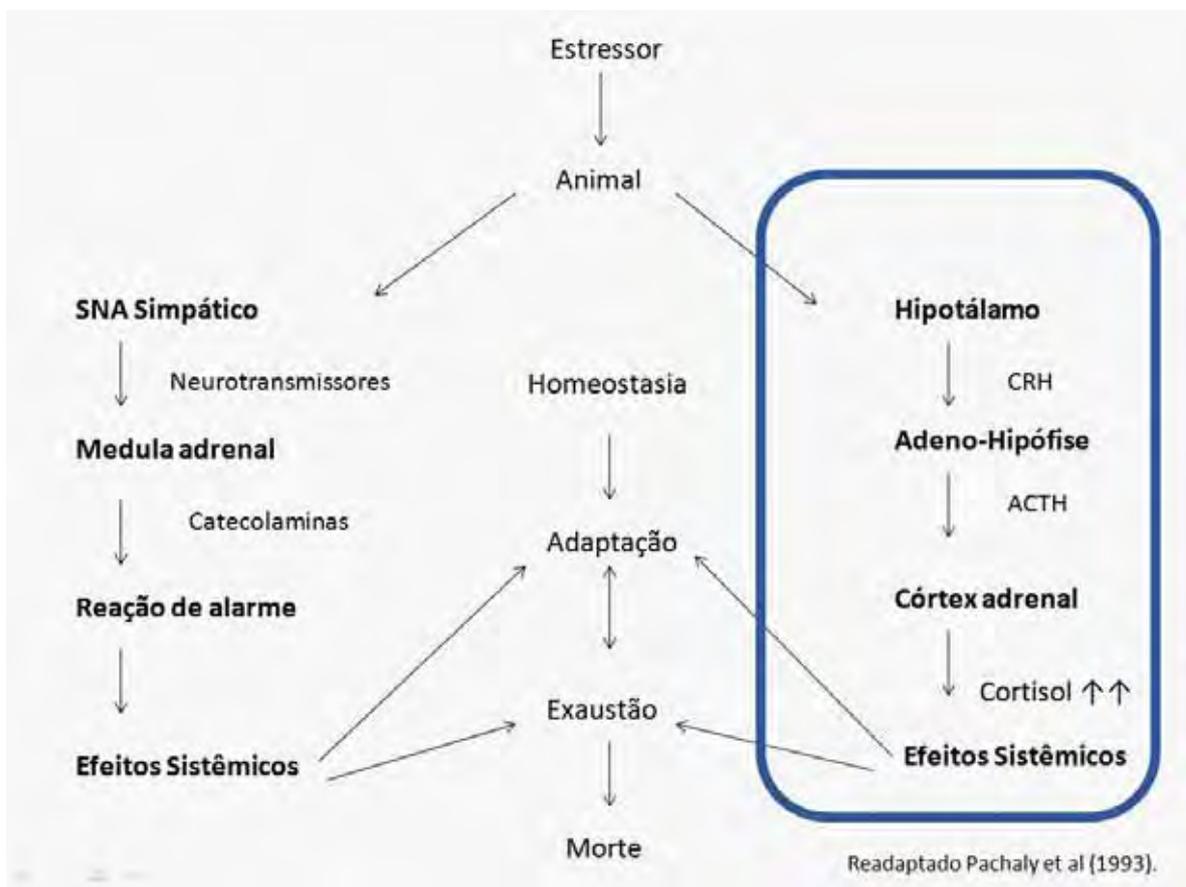


Figura 1. Esquema dos eventos relacionados à reação do organismo ao agente estressor. Adaptado de Pachaly *et al*, 1993.

4.2. SECUNDÁRIAS

A resposta secundária é uma adaptação fisiológica e comportamental às condições de estresse. Nesta fase ocorre indução de grandes alterações plasmáticas, respiração, funções metabólicas, celulares e imunitárias. Tem sido demonstrado que existe uma relação estreita entre

o sistema imunológico e a resposta ao estresse envolvendo glicocorticóides de efeitos anti-inflamatórios e alterações relevantes nas células do sistema imunológico, bem como, estimulação da produção de cortisol desencadeada pelas citocinas (FULFORD E HARBUZ, 2005). Mudanças no balanço hidromineral e no equilíbrio ácido-base também têm sido relatadas (PICKERING, 1981; IWAMA *et al.*, 1997, 1998; MOMMSEN *et al.*, 1999).

As adaptações comportamentais envolvem o ‘enfrentamento ou a fuga’. Diante de um agente estressor o animal decidirá sua resposta. Em algumas situações ocorre a passividade, na qual o animal fica estático, sem reação nenhuma; o que pode ser chamado de “freezing”. A escolha vai depender de um aprendizado prévio de um comportamento bem sucedido. Esta conduta possivelmente será reforçada no enfrentamento de outra situação similar (GRAEFF *et al.*, 1997 E BRANDÃO *et al.*, 2003).

É importante considerar que a resposta ao estresse depende, em grande parte, da forma como o animal filtra e processa a informação e de sua avaliação sobre as situações a serem consideradas como agradáveis ou não. Isso determina a forma de responder e como o animal será afetado pelo estresse. Os recursos fisiológicos a serem recrutados também dependerão da decisão comportamental do animal (MARGIS *et al.*, 2003) (**figura 2**).

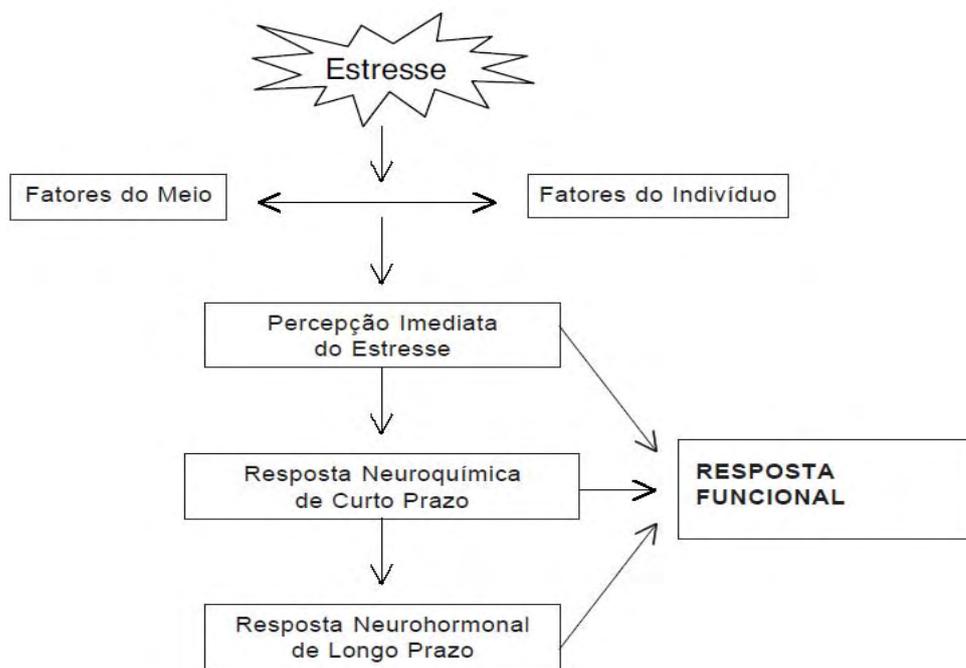


Figura 2. Fluxograma dos níveis de resposta biológica ao estresse. Adaptado Margis *et al.*, 2003.

4.3. TERCIÁRIAS

A resposta terciária está relacionada com o prolongamento do estímulo estressor e acarreta mudanças bastante crônicas no organismo. Esse tipo de resposta resulta da exposição contínua do animal a um evento de estresse que exige custos biológicos muito altos podendo levar o animal a um estado pré-patológico e, mais tarde, possivelmente, resultar em uma situação patológica. Devido à estimulação constante do eixo HPA e consequentes níveis aumentados de glicocorticóides e catecolaminas, esta fase do estresse tem efeitos danosos prejudicando várias funções biológicas envolvendo diminuição do crescimento e redução da massa muscular, diminuição da resistência a doenças e desvio de energia de atividades metabólicas básicas para continuar a lidar com o estressor, podendo, dessa forma, levar à morte (MOBERG, 1985).

5. CONSEQUÊNCIAS DO ESTRESSE À SAÚDE E BEM-ESTAR ANIMAL

O bem-estar pode ser definido como um estado onde o animal tem plenas condições fisiológicas e comportamentais de lidar com as potenciais ameaças do meio. Um pobre bem-estar ocorre quando falham os mecanismos de ajustes ambientais. Isso pode ocorrer quando o animal vive a experiência de distresse, ou seja, passa por eventos de estresses negativos, impossibilitando-o de lidar com as mudanças do meio. Geralmente isso é observado quando o animal enfrenta um estresse crônico, no qual são exigidos muitos recursos físicos e alto gasto de energia constante. O que não ocorre num estresse agudo, já que as condições físicas são rapidamente recuperadas (BROOM, 2008 E MOBERG, 2000), nos levando a concluir que a resposta de estresse que permitiu a recuperação do animal a seu estado homeostático é parte do estado de bom bem-estar (VOLPATO *et al.*, 2007 E VOLPATO, 2009).

A permanência em uma situação estressora pode causar alterações orgânicas graves, como por exemplo, a supressão de células de defesa aumentando a incidência de doenças e podendo levar à morte. Isso se deve aos níveis de cortisol permanentemente aumentados, o que faz com que o sistema imunológico mantenha-se suprimido. Além disso, podem ocorrer problemas de reprodução ou mesmo prejudicando o desenvolvimento (MOBERG, 1985). Em

peixes, o aumento do cortisol plasmático dificulta sobremaneira o desenvolvimento gonadal, resultando em problemas na reprodução (BONGA, 1997).

Estudos realizados com ratos e primatas relacionam o estresse aos problemas de ovulação. Nestes animais a estimulação do eixo HPA leva a uma supressão na secreção de hormônios gonadotrópicos e aumento da produção do hormônio luteinizante (LH), o que acarreta em bloqueio do processo ovulatório (RIVIER, 1995). Igualmente, a permanência de níveis altos de cortisol também interfere na secreção do LH e, conseqüentemente, na ovulação (MOBERG, 1987a). Em peixes teleósteos como em Truta Arco-Íris, Truta Marrom (CARRAGHER *et al.*, 1989) e Tilápia Moçambique (FOO E LAM, 1993), o aumento do cortisol em machos levou a inibição dos efeitos de hormônios sexuais.

Os efeitos negativos do estresse sobre o crescimento são também muito significativos. A alta demanda metabólica requerida pelas respostas de estresse, na fase de desenvolvimento desses animais, interfere sobremaneira em suas taxas de crescimento em diversos vertebrados, como primatas (MOBERG, 2000) e peixes (VOLPATO E FERNANDES, 1994).

6. EVOLUÇÃO DOS COMPORTAMENTOS DE ALÍVIO DO ESTRESSE

O alívio do estresse envolve redução da atividade do eixo HPA/HPI com conseqüente diminuição dos níveis de glucocorticóides. (SAPOLSKY, 2004 E DEVRIES *et al.*, 2003). Assim, comportamentos que promovem alívio de estresse devem ter evoluído nos animais, pois é adaptativo evitar o progresso do estresse para níveis de respostas que são deletérias.

A evolução de comportamentos em animais humanos e não humanos que resultam em alívio do estresse são diversos e espécie-específico. A vida em sociedade (SAPOLSKY, 2004 E DEVRIES *et al.*, 2003), o contato físico fora de um contexto agressivo (DUNBAR, 2010; LONSTEIN, 2005; SOARES *et al.*, 2011; COPPOLA *et al.*, 2005;), o grooming (catação) (SHUTT *et al.*, 2007), movimentos repetidos (esteriotipados)(GALHARDO E OLIVEIRA, 2009), prática de exercícios e técnicas de relaxamento (TSATSOULIS E FOUNTOULAKIS,

2006 E LI *et al.*, 2012) parecem servir para a redução dos efeitos danosos causados pelas respostas mais duradouras de estresse.

7. COMPORTAMENTOS PARA ALÍVIO DO ESTRESSE

7.1.COMPORTAMENTOS EM ANIMAIS NÃO HUMANOS

Em alguns vertebrados a vida em sociedade parece estar envolvida em estratégias para diminuição do estresse. SAPOLSKY (2004) e DEVRIES *et al.*, (2003) mostraram que animais inseridos em sociedades tiveram suas respostas de estresse reduzidas e um aumento significativo do bem-estar. Normalmente isso ocorre em animais gregários, como os que formam cardumes, e pode estar relacionado com benefícios, tais como, maior proteção contra predadores e melhor eficiência no encontro de presas e parceiros (PITCHER *et al.*, 1982; MAGURRAN, 1990; SWANEY *et al.*, 2001; QUEIROZ E MAGURRAN, 2005).

Assim como a vida em sociedade, o contato físico, dentro de um contexto afetivo, também se mostra como um aliado no alívio do estresse. Em ratas, por exemplo, foi observado que o ato de sucção do leite pelo filhote produziu redução dos efeitos do estresse (LONSTEIN, 2005). Igualmente, a estimulação tátil realizada por peixes limpadores em peixes de recifes de corais mostrou-se eficaz na redução do estresse (SOARES *et al.*, 2011). Da mesma forma, em cães de abrigo os níveis de cortisol reduziram após contato físico desses animais com humanos (COPPOLA *et al.*, 2006). Em primatas o ‘grooming’(catação) parece ter efeitos similares na diminuição dos comportamentos relacionados ao estresse, incluindo redução de batimentos cardíacos e respostas neuroendócrinas (DUNBAR, 2010 E SHUTT *et al.*, 2007). Comportamentos agressivos e esteriotipados (agressão deslocada) envolvendo interações com substrato em algumas espécies de ciclídeos foram sugeridos como estratégias alternativas de enfrentamento de situações estressoras, já que a realização desses comportamentos reduziu as respostas de estresse (MUNRO E PITCHER, 1985; GALHARDO *et al.*, 2008; MASON E LATHAM, 2004).

Os comportamentos de brincar vêm sendo observados em diversos animais vertebrados, como em ratos, hamster, primatas e cavalos expostos a estressores (DIENER 1985; PETIT E THIERRY 1994; HALL E BRADSHAW 1998; GUERRA *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 2002; LEMASSON *et al.*, 2005). Esses animais apresentaram comportamento lúdico após serem submetidos a períodos de privação de alimento, isolamento social e estresse social. Alguns autores sugerem que a atividade muscular envolvida no comportamento lúdico alivia os efeitos do estresse (SPINKA *et al.*, 2001 E BURGHARDT, 2005). De fato, o ato de brincar aumentou em cavalos adultos de escola de equitação que apresentavam indícios de estresse crônico (HAUSBERGER *et al.*, 2012). Os autores sugerem que os cavalos que brincam façam isso como forma de alívio do estresse. Além disso, a natação diminuiu significativamente os níveis de corticosterona no plasma sanguíneo de ratos submetidos à natação livre e moderada (LIU, 2013).

7.2.COMPORTAMENTOS EM ANIMAIS HUMANOS

Várias são as maneiras que as pessoas encontram para aliviar o estresse e muitas têm se mostrado eficazes na tarefa. Uma das alternativas para alívio do estresse é a prática de exercícios físicos. Claras evidências sugerem que a prática regular de exercícios físicos pode amenizar as respostas de estresse (TSATSOULIS E FOUNTOULAKIS, 2006).

Algumas outras opções para diminuição do estresse têm também apresentado resultados promissores. A yoga, técnica milenar de meditação para relaxamento, tem sido largamente utilizada na medicina como alternativa no tratamento de vítimas dos efeitos do estresse e, de fato, ocorreram melhoras significativas nos níveis de estresse proporcionadas pela prática dessa técnica (BANERJEE *et al.*, 2007; MICHALSEN *et al.*, 2005; CARLSON *et al.*, 2004; SATYAPRIYA *et al.*, 2009 *apud* LI e GOLDSMITH, 2012).

Além dos exercícios, efeitos psicológicos e fisiológicos da música têm sido efetivos em humanos como benéficos para redução do estresse (ALWORTH E BUERKLE, 2013).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As respostas de estresse são de suma importância para os seres vivos, visto que elas são imprescindíveis para aumentar a probabilidade de sobrevivência quando o organismo está com a homeostasia potencialmente perturbada. Por outro lado, é fundamental que os efeitos nocivos sobre a saúde e bem-estar provocados pelo estresse não sejam negligenciados. Diante disso é considerável que medidas de prevenção contra os efeitos danosos do estresse sejam tomadas, especialmente no que tange a animais domésticos e de cativeiro submetidos aos cuidados dos seres humanos, os quais também sofrem as consequências do estresse. É essencial assegurar bem-estar a esses animais através de estudos clínicos e laboratoriais dos impactos biológicos e psicológicos que a manipulação humana e influências ambientais possam causar. Visto que no repertório comportamental dos animais há comportamentos que levam ao alívio de estresse, contextos específicos devem ser pensados para propiciar a execução dos mesmos, permitindo com que o estresse seja aliviado quando for pertinente aos animais em situações de criação e cativeiro, melhorando suas condições de bem-estar.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alworth LC, Buerkle SC: **The effects of music on animal physiology, behavior and welfare.** College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA. *Lab Anim* (NY) 2013, **42**:54-61.
- Banerjee B, Vadiraj HS, Ram A, et al. **Effects of an integrated yoga program in modulating psychological stress and radiation-induced genotoxic stress in breast cancer patients undergoing radiotherapy.** *Integr. Cancer Ther* 2007, **6**: 242-250.
- Barton BA: **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.** *Integ Comp Biol* 2002, **42**: 517-525.
- Bonga SEW: **The Stress Response in Fish.** *Physiological Reviews* vol.14, n° 3, 1997.
- Brandão ML, Vianna D, Masson S, Santos J: **Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade.** *Rev Bras Psiquiatr* 2003, **25**(Supl II):36-41.
- Broom DM: **Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts.** *Annu Rev Biomed Sci* 2008, **10**:79-90.
- Burghardt GM: *The Genesis of Animal Play: Testing the Limits.* Cambridge, Massachusetts: MIT Press: 2005.
- Carlson LE, Specia M, Patel KD, Goodey E: **Mindfulness-based stress reduction in relation to quality of life, mood, symptoms of stress and levels of cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and melatonin in breast and prostate cancer outpatients.** *Psychoneuroendocrinology* 2004, **29**: 448-474.
- Carragher JF, Sumpter JP, Pottinger TG, Pickering, AD: **The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri*** Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol* 1989, **76**: 310-321.
- Christensen JW, Ladewig J, et al.: **Effects of individual versus group stabling on social behaviour in domestic stallions.** *Applied Animal Behaviour Science* 2002, **75**(3): 233-248.
- Coppola CL, Grandin T, Enns RM: **Human interaction and cortisol: Can human contact reduce stress for shelter dogs?** *Physiology & Behavior* 2006, **87**: 537-541.
- DeVries AC, Glasper ER, Detillion CE: **Social modulation of stress responses.** *Physiol Behav* 2003, **79**:399-40.
- Diener A: **Behavior analysis of polecats ferrets during social play.** *Zeitschrift für Tierpsychology* 1985, **67**(114): 179-197.
- Dunbar RIM: **The social role of touch in humans and primates: behavioural function and neurobiological mechanisms.** *Neurosci. Biobehav.* 2010, **Rev.34**: 260-268 .
- Lonstein JS: **Reduced anxiety in postpartum rats require recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones.** *Horm, behave* 2005, **47**: 241-255.

Liu W. et al: **Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: Relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation.** *Behavioural Brain Research* 2013, **242**: 110–116

Li AW, Goldsmith CA: **The effects of yoga on anxiety and stress.** *Altern Med Rev.* 2012, **17**(1): 21-35.

Foo JTW, LAM TJ: **Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*.** *Aquaculture*, 1993, **115**: 145-158.

Fulford AJ, Harbuz MS: **An introduction to the HPA axis.** In: Steckler T , Kalin NH, Reul JMHM (editors). *Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress.* Amsterdam: Elsevier, 2005.

Galhardo L, Oliveira RF: **Psychological stress and welfare in fish.** *Annual Review of Biomedical Sciences* 2009, **11**: 1-20.

Graeff FG. Ansiedade. In: Graeff FG, Brandão ML, editores: *Neurobiologia das Doenças Mentais.* 4 ed. São Paulo:Lemos; 1997: 109-144.

Galhardo L, Correia J, Oliveira RF: **The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*).** *Anim. Welfare* 2008, **17**:239-254.

Guerra RF, Takase E, et al: **Play fighting of juvenile golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): effects of two types of social deprivation and days of testing.** *Behavioural Processes* 1999, **47**(3): 139-151.

Hall SJG, Bradshaw RH: **Welfare aspects of the transport by road of sheep and pigs.** *Journal of Applied Animal Welfare Science* 1998, **1**: 235-254.

Hausberger et al. **On the significance of adult play: what does social play tell us about adult horse welfare?** *Naturwissenschaften* 2012, **99**:291-302.

Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB. (ed.): *Fish stress and health in aquaculture.* Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. 62. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K., 1997.

Iwana GK, Thomas PT, Forsyth RB, Vijayan MM: **Heat shock protein expression in fish.** *Rev. Fish Biol. Fish* 1998, **8**:35-56.

Lemasson A, Gautier JP, et al: **A brief note on the effects of the removal of individuals on social behaviour in a captive group of Campbell's monkeys (*Cercopithecus campbelli campbelli*): a case study.** *Applied Animal Behaviour Science* 2005, **91**: 289-296.

Magurran AE: **The adaptive significance of schooling as an antipredator defense in fish.** *Ann Zool Fenn.* 1990, **27**: 51-66

Margis R, Picon P, Cosner AF, Silveira RO: **Relação entre estressores, estresse e ansiedade.** Ver. *Psiquiatr. Rio Gd. Sul* : v. 25 supl. 1. Porto Alegre, 2003.

Mason GJ, Latham NR: **Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator?** *Anim. Welfare* 2004, **13**: 57-69.

Michalsen A, Grosman P, Acil A, et al: **Rapid stress reduction and anxiety among distressed women as a consequence of a three-month intensive yoga program.** *Med Sci Monit* 2005, **11** (CR): 555-561.

Moberg GP: **Biological response to stress: key to assessment of animal well-being?** In: Moberg GP (editor). *Animal Stress*, Bethesda American Physiological Society, 1985.

Moberg GP: **Influence of the adrenal axis upon the gonads,** In: Clarke, J. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press, New York 1987a: 456-496.

Moberg GP, Mench JA: **The Biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.** [S.1.]: *CAB International* 2000, **16**: 337-354.

Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW: **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Rev Fish Biol Fisheries* 1999, **9**:211-268.

Munro AD, Pitcher TJ: **Steroid hormones and agonistic behavior in a cichlid teleost, *Aequidens pulcher*.** *Horm Behav* 1985, **19**:353-371.

Nesse R, Young EA: **Evolutionary Origins and Functions of the Stress Response.** University of Michigan, Department of Psychiatry. *Encyclopedia of Stress* 2000, **2**: 79-84.

Petit O, Thierry B: **Aggressive and peaceful interventions in conflicts in Tonkean macaques.** *Anim. Behav.* 1994, **48**: 1427-1436.

Pickering AD. (ed.): *Stress and fish*. Academic Press, New York, 1981.

Pitcher TJ, Magurran AE, Winfield IJ: **Fish in Larger Shoals Find Food Faster.** *Behav Ecol Sociobiol.* 1982, **10**:149-151

Queiroz H, Magurran AE: **Safety in numbers? Shoaling behaviour of the Amazonian red-bellied piranha.** *Biology Letters* 2005, **1**: 155-157.

Rivier C: **Luteinizing-hormone-releasing hormone, gonadotropins, and gonadal steroids in stress.** *Annals of the New York of Sciences* 1995, **771**: 187-191.

Sapolsky RM: **Why Zebras Don't Get Ulcers.** New York: *Henry Holt and Company*, 2004.

Satyapriya M, Nagendra HR, Nagarathna R, Padmalatha V: **Effect of integrated yoga on stress and heart rate variability in pregnant women.** *Int. J. Gynaecol Obstet* 2009, **104**: 218-222.

Selye H: **A Syndrome produced by diverse noxious agents.** *Nature Lond.* 1936, **138**: 32-33.

Shutt K, Maclarnon A, Heistermann M, Semple S: **Grooming in Barbary macaques: better to give than to receive.** *Biol. Lett.* 2007. **3**: 231-233.

Siviy SM: **Neurobiological substrates of play behavior: Glimpses into the structure and function of mammalian playfulness.** In M. Bekoff and J. Byers (Eds.), *Animal Play: Evolutionary, Comparative, and Ecological Perspectives*. New York: Cambridge University Press, 1998.

- Soares MC, Oliveira RF, Ros AFH, Grutter AS, Bshary R: **Tactile stimulation lowers stress in fish.** *Nat. communications* 2011, **2**(534): 01-05.
- Spinka M, Newberry RC, Bekoff M: **Mammalian play: training for the unexpected.** *Quarterly Review of Biology* 2001, **76**: 141-168.
- Spraker T: **Stress and capture myopathy in artiodactylids.** In: FOWLER, M.E. *Zoo & wild animal medicine*. 3^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993, **617**:481-487.
- Stolte EH, de Mazon AF, Leon-Koosterziel KM, Jesiak M, Bury NR, Sturm A, Savelkoul HFJ, van Kemenade BML V, Flik G: **Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*.** *J Endocrinol* 2008, **198**:403-417.
- Swaney W, Kendal J, Capon H, Brown C, Laland KN: **Familiarity facilitates social learning of foraging behaviour in the guppy.** *Anim Behav* 2001, **62**:591-598.
- Tsatsoulis A, Fountoulakis S: **The Protective Role of Exercise on Stress System Dysregulation and Comorbidities.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006, **1083**: 196–213.
- Volpato GL, Fernandes MO: **Social control growth in fish.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto 1994, **27**: 797-810.
- Volpato GL: **Considerações metodológicas sobre os testes de preferência na avaliação do bem-estar em peixes.** *Revista Brasileira de Zootecnia* 2007, **36**: 53-61.
- Volpato GL, Giaquinto PC, Fernandes-de-Castilho M, Barreto RE, Gonçalves de Freitas, E: **Animal welfare: from concepts to reality.** *Oecologia Brasiliensis*, 2009, **13**: 05-15.

**CAPÍTULO 02: COMPORTAMENTO DE ESCAVAR E ESTRESSE NA
TILÁPIA-DO-NILO.**

Comportamento de escavar e estresse na Tilápia-do-nilo.

* Escrito conforme normas da Revista *Frontiers in Zoology*.

1. RESUMO

Introdução: Várias práticas comuns em aquicultura são estressores em potencial, pois induzem uma resposta de estresse em peixes. Esta pode se estender por segundos, a horas ou dias. Atualmente é crescente a preocupação com o bem-estar animal na prática zootécnica, mas pouco se sabe sobre os comportamentos que levam ao alívio de estresse. Algumas espécies de peixes têm como comportamento escavar o substrato, algo muitas vezes associado à construção de ninhos. Em geral, os machos sexualmente maduros de tilápia-do-Nilo escavam o substrato para construir ninhos. Contudo, foi observado recentemente este mesmo comportamento em fêmeas e machos juvenis, portanto, algo suposto no estudo como um fenômeno desvinculado do contexto reprodutivo. **Objetivos:** avaliar potenciais associações entre comportamento de escavar e resposta de estresse em juvenis de tilápia-do-Nilo. **Materiais e métodos:** Avaliou-se o efeito da hipóxia, um potente estressor, em ambas as variáveis respostas: níveis plasmáticos de cortisol e comportamento de escavar. Para isso, os peixes, de 5 a 7 centímetros e de 7 a 9 gramas, foram aclimatados por 5 dias em aquários individuais e em seguida divididos em 4 grupos de 7 animais, nas seguintes condições experimentais: 1) hipóxia por 3 min e aquário sem substrato, 2) hipóxia por 3 min e aquário com substrato, 3) sem hipóxia e presença de substrato e 4) sem hipóxia e sem substrato. Os animais dos grupos hipóxia foram retirados dos aquários e mantidos fora d'água por 3 minutos. Após isso, foi quantificado o comportamento de escavar nas 48 horas subsequentes e, ao término desse período, avaliou-se o cortisol plasmático. **Resultados:** os níveis de cortisol aumentaram com a hipóxia, porém não diminuíram significativamente com a escavação ($p>0,05$). Bem como, não houve diferença significativa na frequência de escavação entre os grupos 2 e 3. **Conclusão:** a escavação não age como alívio de estresse em tilápia-do-Nilo, pelo menos não no estresse agudo induzido por hipóxia.

Palavras-chaves: estresse; escavação; tilápia-do-Nilo.

2. ABSTRACT

Introduction: Several common practices in aquaculture are potential stressors, as they induce a stress response in fish. This may extend over seconds to hours or days. Currently there is a growing concern for animal welfare in animal production practice, but little is known about the behaviors that lead to stress relief. Some species of fish have to excavate the substrate behavior, something often associated with building nests. In general, sexually mature males of the Nile tilapia dig the substrate to build nests. However, it was recently observed this same behavior in females and juvenile males, so something supposed to in the study as a phenomenon unrelated to the reproductive context. **Objectives:** To assess potential associations between behavior excavate and stress response in tilapia juveniles the Nile. **Materials and methods:** We evaluated the effect of hypoxia, a potent stressor in both response variables: plasma cortisol levels and behavior of digging. To this end, the fish from 5 to 7 centimeters and 7 to 9 grams, were acclimated for 5 days in individual tanks and then divided into 4 groups of 7 animals at the following experimental conditions: 1) hypoxia for 3 min and aquarium without substrate, 2) hypoxia for 3 min and aquarium substrate, 3) without the presence of hypoxia and substrate, and 4) without hypoxia and without substrate. The animal groups were removed from hypoxia aquaria and kept out of water for 3 minutes. After that, the behavior was quantified digging within 48 hours after and at the end of this period, we evaluated plasma cortisol. **Results:** Cortisol levels increased with hypoxia, but not significantly decreased with the excavation ($p > .05$). As well, there was no significant difference in the frequency of excavation between groups 2 and 3. **Conclusion:** the excavation does not act as stress relief in the Nile tilapia, at least not in acute stress induced by hypoxia.

Keywords: stress, digging, Nile tilapia.

3. INTRODUÇÃO

Atualmente diversas práticas em aquicultura têm se mostrado estressoras em potenciais que induzem uma resposta de estresse em peixes que pode durar de segundos a horas e dias. Tais respostas de estresse incluem alterações comportamentais, hormonais, no metabolismo energético e no balanço hidro-eletrolítico (BARTON E IWAMA, 1991; WENDELAAR-BONGA, 1997; MOMMSEN *et al.*, 1999; BARTON, 2002; GALHARDO E OLIVEIRA, 2009). Primariamente, observamos ativação do sistema nervoso simpático, culminando, como por exemplo, no aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (MAZEAUD *et al.*, 1977; SUMPTER, 1997; REID *et al.*, 1998) e na taxa de ventilação branquial (SAGER *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2003; BARRETO E VOLPATO, 2004 e 2006a; BARRETO *et al.*, 2010). Concomitantemente, ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, culminando com aumento nos níveis de cortisol plasmático (POTTINGER *et al.*, 2000; VOLPATO E BARRETO, 2001; CARNEIRO E URBINATI, 2002; ROCHA *et al.*, 2004; URBINATI *et al.*, 2004; BARRETO E VOLPATO, 2006b; FAGUNDES & URBINATI, 2008; BARRETO *et al.*, 2009; BOLASINA, 2011). Secundariamente, muitas vezes como efeito dessas respostas primárias, observamos alterações no metabolismo intermediário, levando, por exemplo, ao aumento da glicose plasmática (FERNANDES E VOLPATO, 1993; VIJAYAN *et al.*, 1997; POTTINGER E CARRICK, 1999; BARRETO E VOLPATO, 2006b). Em situações onde os efeitos do estressor se tornam persistentes (estresse crônico), respostas terciárias e potencialmente deletérias podem surgir, como, diminuição do crescimento e da resistência a doenças (PICKERING E POTTINGER, 1989; RAND-WEAVER *et al.*, 1993; VOLPATO E FERNANDES, 1994; POTTINGER, 2006). Portanto, é de suma importância para o manejo em piscicultura minimizar o estresse, para se evitar tais efeitos deletérios e, conseqüentemente, aumentando o bom bem-estar.

Algumas possibilidades têm sido propostas para minimizar o estresse em peixes frente a estressores inerentes à prática da aquicultura como descrito a seguir. O transporte de peixes é uma prática necessária, porém estressante (CARNEIRO E URBINATI, 2002; URBINATI *et al.*,

2004) com efeitos deletérios como a mortalidade (GOMES *et al.*, 2003a). Contudo, adicionando-se cloreto de sódio (CARNEIRO E URBINATI, 2001; GOMES *et al.*, 2003b) ou sulfato de cálcio (BENDHACK E URBINATI, 2009) pode reduzir os efeitos desse estressor. O condicionamento clássico (pavloviano) foi proposto como uma possibilidade de minimizar os efeitos prejudiciais do estresse (SCHRECK *et al.*, 1995), uma vez que é possível induzir uma resposta de estresse antecipatória (MOREIRA E VOLPATO, 2004; MOREIRA *et al.*, 2004; BARRETO E VOLPATO, 2007) o peixe se preparar antecipadamente à situação estressante, exibindo resposta de menor intensidade e, portanto, menos potencialmente deletéria. Contudo, estudos dessa natureza ainda são poucos e novas possibilidades devem ser avaliadas para se propor novas soluções para minimizar o estresse na prática da aquicultura, melhorando tanto o bem-estar dos peixes, quanto a produtividade econômica.

Várias espécies de peixes escavam o substrato para a construção de ninho e reprodução (JAMES E BRUTON, 1992; MCKAYE *et al.*, 1993; STAUFFER *et al.*, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2010), algo comum em espécies de ciclídeos (FRYER E ILES, 1972). A espécie ciclídeo de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) não é exceção e costuma escavar o substrato produzindo ninhos semicônicos (LOWE-MCCONNELL, 1958 E VOLPATO *et al.*, 2004). Essa atividade é principalmente observada em machos reprodutivos de tilápia (GONÇALVES-DE-FREITAS E NISHIDA, 1998; VOLPATO *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2010), que costumam retirar o substrato com a boca em referência a um baricentro, depositando-os ao redor do local escavado. Contudo, surpreendentemente, essa atividade tida tipicamente ser realizada por machos reprodutivos, já foi observado em fêmeas de tilápias (CASTRO *et al.*, 2009). Esses mesmos autores também documentam que conforme aumenta o índice gonadosomático, aumenta a probabilidade dos machos produzirem ninhos, mas machos potencialmente imaturos também mostraram esses comportamento. De fato, a área escavada pode ser usada para ninho, mas isso não quer dizer que toda escavação é necessariamente um ninho, especialmente porque fêmeas isoladas e machos potencialmente imaturos escavam (CASTRO *et al.*, 2009). Assim, é possível supor outras funções para este comportamento.

Conforme BURGHARDT 2005, o comportamento lúdico está presente em todos os vertebrados, incluindo os peixes, e em alguns invertebrados. Esse mesmo autor discute que uma típica característica do comportamento lúdico é imitar ações futuras, mas fora do contexto real (p.ex. construir ninhos fora de um contexto reprodutivo), servindo como treino. Além disso, uma possibilidade é a utilização de objetos para tal propósito (como substrato, por exemplo).

A maioria dos autores mostra que o comportamento lúdico é mais comum em animais juvenis que estão saudáveis, bem alimentados e não estão em uma situação estressante ou mesmo estressados (“teoria do comportamento de luxo” - FRASER E BROOM 1990; DONALDSON *et al.* 2002; HENRY *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Por outro lado, períodos de privação de alimento, isolamento social, estresse social pode favorecer a exibição do comportamento lúdico em ratos, hamsters, primatas e cavalos (DIENER 1985; PETIT E THIERRY 1994; HALL E BRADSHAW 1998; GUERRA *et al.*, 1999; CHRISTENSEN *et al.*, 2002; LEMASSON *et al.*, 2005). Alguns neurotransmissores (serotonina) associados ao comportamento lúdico em mamífero também estão envolvidos na resposta de estresse (SIVIY, 1998) e a serotonina também é um importante regulador da atividade do eixo neuroendócrino de estresse em peixe (WINBERG *et al.*, 1997). Como dito, embora o comportamento lúdico esteja provavelmente associado a uma situação de baixo nível de estresse e bom bem-estar (revisado por OLIVEIRA *et al.*, 2010), alguns autores sugerem a teoria da recuperação (SPINKA *et al.*, 2001 E BURGHARDT, 2005), que versa, por exemplo, que a atividade muscular durante as atividades lúdicas alivia efeitos do estresse. Considerando o exposto anteriormente levantamos 3 hipóteses centrais norteadoras do presente estudo. Primeiramente, associada à “teoria do comportamento de luxo”, sugerimos que animais não estressados realizam o treino locomotor de escavação. Quanto essa hipótese, não a consideramos a mais provável, pois não explica convincentemente qual seria a função do treino para as fêmeas, embora, possível, pois fêmeas de tilápia, após serem conduzidas ao ninho pelo macho, contribui para a ampliação deste (GONÇALVES-DE-FREITAS E NISHIDA, 1998). Nesse contexto, predizemos que os animais com os menores níveis de cortisol plasmáticos possuem maior probabilidade de escavar o substrato. Já associado

à “teoria da recuperação” sugerimos a hipótese de que o comportamento de escavar fora de um contexto reprodutivo seria uma forma de alívio de estresse na tilápia. Consideramos essa hipótese a mais provável, pois animais sexualmente imaturos usariam essa atividade locomotora e manejo de objeto para tal propósito, sem necessariamente isso estar associado ao treino de um comportamento futuro. Nesse caso, predizemos que animais estressados escavam em maior frequência, bem como isso pode resultar em diminuição dos níveis de cortisol plasmático. Alternativamente, altos níveis de estresse e/ou comprometimento do bem-estar (bem-estar pobre) podem levar a comportamentos deslocados e estereotipados (p.ex. VESTERGAARD *et al.*, 1997). Assim, o comportamento de escavar em animais sexualmente imaturos poderia ser um comportamento deslocado. Predizemos nesse caso que os animais estressados escavam o substrato com mais frequência. Assim, avaliamos em juvenis da tilápia-do-Nilo se a exposição a um estressor estimula o comportamento de escavar. Além disso, avaliamos os níveis plasmáticos de cortisol após a submissão ao estressor em animais que permitimos o acesso ou não a substrato.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e condições de estoque

Os peixes utilizados foram tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) de aproximadamente 5 a 7 centímetros e de 7 a 9 gramas, não revertidos sexualmente, adquiridos em pisciculturas. A população de peixes foi mantida em aclimação por 15 dias antes do início dos procedimentos experimentais. Durante esse período, a temperatura média da água foi controlada a 26 °C e saturada com oxigênio a partir de um sistema constante de aeração em todos os aquários de estoque. Os níveis de amônia (<0.5 ppm) e nitrito (<0.05 ppm) foram mantidos em baixas quantidades a partir de filtragem biológica e constantes trocas parciais de água. O fotoperíodo foi de 12 horas claro/12 horas escuro. Ração comercial para peixes (22% proteína) foi utilizada na alimentação dos peixes, oferecida uma vez por dia em excesso.

4.2.Delineamento Experimental

O experimento teve como estratégia avaliar o efeito da hipóxia nos níveis plasmáticos de cortisol e no comportamento de escavação do substrato na tilápia-do-Nilo. Para tal, exemplares de tilápia, aleatoriamente escolhidos, foram alojados, individualmente, nos aquários experimentais (40 x 20 x 25 cm) por 5 dias para aclimação. Após esse período, os peixes foram submetidos à hipóxia e após o término da exposição a este estressor os níveis plasmáticos de cortisol foram avaliados. Vinte e oito animais foram divididos em 4 condições experimentais (7 peixes para cada condição): 1) hipóxia por 3 min e aquário sem substrato, 2) hipóxia por 3 min e aquário com substrato, 3) sem hipóxia e presença de substrato e 4) sem hipóxia e ausência de substrato. A hipóxia foi induzida retirando os animais de seus respectivos aquários, mantendo-os fora d'água por 3 minutos e devolvendo nos aquários em seguida. Os mesmos procedimentos foram feitos para animais controles, exceto mantê-los fora d'água. Após isso, foi quantificado o comportamento de escavar nas 48 horas subsequentes. Devido aos potenciais efeitos estressantes da coleta de sangue, animais diferentes foram submetidos à hipóxia, seguindo os mesmos procedimentos, para evidenciar o distúrbio nos níveis de cortisol gerado por esse estressor. O sexo dos peixes foi considerado como variável independente. O comportamento de escavação foi avaliado conforme descrito em VOLPATO *et al.*, (2004).

4.3. A coleta de sangue e análise do cortisol

Foram coletadas amostras de sangue pré e pós-estressor. Cada animal foi pescado e mergulhado em solução anestésica de benzocaína e logo em seguida, tiveram o sangue recolhido através de punção cardíaca por meio de seringas com heparina (Liquemine®, Roche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A amostragem sanguínea não durou mais de 1 min por peixe. O sangue foi centrifugado (3000 rpm durante 10 min) e o plasma (cerca de 100 mL) recolhido e transferido para tubos de 1 ml nivelados e armazenados numa temperatura de -22°C até ser necessário para ensaio. Níveis de cortisol plasmático foram determinados pela técnica ELISA.

4.4. Condições dos Aquários

Os aquários experimentais foram preparados com aeração contínua e equipados com um filtro biológico (sistema de recirculação de água). O fotoperíodo e iluminação foram de 12 horas claro/12 horas escuro.

4.5. Análises dos dados

Os dados foram em princípio analisados quanto à sua normalidade e homocedasticidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene ou F-max, respectivamente. Os peixes submetidos à hipóxia foram comparados com seu respectivo controle utilizando-se o teste t de Student não pareado de 2 caldas para a frequência de escavações e o volume escavado de substrato. Os níveis de cortisol plasmáticos foram comparados por análise de variância de 2 fatores, tendo como fatores independentes o estressor e a presença de cascalho e como variável resposta o cortisol plasmático. Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

O volume escavado ($t_{12} = 0,17$; $P = 0,86$; **Figura 3A**) e número de escavações ($t_{12} = 0,24$; $P = 0,82$; **Figura 3B**) entre os animais submetidos ao estressor de hipóxia e os controles, não apresentaram diferença estatística significativa. Os níveis de cortisol (**Figura 3C**) não foram independentemente afetados pela presença de substrato ($F_{(1;24)} = 0,09$; $P = 0,767$), mas aumentaram em função da hipóxia quando comparado ao controle ($F_{(1;24)} = 5,49$; $P = 0,028$). A presença de substrato e a exposição à hipóxia não apresentaram interação ($F_{(1;24)} = 0,11$; $P = 0,741$).

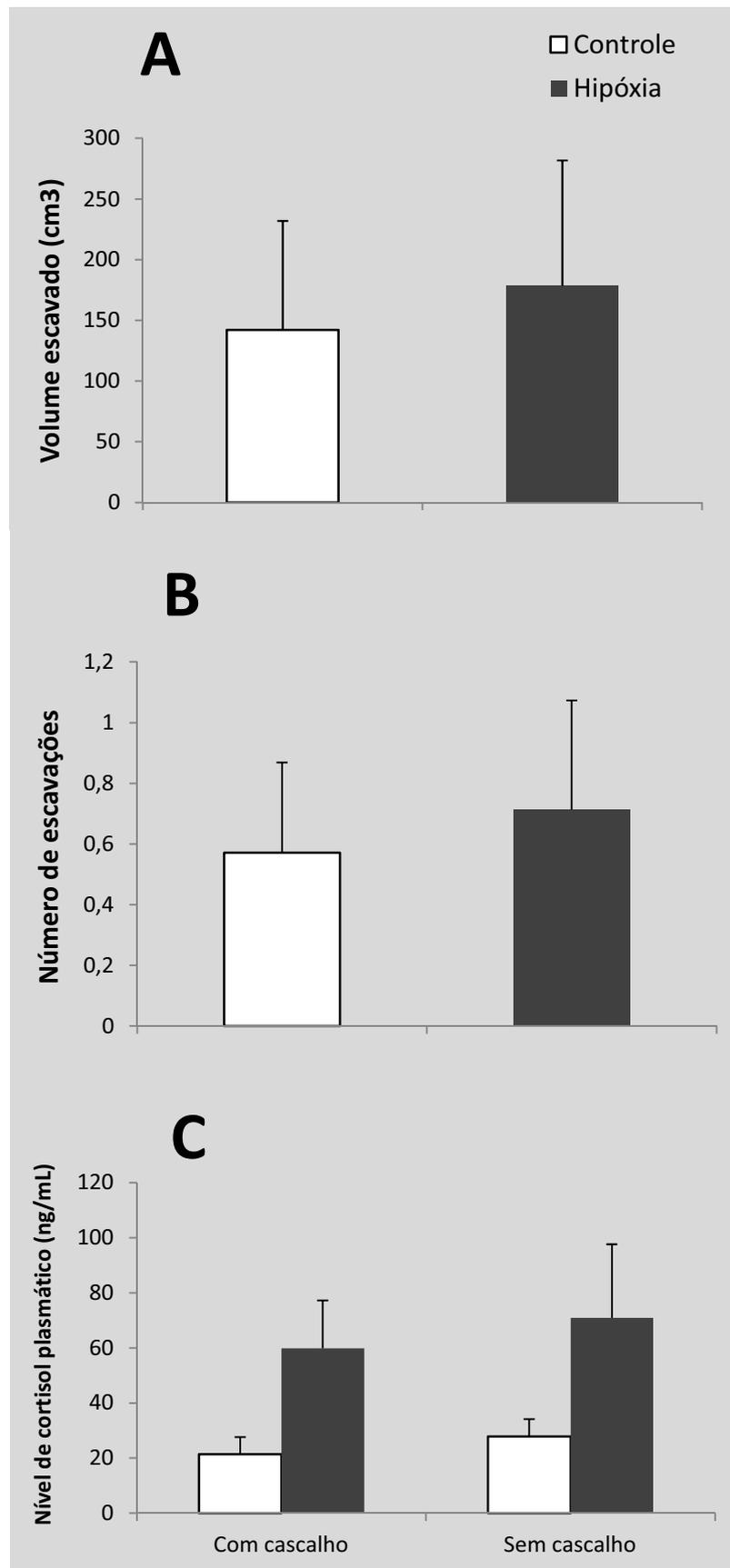


Figura 3. Volume escavado (A) e número de escavações (B) em peixes expostos ao estressor de hipóxia (3 min fora d'água) ou não (controle) em aquários suplementados com uma camada de cascalho de 3 cm. Não houve diferença significativa no número de escavações ($t_{12} = 0,24$; $P = 0,82$) e volume escavado ($t_{12} = 0,17$; $P = 0,86$) entre os animais estressados e controles. Níveis plasmáticos de cortisol (C) em animais expostos à hipóxia ou não (controle) em aquários com a camada de cascalho ou não. Os níveis de cortisol não foram independentemente afetados pela presença de substrato (ANOVA de 2 fatores; $F_{(1;24)} = 0,09$; $P = 0,767$), mas aumentaram em função da hipóxia quando comparado ao controle (ANOVA de 2 fatores; $F_{(1;24)} = 5,49$; $P = 0,028$).

6. DISCUSSÃO

Os animais submetidos à hipóxia tiveram os níveis de cortisol plasmático aumentados. Isso indica que a hipóxia foi efetiva em induzir estresse. Contudo, não observamos aumento do nível de escavação em função da exposição ao estresse em juvenis de tilápia-do-Nilo, nem os níveis de cortisol foram mais baixos quando os peixes foram expostos à hipóxia e foi permitido acesso ao substrato. Assim, concluímos que o comportamento de escavar não é executado após exposição a um estressor como uma forma de alívio de estresse induzido por hipóxia em juvenis de tilápia-do-Nilo.

Os níveis de cortisol nos controles variaram entre 16 ng/mL e 65 ng/mL. Esses valores estão dentro de intervalos mostrados em outros estudos, nos quais os níveis basais de cortisol tiveram entre 5 e 60 ng/mL (BARCELLOS *et al.*, 1999; CORREA *et al.*, 2003; BISWAS *et al.*, 2004). Esses dados indicam, nos controles, uma situação sem estresse. Sendo assim, os níveis de cortisol plasmático avaliados após o estímulo estressor no grupo hipóxia pode ser assumido como uma resposta de estresse. Isso confirma a hipóxia como um estressor para tilápia-do-Nilo, como mostrado para outras espécies de peixes (DEAN E RICHARDSON, 1999 E SMITH E ABLE, 2003). Diante disso, pode-se concluir que, mesmo estressados, os animais não escavaram com maior frequência e intensidade que os não estressados.

Considerando que os dados do presente estudo não evidenciaram o comportamento de escavar em animais sexualmente imaturos com a diminuição dos de estresse, não se alinhando, portanto com a "teoria da recuperação", onde animais estressados realizam atividades locomotoras, ditas lúdicas em alguns grupos, para aliviar estresse (SPINKA *et al.*, 2001 E BURGHARDT, 2005). A possibilidade de que o comportamento de escavar nesses animais esteja associado à “teoria do comportamento de luxo”, em que os animais não estressados realizam atividades locomotoras (lúdicas em alguns grupos) relacionadas a treino locomotor para situações futuras (FRASER E BROOM 1990; DONALDSON *et al.*, 2002; HENRY *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010) é um fator a ser considerado. Contudo, ainda faltariam explicações pelo fato dos estressados também terem escavado. Assim, concluímos que a escavação em imaturos

sexualmente não está relacionado com alívio de estresse e outras explicações são prementes para elucidar o porquê da execução desse comportamento em animais que não irão se reproduzir (que escavariam para fazer ninhos).

Sabendo-se que a hipóxia induzida no presente estudo induziu estresse de curta duração, a possibilidade de um estresse crônico ter maior efeito nas diferenças de escavações entre os grupos é um fato a ser considerado futuramente. No contexto de estresse crônico os efeitos do estressor se tornam persistentes fazendo com que respostas deletérias possam surgir (PICKERING E POTTINGER, 1989; RAND-WEAVER *et al.*, 1993; VOLPATO E FERNANDES, 1994; POTTINGER, 2006) e com isso a eventual ocorrência de comportamentos aliviadores de estresse podem ser mais relevantes, como os de escavar o substrato fora do contexto reprodutivo.

Além disso, é plausível considerar que talvez o comportamento de escavar seja estressor-específico, ou seja, desencadeado por outro tipo de estresse mais comum na vida do animal. Tais como, o estresse social, que pode ser provocado pela simples presença de um coespecífico. Esta hipótese é condizente com o fato da tilápia-do-Nilo ser uma espécie bastante territorialista e estabelecer hierarquia entre os grupos, evento bastante estressante para animais submissos e também dominantes (FERNANDES, 1997 E VOLPATO *et al.*, 1987). Diante disso, seria conveniente a investigação do comportamento de escavar na fase de formação da hierarquia nestes animais.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a escavação não age como alívio de estresse em tilápia-do-Nilo, pelo menos ao se considerar o estresse agudo induzido por hipóxia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, Souza SMG, Lulhier F: **Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress** *Aquac Res* 1999, **30**: 437-444.
- Barreto RE, Volpato GL: **Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish.** *Behavioural Processes*, Amsterdam 2004, **66**: 43-51.
- Barreto RE, Volpato GL: **Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors.** *Journal of Experimental Animal Science* 2006a, **43**: 189-196.
- Barreto RE, Volpato GL: **Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006b, **39**: 1605-1612.
- Barreto RE, Luchiarini AC, Marcondes AL: **Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia.** *Behavioural Processes* 2003, **60**: 235-239.
- Barreto RE, Volpato GL: **Evaluating feeding as unconditioned stimulus for conditioning of an endocrine effect in Nile tilapia.** *Physiology & Behavior* 2007, **92**: 867-872.
- Barreto RE, Volpato GL, Faturi CB, Giaquinto PC, Gonçalves-de-Freitas E, Fernandes-de-Castilho M: **Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 2009, **42**: 109-118.
- Barreto RE, Barbosa-Junior A, Giassi ACC, Hoffmann A: **The club cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia.** *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 2010, **43**:75-81.
- Barton BA, Iwama GK: **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids.** *Ann Rev Fish Dis* 1991,**1**: 3-26.
- Barton BA: **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.** *Integ Comp Biol* 2002, **42**: 517-525.
- Bendhack F, Urbinati EC: **Mitigating stress effects during transportation of matrinxã (*Brycon amazonicus*, Gunther, 1869; Characidae) through the application of calcium sulfate.** *Journal Of Applied Ichthyology* 2009, **25**: 201-205.
- Biswas AK, Maita M, Yoshizaki G, Takeuchi T: **Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes.** *J Fish Biol* 2004, **65**: 811-821.
- Bolasina SN: **Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors.** *Aquaculture* 2011, **313**: 140-143.
- Burghardt GM: *The Genesis of Animal Play: Testing the Limits*. Cambridge, Massachusetts: MIT Press: 2005.
- Carneiro PCF, Urbinati EC: **Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther), during transport.** *Aquaculture Research* 2001, **32**: 297-304.

Carneiro PCF, Urbinati EC: **Transport stress in matrinxa, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities.** *Aquaculture International* 2002, **10**: 221-229.

Castro ALS, Gonçalves-de-Freitas E, Volpato GL, Oliveira C: **Visual communication stimulates reproduction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.).** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2009, **42**:368-374.

Christensen JW, Ladewig J, et al: **Effects of individual versus group stabling on social behaviour in domestic stallions.** *Applied Animal Behaviour Science* 2002, **75**(3): 233-248.

Correa SA, Fernandes MO, Iseki KK, Negrao JA: **Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Braz J Med Biol Res* 2003, **36**: 1725-1731.

Dean TL, Richardson J: **Responses of seven species of native freshwater fish and a shrimp to low levels of dissolved oxygen.** *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 1999, **33**: 99-106.

Diener A: **Behavior analysis of polecats ferrets during social play.** *Zeitschrift für Tierpsychologie* 1985, **67**(114): 179-197.

Donaldson TM, Newberry RC, Spinka M, Cloutier S: **Effects of early play experience on play behaviour of piglets after weaning.** *Applied Animal Behaviour Science* 2002, **79**: 221-231.

Fagundes M, Urbinati EC: **Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures.** *Aquaculture* 2008, **276**: 112-119.

Fernandes MO, Volpato GL: **Heterogeneous growth in the Nile tilapia: Social stress and carbohydrate metabolism.** *Physiology & Behaviour* 1993, **54**: 319-23.

Fernandes MO: **Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes.** Botucatu: *Universidade Estadual Paulista, Tese (Doutorado)*, 1997. 82p.

Fraser AF, Broom DM: *Farm Animal Behaviour and Welfare*, 3rd edition. Bailliere Tindall, London, England;1990.

Fryer G, Iles TD: **Breeding habits, In The cichlid fishes of the great lakes of Africa** (Fryer, G. & Iles, T. D., eds.). *Neptune City: T.F.H. publications* 1972, 105-172.

Galhardo L, Oliveira RF: **Psychological stress and welfare in fish.** *Annual Review of Biomedical Sciences* 2009, **11**: 01-20.

Gomes LD, Araujo-Lima CARM, Roubach R, et al: **Assessment on the effect of salt and density on tambaqui fish transportation.** *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 2003a, **38**: 283-290.

Gomes LC, Araujo-Lima CARM, Roubach R, et al: **Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*.** *Journal of The World Aquaculture Society* 2003b, **34**: 76-84.

Gonçalves-de-Freitas E, Nishida SM: **Sneaking behavior of the Nile tilapia.** *Boletim Técnico do CEPTA* 1998, **11**: 71-79.

- Guerra RF, Takase E, et al: **Play fighting of juvenile golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): effects of two types of social deprivation and days of testing.** *Behavioural Processes* 1999, **47**(3): 139-151.
- Hall SJG, Bradshaw RH: **Welfare aspects of the transport by road of sheep and pigs.** *Journal of Applied Animal Welfare Science* 1998, **1**: 235-254.
- Henry S, Richard- Yris MA, et al: **Neonatal handling affects durably bonding and social development.** *PLoS ONE* 2009, **4**(4): e5216
- James NPN, Bruton MN: **Alternative life-history traits associated with reproduction in *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) in small water bodies of the eastern Cape, South Africa.** *Environmental Biology of Fishes* 1992, **34**: 379-392.
- Lemasson A, Gautier JP, et al: **A brief note on the effects of the removal of individuals on social behaviour in a captive group of Campbell's monkeys (*Cercopithecus campbelli campbelli*): a case study.** *Applied Animal Behaviour Science* 2005, **91**: 289-296.
- Lowe-McConnell, M: **Breeding behaviour patterns and ecological differences between tilapia species and their significance for evolution within the genus *Tilapia* (Pisces; Cichlidae).** *Proceedings of the Zoological Society of London* 1958, **132**: 1-31.
- Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM: **Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review.** *Transactions of the American Fisheries Society, Binghamton* 1977, **106**: 201-212.
- McKaye KR, Howard JH, Stauffer JR, Morgan RP, Shonhiwa F: **Sexual selection and genetic-relationships of a sibling species complex of bower building cichlids in lake Malawi, Africa.** *Japanese Journal of Ichthyology* 1993, **40**: 15-21
- Mendonça FZ, Volpato GL, Costa-Ferreira RS, Gonçalves-de-Freitas E: **Substratum choice for nesting in male Nile tilapia *Oreochromis niloticus*.** *Journal of Fish Biology* 2010, **77**: 1439-1445.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW: **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Rev Fish Biol Fisheries* 1999, **9**: 211-268.
- Moreira PSA, Pulman KGT, Pottinger TG: **Extinction of a conditioned response in rainbow trout selected for high or low responsiveness to stress.** *Hormones and Behavior* 2004, **46**: 450-457.
- Moreira PSA, Volpato GL: **Conditioning of stress in Nile tilapia.** *Journal of Fish Biology* 2004, **64**: 961-969.
- Oliveira AFS, Rossi AO, Silva LFR, Lau MC, Barreto RE: **Play behaviour in nonhuman animals and the animal welfare issue.** *Journal of Ethology* 2010, **28**: 01-05.
- Pickering AD, Pottinger TG: **Stress responses and disease resistance in salmonid fish - effects of chronic elevation of plasma-cortisol.** *Fish Physiology And Biochemistry* 1989, **7**: 253-258.
- Pottinger TG, Carrick TR: **A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout.** *Aquaculture* 1999, **175**: 351-363.

- Pottinger TG, Carrick TR, Appleby A, Yeomans WE: **High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: Is the Chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol resistant teleost?** *Gen. Comp. Endocrinol* 2000, **120**:108-117.
- Pottinger TG: **Context dependent differences in growth of two rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lines selected for divergent stress responsiveness.** *Aquaculture* 2006, **256**: 01-04.
- Randweaver M, Pottinger TG, Sumpter JP: **Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress.** *Journal of Endocrinology* 1993, **138**: 509-515.
- Reid SG, Bernier NJ, Perry SF: **The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release.** *Comparative Biochemistry And Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 1998, **120**: 01-27.
- Rocha RM, Carvalho EG, Urbinati EC: **Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxa *Brycon cephalus* (Gunther, 1869).** *Aquaculture Research* 2004, **35**: 245-249.
- Sager DR, Hocutt CH, Stauffer Jr JR: **Avoidance behavior of *Morone americana*, *Leiostomus xanthurus* and *Brevoortia tyrannus* to strobe light as a method of impingement.** *Environment Science & Policy* 2000, **3**: 393-403.
- Schreck CB, Jonsson L, Feist G, et al: **Conditioning improves performance of juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress.** *Aquaculture* 1995, **135**: 99-110.
- Schreck CB: *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press 1997, p. 95-117.
- Siviy SM: **Neurobiological substrates of play behavior: Glimpses into the structure and function of mammalian playfulness.** In M. Bekoff and J. Byers (Eds.), *Animal Play: Evolutionary, Comparative, and Ecological Perspectives*. New York: Cambridge University Press, 1998.
- Smith KJ & Able KW: **Dissolved oxygen dynamics in salt marsh pools and its potential impacts on fish assemblages.** *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2003, **258**: 223-232.
- Spinka M, Newberry RC, Bekoff M: **Mammalian play: training for the unexpected.** *Quarterly Review of Biology* 2001, **76**: 141-168.
- Stauffer JR, Kellogg KA, Mckaye KR: **Experimental evidence of female choice in lake Malawi cichlids.** *Copeia* 2005, 657-660.
- Sumpter JP: **The endocrinology of stress.** In: "*Fish Stress and Health in Aquaculture*". Ed by Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, 1997, 95-118.
- Urbinati EC, de Abreu JS, Carnargo ACDS, et al: **Loading and transport stress of juvenile matrinxa (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities.** *Aquaculture* 2004, **229**: 01-04.
- Vestergaard KS, Skadhauge E, Lawson LG: **The stress of not being able to perform dustbathing in laying hens.** *Physiology & Behavior* 1997, **62**: 413-419.

Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK: **Metabolic Responses Associated with Confinement Stress in Tilapia**: The Role of Cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1997, **116**: 89-95.

Volpato GL, Frioli PMA, Carrieri MP et al: **Comportamento de dominância e crescimento em peixes**. In: Costa, MJRP, Nascimento JR, A.F. (Eds.) *Anais de Etologia. Jaboticabal* 1987, **5**: 169-194.

Volpato GL, Duarte CRA, Luchiari AC: **Environmental color affects Nile tilapia reproduction**. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research* 2004, **37**: 479-483.

Volpato GL, Barreto RE: **Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001, **34**: 1041-1045.

Volpato GL, Fernandes MO: **Social control growth in fish**. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto 1994, **27**: 797-810.

Wendeelar Bonga SE: **The stress response in fish**. *Physiol Rev* 1997, **77**: 591-625.

Winberg S, Nilsson A, Hylland P, Soderstrom V, Nilsson GE: **Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity i_n teleost fish**. *Neurosci Lett*. 1997, **230**:113-116.