

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**EFEITO DO L-TRIPTOFANO NA MEDIAÇÃO  
DO ESTRESSE DE TRANSPORTE E SOCIAL  
DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)**

**Talísia Pereira Martins**

Jaboticabal, SP  
2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**EFEITO DO L-TRIPTOFANO NA MEDIAÇÃO  
DO ESTRESSE DE TRANSPORTE E SOCIAL  
DO MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)**

**Talísia Pereira Martins**

**Orientadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, SP  
2013

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
DEDICATÓRIA.....	01
AGRADECIMENTOS .....	02
APOIO FINANCEIRO .....	04
RESUMO .....	05
ABSTRACT .....	06
1. INTRODUÇÃO .....	07
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
2.1 Preparo da ração suplementada com triptofano .....	11
2.2 Indicadores fisiológicos de estresse.....	13
2.3 Análise do comportamento.....	14
2.4 Monitoramento da qualidade da água.....	15
2.5 Análise estatística .....	16
3. RESULTADOS.....	16
3.1 Efeito da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse durante o transporte de peixes.....	16
3.2 Efeitos da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse e comportamento durante a interação de peixes estocados em aquários .....	29
3.2.1 Variáveis de comportamento.....	29
3.2.2 Indicadores fisiológicos de estresse.....	31
4. DISCUSSÃO .....	40
4.1 Experimento 1 .....	41
4.2 Experimento 2 .....	42
5. CONCLUSÃO .....	44

6. REFERÊNCIAS.....	44
---------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cortisol sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	18
<b>Figura 2.</b> Glicose plasmática antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	19
<b>Figura 3.</b> Cloreto sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	20
<b>Figura 4.</b> Sódio sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	21
<b>Figura 5.</b> Potássio sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	22
<b>Figura 6.</b> Proteína total antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	23
<b>Figura 7.</b> Hematócrito antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	24
<b>Figura 8.</b> Número de eritrócito antes, durante e após o transporte de matrinxã ....	25
<b>Figura 9.</b> Hemoglobina antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	26
<b>Figura 10.</b> Volume corpuscular médio antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	27
<b>Figura 11.</b> Hemoglobina corpuscular média antes, durante e após o transporte de matrinxã .....	28
<b>Figura 12.</b> Cortisol sérico de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades .....	32
<b>Figura 13.</b> Glicose plasmática de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades .....	33
<b>Figura 14.</b> Cloreto sérico de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades .....	34
<b>Figura 15.</b> Proteína total sérica de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades .....	35
<b>Figura 16.</b> Hematócrito de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades .....	36
<b>Figura 17.</b> Número de eritrócitos de matrinxãs estocados com diferentes densidades .....	37

<b>Figura 18.</b> Hemoglobina de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades.....	38
<b>Figura 19.</b> Volume corpuscular médio de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades.....	39
<b>Figura 20.</b> Hemoglobina corpuscular média de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades. ....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Latência (segundos) para o primeiro ataque em juvenis de matrinxã alimentados com diferentes níveis de triptofano (L-TRP) durante interação social em diferentes densidades. Média±erro-padrão.....	29
<b>Tabela 2.</b> Número de mordidas, por peixe, em juvenis de matrinxã alimentados com diferentes níveis de triptofano (L-TRP) durante interação social em diferentes densidades. Média±erro-padrão .....	30
<b>Tabela 3.</b> Número de perseguição, por peixe, de juvenis de matrinxã alimentados com diferentes níveis de triptofano (L-TRP) durante interação social em diferentes densidades. Média±erro-padrão .....	31

*Aos meus pais Adnelson e Ana Lúcia e minha irmã Thauane,*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Obrigada Senhor por esta conquista.*

*Aos meus pais Adnelson e Ana Lúcia, meus irmãos Thauane e Michel, pelo apoio, confiança, carinho, amor e por suportarem a minha ausência. Aos meus avôs (in memorian) e avós, aos meus tios e primos. A minha querida sobrinha Sophia, que tornou o meu mundo muito mais colorido desde que nasceu.*

*À Profa Elisabeth Urbinati pelo carinho, suporte, dedicação e paciência. Sem sua ajuda, nada disso seria possível. Minha admiração e eterna gratidão.*

*Aos professores membros da banca de qualificação e defesa: Percilia Cardoso Giaquinto, Rodrigo Egydio Barreto, Fabiano Bendhack e Eliane Gonçalves de Freitas. Obrigada pelas contribuições à este trabalho.*

*Aos amigos do laboratório de biofísica: Rodrigo Gimbo, Fábio Zanuzzo, Rafael Sabioni, Gisele Favero, Rosangela Fernandes, Ana Paula Faria, Eduardo Pahor, Bruno Pereira, Marcos Saita, Natalia Franco e Soliris Castillo. Com vocês, todo o trabalho se torna mais prazeroso e divertido. Serei sempre grata pela ajuda de vocês.*

*À Damares Percim, pela ajuda nas coletas e pelo bom humor.*

*Às amigas que sempre torcem por mim: Eduarda Dantas, Aliny Gama, Joely-Anna Mota, Vivianne Fonseca e Camila Faria. Obrigada pela amizade e incentivo.*

*Aos amazonenses queridos, amigos desde a graduação, Gelcirene Costa e Jesaias Ismael. Obrigada por estarem ao meu lado nesta jornada.*

*Ao querido Robson Rondini pelo incentivo, compreensão, paciência (muita paciência..), por me alegrar nos momentos em que a saudade de casa escorria pelos olhos, por tornar meus dias aqui muito mais agradáveis e felizes.*

*Aos colegas da Engenharia de Pesca: Caroline Campos, Aline Telles, Wander Silva, Anndson Brelaz, Luana Malheiros e Diogo Cardoso. Obrigada pela torcida.*

*Às meninas do 34 que me agüentaram por tanto tempo: Priscila Innocêncio e Isadora Bertoldi. Obrigada pela paciência e por dividirem comigo um lar.*

*Aos amigos que fiz em Jaboticabal: Carol Nebo, Débora Lunardi, Thais Pelisari, Diego Mendes.*

*Aos funcionários do CAUNESP por serem tão prestativos.*

*À todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meu muito obrigada.*

## **APOIO FINANCEIRO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.  
Bolsa de Mestrado.

## RESUMO

### **Efeito do L-triptofano dietético na mediação do estresse de transporte e social do matrinxã (*Brycon amazonicus*)**

Este estudo avaliou, em matrinxã juvenil, as respostas de estresse de transporte e as respostas comportamentais e de estresse após interação social de diferente número de indivíduos alimentados com suplementação de L-triptofano (L-TRP). No Experimento 1, a ração controle (0,74g L-TRP/100g) foi suplementada com L-TRP (2 e 4 X) e após 7 dias de alimentação, os peixes ( $60,6 \pm 11,9$  g) foram transportados (quatro horas) e amostrados antes, às 2 e 4 horas do início e 1, 6 e 24 h do término do procedimento. No Experimento 2, a ração controle (0,27g L-TRP/100g) foi igualmente suplementada e ofertada a grupos de 2, 4 e 6 peixes ( $148,5 \pm 28,8$  g) que foram expostos a confrontos durante 20 min. O transporte aumentou a concentração sanguínea de cortisol e da glicose e redução da concentração de sódio, embora o perfil dos outros indicadores (cloreto, potássio, proteína total, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM) não tenha padrão claro de estresse nos peixes controle, mas a suplementação com L-TRP inibiu a elevação de cortisol, reduziu a glicose e elevou o cloreto circulantes. Quanto às variáveis comportamentais, de modo geral, a latência para o 1º ataque, o número de mordidas e de perseguição foi menor nos confrontos de maior número de peixes que recebeu L-TRP. O número de indivíduos nos confrontos não afetou a liberação de cortisol, mas a suplementação com L-TRP aumentou os valores de cortisol, glicose, cloreto, número de eritrócitos e CHCM, enquanto houve redução do hematócrito e VCM. Os resultados sugerem a participação do L-TRP em diferentes vias, inibitória e excitatória, na mediação das respostas de liberação do cortisol em diferentes condições de manejo.

**Palavras-chave:** agressividade, cortisol, matrinxã, transporte, L-triptofano.

## ABSTRACT

### **Effect of dietary L-tryptophan in the mediation of transport and social stress of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*)**

This study evaluated, in juvenile matrinxã, the stress responses elicited by transportation and during social interaction of different number of fish fed with dietary L-tryptophan (L-TRP). In the Experiment 1, control diet (0,74g L-TRP/100g) was supplemented with L-TRP (2 and 4 X) and after 7 days feeding, fish ( $60.6 \pm 11.9$  g) were transported (4 hours) and sampled before, at 2 and 4 h of the beginning and 1, 6 and 24 h of the end of the procedure. In the Experiment 2, the control diet (0,27g L-TRP/100g) was equally supplemented and offered to 2, 4 and 6 fish ( $148.5 \pm 28.8$  g) exposed to confrontation for 20 min. Transport increased the blood concentration of cortisol and glucose and reduced sodium, although the profile of the other indicators (chloride, potassium, total protein, hematocrit, hemoglobin, MCV, CMCH) did not show a clear pattern of stress in control fish, but L-TRP supplementation inhibited the elevation of cortisol, reduced the glucose and chloride. Regarding behavior parameters, in general, latency for the first attack, number of bites and chasing were lower in the interaction of higher number of fish fed with L-TRP. The number of fish exposed to interaction did not affect the cortisol concentration, but the supplemented L-TRP increased the cortisol, glucose, chloride, erythrocytes and CMCH values and reduced hematocrit and MCV. The results suggest that L-TRP participates through different pathways, both inhibitory and excitatory, in the mediation of cortisol secretion depending on the handling conditions.

**Keywords:** aggressiveness, cortisol, matrinxã, transport, L-tryptophan.

# 1. INTRODUÇÃO

A produção aquícola global continua crescendo no novo milênio, embora mais lentamente que nos anos 1980 e 1990. Em menos da metade de um século, a aquíicultura se expandiu de uma produção quase insignificante para uma produção comparável com a da pesca extrativista para fins de abastecimento alimentar mundial. Se por um lado, a pesca convencional está enfrentando uma crise de abastecimento, com número reduzido de peixes capturados e em tamanhos menores, a aquíicultura está evoluindo também em termos de inovação e adaptação tecnológica para atingir todas as exigências da atividade e, dessa forma, aumentar a produção de alimentos (FAO, 2012).

Ainda, segundo dados da FAO (2012), a aquíicultura na América do Sul tem apresentado um crescimento forte e contínuo, principalmente em países como o Peru e o Brasil. Vários fatores contribuem para que a aquíicultura brasileira seja bastante promissora, dentre eles, o fato de possuir um grande potencial hídrico, oriundo das bacias hidrográficas, numerosas represas e a produtiva região costeira. O Brasil também apresenta diferentes microclimas, áreas adequadas ao desenvolvimento da atividade e uma riqueza de espécies favoráveis ao cultivo (CAMARGO; POUHEY, 2005).

Dentre as espécies cultivadas no país, encontra-se o matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix e Agassis, 1829), que se destaca como uma das espécies da ictiofauna amazônica de grande valor econômico por seu grande potencial para a criação intensiva (HONCZARYK, 2000; ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002; BRANDÃO et al., 2005), por apresentar bom desempenho reprodutivo, crescimento rápido e fácil aceitação de ração artificial, ótima qualidade de carne e boa aceitação comercial, além de adaptação rápida ao cultivo (VAL; HONCZARYK, 1995; GOMES; URBINATI, 2010).

O matrinxã pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Brycon*, que abrange grande número de espécies distribuídas desde o sul do México até a parte mediana da Argentina. Recentemente, foi descrito que a espécie *Brycon cephalus*, amplamente citada no Brasil como matrinxã, é, na verdade, o *Brycon amazonicus*, e que a distribuição da espécie *Brycon cephalus* se restringe apenas ao alto rio Amazonas, localizado

no Peru e na Bolívia (LIMA, 2003). Embora seja uma espécie amazônica, o matrinxã foi introduzido com sucesso na piscicultura da região sudeste do Brasil.

Apesar de ser uma espécie já bem adaptada ao cativeiro, o matrinxã é muito sensível ao manejo de criação, devido ao comportamento agitado, realizando movimentos extremamente vigorosos quando o seu espaço é reduzido nas redes de arrasto, caixas de transporte ou no próprio ambiente de cultivo, onde não há espaço suficiente para fuga (OLIVEIRA, 2008) e os encontros agonísticos são mais evidentes. Este comportamento peculiar, de alta agressividade intra-específica e de territorialidade do matrinxã, que é observado nas fases larval e juvenil, pode trazer prejuízos às pisciculturas devido aos confrontos e conseqüentes lesões e perda de escamas que facilitam a ocorrência de doenças nos animais e danos à produção (URBINATI et al., 2008; LEONARDO et al., 2008; LEONARDO et al., 2013; WOLKERS et al., 2012; WOLKERS et al., 2013).

Encontros agressivos entre coespecíficos são classificados como comportamento agonístico, que por sua vez, compreende qualquer atividade relacionada a luta, seja ela agressão, defesa, submissão ou fuga (Hickman et al., 2004). O comportamento agonístico é observado em muitos animais, já que há competição pelos recursos limitados como alimento, abrigo e parceiro reprodutivo.

As estratégias comportamentais e habilidade de luta dos animais podem levar a formação de dominância dentro de um grupo, quando um animal se sobrepõe a outros vencendo na interação social. A dominância social é um atributo das interações agonísticas repetidas entre dois indivíduos, caracterizado pelo resultado consistente de um oponente assumindo a posição de dominante e o outro a posição de subordinado (DREWS, 1993). Após o estabelecimento de dominância social, observa-se que o peixe subordinado demonstra comportamento de fuga, sem atos agressivos e com pouca movimentação, além de permanecer em alguma extremidade do aquário, fugindo do campo de visão do dominante. O peixe dominante se posiciona na região central do aquário e permanece seguindo e mordendo o subordinado (ØVERLI et al., 1999a; ØVERLI et al., 2005).

Os confrontos entre os peixes para estabelecer dominância social são estressantes para ambos, dominante e subordinado, levando a estimulação do eixo HHI (hipotálamo-hipófise-interrenal) e elevação dos níveis circulantes de cortisol (ØVERLI et al., 1999). O confinamento de truta arco-íris com diferente

número de indivíduos (um, dois, cinco e dez peixes), no mesmo aquário, provocou respostas de estresse em todas as situações, entretanto, no caso do indivíduo isolado a aclimação ao aquário aconteceu mais rapidamente. Quando em pares, a aclimação foi afetada pelo estabelecimento de hierarquia entre os peixes. Evidência de estresse social menos severo foi observada no grupo de cinco peixes, enquanto que a ausência de inibição do crescimento no grupo de 10 peixes, diferentemente do observado nos outros grupos, sugeriu a ocorrência das respostas de estresse menos severas, observadas no estudo, em função da interação social neste grupo (POTTINGER; PICKERING, 1992).

Estudos em vários vertebrados mostram que a serotonina é um neuro transmissor que atua na inibição do comportamento agressivo (FULLER, 1996; HSEU et al., 2003; PERREAULT et al., 2003; HÖGLUND et al., 2005; LEPAGE et al., 2005; SUMMERS; WINBERG, 2006). Animais que perdem o confronto social e se tornam subordinados apresentam ativação crônica do eixo serotoninérgico, enquanto os que se tornam dominantes apresentam ativação transitória com rápida recuperação das concentrações basais de serotonina (ØVERLI et al., 1999).

A reação de biossíntese da serotonina é catalizada pelas enzimas triptofano hidroxilase (TPH), que promove a hidroxilação do aminoácido essencial triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), e a descarboxilase de aminoácidos (L) aromáticos que converte o 5-HTP em serotonina, sendo que a TPH é específica para esta reação e controla a taxa de biossíntese da serotonina. Em peixes, assim como em mamíferos, a TPH não é saturada pelo substrato, sendo a disponibilidade de triptofano o fator limitante para a síntese de serotonina (FERNSTROM; WURTMAN, 1972; ALDEGUNDE et al., 2000). Estudos têm sido realizados utilizando o aminoácido L-triptofano, precursor da serotonina, como redutor da agressividade e do estresse de várias espécies de peixes (LEPAGE et al., 2002; HSEU et al., 2003; LEPAGE et al., 2003; HÖGLUND et al., 2005; LEPAGE et al., 2005; WOLKERS et al., 2013).

O estresse pode ser definido como um conjunto de respostas do organismo animal na tentativa de se adaptar à uma nova situação. As respostas ao estresse se caracterizam por alterações homeostáticas, de caráter adaptativo, que incluem respostas primárias, envolvendo o sistema nervoso simpático-tecido cromafim e eixo hipotálamo-hipófise-tecido interrenal (HHI) com liberação dos hormônios

catecolaminas e cortisol, para a circulação sanguínea, e respostas secundárias decorrentes da ação dos hormônios, como alterações metabólicas, iônicas, hematológicas e imunológicas. A cronicidade das respostas de estresse leva a exaustão do organismo, perda da capacidade adaptativa e efeitos negativos no crescimento, reprodução, aumento da suscetibilidade à infestação de parasitas, aparecimento de doenças e até morte, além de alterações comportamentais (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

Em sistemas intensivos de cultivo, várias são as práticas de manejo consideradas estressantes como: manejo de captura, classificação, densidade de estocagem e transporte. O transporte tem por objetivo a transferência dos peixes a outras pisciculturas, ou a lagos de pesca esportiva, comércio de peixes ornamentais. (CARMICHEL et al., 2001; LIM et al., 2003; GOMES; URBINATI, 2010).

Apesar de ser necessário no manejo, o transporte é um procedimento que expõe os peixes a uma série de estímulos adversos responsáveis por várias respostas fisiológicas. Tais estímulos incluem: captura nos tanques, manejo, adensamento, transporte, piora na qualidade de água e liberação nos tanques de destinos (URBINATI et al., 2004). Algumas medidas mitigadoras são tomadas a fim de reduzir o estresse provocado pelo procedimento de transporte e minimizar as perdas. Tais medidas incluem: restrição alimentar antes do transporte para esvaziamento gastrointestinal, adição de substâncias (cloreto de sódio, sulfato de cálcio, cloreto de cálcio, soluções tamponantes e anestésicos) na água do transporte, trocas de água durante o transporte, densidade de peixes, uso de imunostimulantes, entre outros (KUBITZA, 1999; CARNEIRO; URBINATI, 2001, 2002; GOMES; URBINATI, 2005; BENDHACK; URBINATI, 2009). No entanto, apesar do uso de medidas minimizadoras de estresse, o matrinxã ainda apresenta alta mortalidade após manejo de transporte, o que causa prejuízo às pisciculturas (INOUE et al, 2003). Estudos com outras substâncias devem ser realizados, para reduzir as consequências negativas que o estresse provoca nos animais, que podem incluir também alterações no comportamento dos peixes.

Suplementações dietéticas com triptofano têm mostrado efeitos positivos em peixes e outros animais de criação, que incluem redução do comportamento agressivo, canibalismo, sensibilidade à dor e resposta ao estresse (BOSCH et al., 2007; HEYLIGER et al., 1998; MARKUS et al., 2000; SCHØYEN et al., 2007;

WELD et al., 1998). Em peixes, estudos demonstraram que dietas enriquecidas com triptofano promovem redução da resposta de estresse (cortisol) após estresse agudo e redução da agressão (LEPAGE et al., 2002, 2003, 2005; WINBERG et al., 2001; WOLKERS et al., 2012).

A suplementação de triptofano pode ser utilizada como estratégia de redução das respostas de estresse e de comportamento agressivo do matrinxã. O entendimento dos mecanismos de atuação do triptofano pode trazer subsídios para o desenvolvimento de tecnologias de produção que reduzam os efeitos negativos do estresse durante as práticas de manejo.

Considerando o exposto em relação às respostas de estresse do matrinxã, quer seja durante manejo de criação quanto em condições de interação social, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação dietética de triptofano na mediação de respostas de estresse no transporte e na interação social de diferente número de indivíduos juvenis da espécie.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Alevinos de matrinxã foram adquiridos de uma piscicultura comercial e mantidos em tanques escavados, sendo alimentados diariamente com ração comercial (32%PB) até atingirem tamanho de juvenis para serem usados nos dois experimentos descritos a seguir:

### **2.1 Preparo da ração suplementada com triptofano**

Para o preparo das dietas experimentais foi utilizada ração comercial contendo 32%PB. Inicialmente os lotes de ração passaram por análise de aminograma a fim de determinar a quantidade exata de L-TRP já existente em cada lote. A ração comercial foi, então, moída e o L-TRP acrescentado de acordo com as concentrações indicadas por cada tratamento. Em seguida, a mistura foi umedecida com água e peletizada em moedor de carne. Os péletes foram secos em estufa, resfriados, embalados e armazenados a -20°C.

### ***Experimento 1 – Efeito da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse durante o transporte de peixes***

180 juvenis de matrinxã ( $60,6 \pm 11,9$  g e  $17,0 \pm 1,08$  cm) foram transferidos para caixas de amianto de 1000L, com renovação de água e aeração constante, onde permaneceram por dois dias para sua aclimatação ao ambiente de laboratório, quando todos estavam consumindo a ração oferecida. Após aclimatação, os peixes receberam, por sete dias, ração contendo triptofano (L-TRP). Foram utilizados três tratamentos: Tratamento 1 (controle) – ração contendo 0,74g de L-TRP/100 g; Tratamento 2X – ração enriquecida 2X (1,21 g de L-TRP/100 g de ração) e Tratamento 4X – ração enriquecida 4X (2,15 g de L-TRP/100 g de ração). Após os sete dias, os peixes foram mantidos em jejum de 12 horas para esvaziamento do trato gastrointestinal (BERKA, 1986), e embalados em sacos plásticos de 20L (5L de água e 15L de oxigênio), na densidade de 166g/L, para transporte de quatro horas. Cada tratamento foi distribuído em quatro repetições. Após o transporte, os peixes foram transferidos para caixas de recuperação (cada repetição numa caixa) e amostrados para coleta de sangue. Os tempos de amostragem foram: antes da embalagem (n=8), às duas horas de transporte (n=10), imediatamente após o transporte (n=8), uma (n=8), seis (n=8) e 24 horas (n=8) após a chegada. Para a amostragem de duas horas de transporte, foram utilizados duas repetições a mais de cada tratamento a fim de evitar estresse adicional nas repetições que ainda seriam amostradas após o transporte.

### ***Experimento 2 – Efeito da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse e comportamento durante a interação social de peixes estocados em aquários***

240 peixes ( $148,5 \pm 28,8$  g e  $23,7 \pm 1,4$  cm) foram mantidos em caixas de amianto de 500L, com renovação de água e aeração, para aclimatação às condições laboratoriais. Após aclimatação, os juvenis receberam as dietas experimentais contendo L-TRP, durante sete dias, duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Os tratamentos utilizados foram: Tratamento 1 (controle) – ração comercial (0,27 g de L-TRP/100g de ração); Tratamento 2X – ração comercial enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração) e Tratamento 4X – ração comercial enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Peixes que receberam o mesmo tratamento foram mantidos em duas caixas a fim de diminuir efeito da familiaridade e hierarquia. Cada peixe recebeu um corte na nadadeira caudal, sendo no lóbulo superior em um dos peixes e no inferior no outro que formava o par, para posterior identificação. Em seguida, foram distribuídos em aquários de 80L, nas densidades de 2, 4 e 6 peixes, em sistema estático. Os aquários foram cobertos nas laterais e fundos para evitar que os peixes visualizem os peixes do aquário ao lado. Cada tratamento foi testado em seis repetições. Os peixes foram filmados por 20 minutos para observação do comportamento de interação social. Após o período de filmagem, foi realizada coleta sanguínea dos animais para posterior análise dos indicadores fisiológicos de estresse. Em seguida, os peixes foram medidos e pesados e distribuídos em caixas de recuperação.

## **2.2 Indicadores fisiológicos de estresse**

Os peixes foram anestesiados com benzocaína ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e o sangue coletado por punção da veia caudal, com seringas sem anticoagulante e distribuído em três baterias de microtubos. Para as análises no sangue total, foi adicionado o anticoagulante heparina nos microtubos. Este sangue foi utilizado para determinação do eritrograma. Para análise de glicose plasmática foi adicionado, em outra bateria de tubos, o anticoagulante Glistab-Labtest (EDTA 6g/dL e fluoreto de potássio 12g/dL) (Kit Labtest). Sangue sem anticoagulante permaneceu em temperatura ambiente, e após três horas foi centrifugado em 3000 rpm, por 5 min, a  $10^{\circ}\text{C}$  para separação de soro, que foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de cortisol, proteína total, cloreto, sódio e potássio.

O hematócrito foi determinado em tubo capilar heparinizado e centrifugado e o número de eritrócitos (RBC) contado em câmara de Neubauer. A concentração de hemoglobina foi determinada por reação colorimétrica (kit Labtest). Após obtenção dos resultados de hematócrito, número de eritrócitos e concentração de hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM) e a

concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados (LIMA et al., 1969). A glicose plasmática foi mensurada por método enzimático (kit Labtest, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), a concentração de cortisol por radioimunoensaio (kit Coat-a-count Cortisol, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA), os valores de proteína total e cloreto com kits Labtest e os íons sódio e potássio pelo seletor de íons Iselab Drake.

### 2.3 Análise do comportamento

O comportamento do matrinxã foi padronizado pelos membros do Laboratório de Biofísica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP – Jaboticabal. Duas categorias de comportamento foram validadas pelo grupo: *comportamento de agressão direta* (comportamento de alta intensidade agressiva, em que há contato físico e/ou resultam em uma fuga intensa do oponente) e *comportamento de ameaça* (comportamentos de baixa intensidade agressiva, sem contato físico e sem resultar em fuga intensa do oponente)(Wolkers et al., 2012).

Os comportamentos de agressão direta validados foram:

- *Mordida no corpo*: mordida efetiva no oponente, em qualquer parte do corpo, exceto a cabeça.
- *Mordida na cabeça*: mordida na cabeça do oponente. A região da cabeça foi delimitada pelos opérculos.
- *Colisão*: colisão com o oponente, causada por deslocamento em sua direção, ou desvio da rota
- *Perseguição*: explosão de movimento (deslocamento rápido) do perseguidor na direção do oponente, que por sua vez foge do agressor.

Os comportamentos de ameaças validados foram:

- *Tentativa de mordida*: realização do comportamento de mordida, sem efetivamente morder.
- *Acompanhamento*: acompanhamento do deslocamento do oponente. O agressor posiciona-se atrás ou na lateral do oponente e segue seu deslocamento, na mesma velocidade.
- *Vigia*: permanência parada ao lado do oponente, que não está se movimentando, mantendo-o em seu campo de visão
- *Ronda*: movimento em torno do oponente, que não está se movimentando.
- *Arrasto*: nado apoiando assoalho bucal externo no substrato, de forma que seu corpo fique perpendicular ao fundo.
- *Ciranda*: natação em círculos de ambos os animais, sendo os dois posicionados com a região da cabeça próxima à cauda do oponente. Esse comportamento não é atribuído a um agressor específico e sim considerado um comportamento comum a ambos os oponentes.

No presente estudo, o registro do comportamento também foi feito pela filmagem, durante 20 minutos, de cada unidade experimental. A latência antes do primeiro ataque foi cronometrada (segundos) e os ataques agressivos foram contabilizados. Os ataques agressivos avaliados foram mordida e perseguição. O comportamento agressivo foi apresentado como o número de atos por peixe durante os 20 minutos de observação.

## **2.4 Monitoramento da qualidade da água**

Durante o período experimental, os parâmetros físico-químicos da água nas caixas de estocagem, aquários e nos sacos de transporte foram monitorados. A temperatura e oxigênio dissolvidos foram mensurados com um oxímetro YSI 55 e os valores de pH e amônia total foram determinados pelo método de Nessler. Os valores obtidos nas caixas de estocagem foram: temperatura  $28,27 \pm 0,53$  °C, oxigênio dissolvido  $4,75 \pm 0,26$  mg/L, pH  $6,51 \pm 0,01$ , amônia total  $0,03 \pm 0,006$  mg/L; nos aquários: temperatura  $29,04 \pm 0,39$ °C, oxigênio dissolvido  $4,3 \pm 0,44$  mg/L, pH

6,48±0,02, amônia total 0,03±0,11 mg/L, e nos sacos de transporte: temperatura 30,11±0,30 °C, oxigênio dissolvido 4,03±0,94 mg/L, pH 6,6±0,04 e amônia total 0,09±0,01 mg/L.

## **2.5 Análise Estatística**

O experimento 1 foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (fatorial 3 x 6), consistindo de três tratamentos (controle, ração enriquecida 2X e ração enriquecida 4X) em seis tempos de amostragens (antes da embalagem, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma, seis e 24 horas após a chegada). Foram necessários utilizar aplicações logarítmicas nas variáveis de proteína total, potássio e sódio sérico e VCM.

O experimento 2 foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial (fatorial 3 x 3), correspondendo a 3 tratamentos (controle, ração enriquecida 2X e ração enriquecida 4X) em 3 densidades (2, 4 e 6 peixes). Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade e à análise de variância (ANOVA – two way) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%). Quando necessário, foram utilizadas transformações logarítmicas e raiz quadrada dos dados originais.

## **3. RESULTADOS**

Não houve mortalidade durante a realização dos experimentos e todos os peixes voltaram a se alimentar 24 horas após o transporte e a estocagem nos aquários.

### ***3.1. Efeito da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse durante o transporte de peixes***

Os níveis de cortisol sérico (Fig.1) foram significativamente afetados pelos tempos de amostragem ( $P < 0,0001$ ) e pela interação ( $P = 0,001$ ) entre os tempos de coleta e os tratamentos testados. Quando considerado apenas o efeito isolado dos tratamentos independente dos tempos de coleta, os níveis de cortisol não apresentaram diferença significativa ( $P = 0,1480$ ). O tratamento com L-TRP afetou as concentrações de cortisol pré-transporte. As concentrações foram significativamente maiores nos peixes que receberam dieta suplementada com os dois níveis de L-TRP.

Duas horas após início do transporte, os valores de cortisol circulante aumentaram nos peixes do grupo controle e nos alimentados com a suplementação de 2X (1,21g de L-TRP/100 g). Nestes grupos, as concentrações do hormônio voltaram aos valores pré-transporte quatro horas pós-transporte e tais valores permaneceram semelhantes em todas as amostragens posteriores. No grupo 4X (2,15g de L-TRP/100 g), não houve alteração nos níveis de cortisol observados na amostragem pré-transporte. A concentração de L-TRP 4X superior ao da dieta controle impediu o aumento do cortisol causado pelo procedimento de transporte.

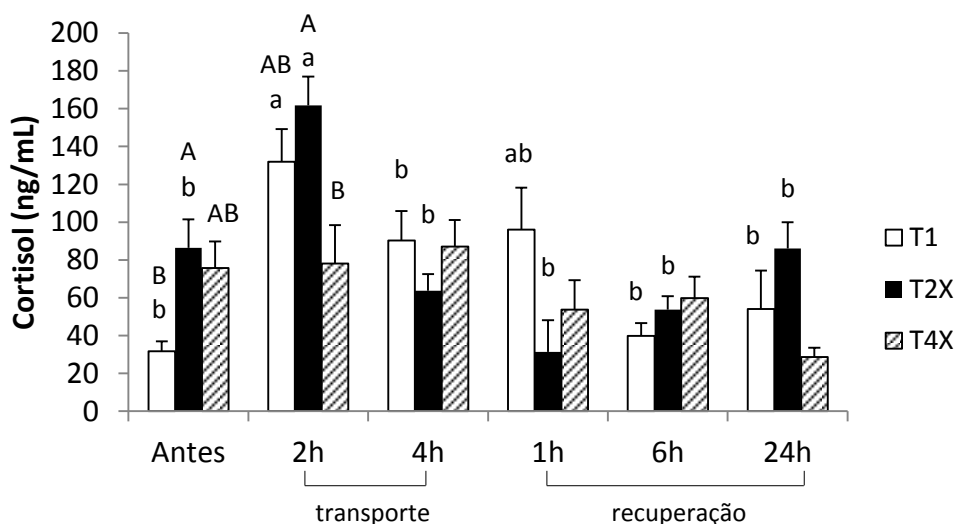


Figura 1. Concentração de cortisol sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Não houve interação dos efeitos da inclusão de L-TRP nos tempos de amostragem sobre a glicemia ( $P=0,6857$ ). Assim, os resultados (Fig. 2) são apresentados agrupando os dados de tratamentos nos tempos de amostragem ( $P < 0,0001$ ) e dados de todas as amostragens para cada tratamento ( $P=0,0074$ ). Houve um aumento progressivo da glicemia a partir dos valores pré-transporte até 1h após o transporte e redução a valores semelhantes às 6 e 24 horas de recuperação, valores estes ainda superiores aos valores pré-transporte.

A suplementação da dieta com L-TRP reduziu as respostas da glicose sanguínea com queda significativa nos peixes que receberam a suplementação de 2X os níveis do aminoácido da dieta controle e valores intermediários nos peixes que receberam a suplementação de 4X os níveis controle.

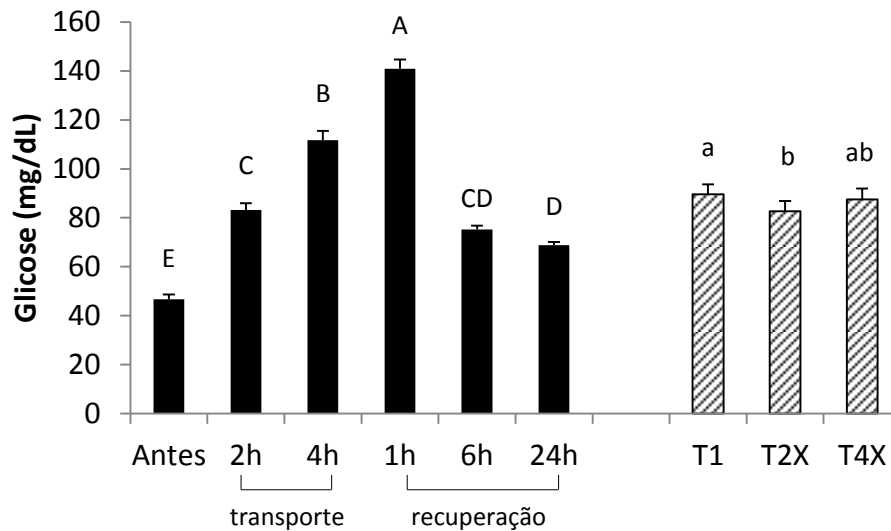


Figura 2. Concentração de glicose plasmática antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2 – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Assim como nas respostas da glicose, não houve interação ( $P=0.5582$ ) entre a suplementação de L-TRP e tempos de amostragem, mas o transporte afetou as concentrações de cloreto independente do tratamento ( $P < 0,0001$ ). Às quatro horas de transporte e uma hora após a chegada dos peixes os valores foram semelhantes entre si e superiores aos observados antes e após duas horas de transporte e inferiores aos observados seis e 12 horas após o término do transporte. O L-TRP também afetou os níveis de cloreto (Fig. 3) independente do tempo de amostragem ( $P=0,0003$ ). Nos dois grupos de peixes alimentados com L-TRP, os níveis de cloreto foram superiores ao do grupo controle.

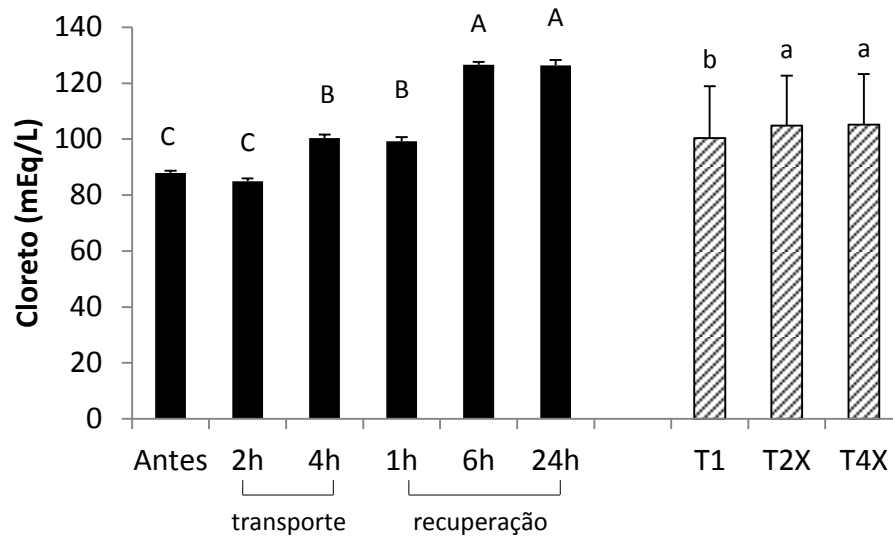


Figura 3. Concentração de cloreto sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

As concentrações de sódio sérico foram significativamente afetadas pelos tempos de amostragem ( $P < 0,0001$ ), embora não tenha ocorrido diferenças nos tratamentos ( $P = 0,0578$ ) e na interação entre tempos de coleta e tratamentos testados ( $P = 0,4511$ ). Os níveis de sódio sérico caíram progressivamente da primeira amostragem até as amostragens realizadas ao final do transporte e uma hora depois. Os valores começaram a subir às seis horas e atingiram os valores máximos às 24 horas pós-transporte (Fig. 4).

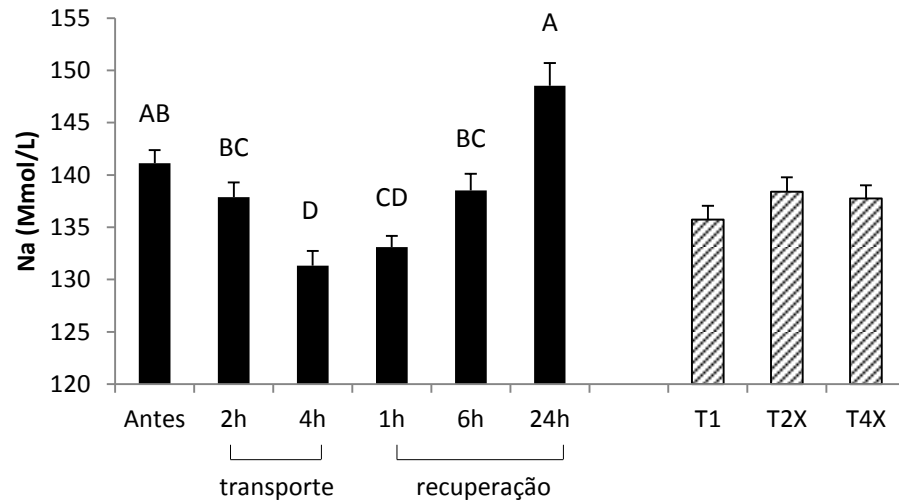


Figura 4. Concentração de sódio sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Os níveis de potássio sérico foram significativamente afetados pelos tempos de amostragem ( $P < .0001$ ) e interação ( $P < .0001$ ) entre tempo e dietas testadas. Porém, não houve efeito dos tratamentos ( $P = 0,4670$ ) nos valores de potássio.

As concentrações de potássio sérico dos peixes que receberam as duas suplementações de L-TRP foram significativamente mais baixas que nos peixes controle antes do transporte (Fig. 5) e este comportamento se repetiu duas horas após início do transporte. Às quatro horas de transporte, os valores se igualaram. Nas últimas amostragens (uma, seis e 24 horas pós transporte), as concentrações de K reduziram igualmente em todos os grupos de peixes e em todas as amostragens.

Os valores observados nos grupos tratados com L-TRP foram semelhantes aos valores pré-transporte, mas os valores dos peixes controles foram significativamente inferiores aos valores observados nas 3 amostragens anteriores.

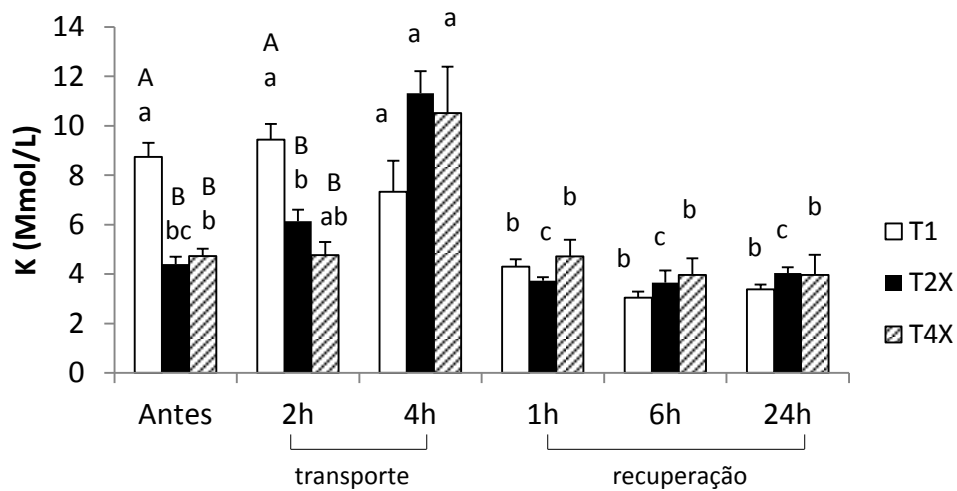


Figura 5. Concentração de potássio sérico antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X (4X) – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Os valores de proteína total não foram afetados pelos tratamentos ( $P=0.5883$ ) testados. Porém, estes valores sofreram influência significativa dos tempos de amostragem ( $P=0,0007$ ) e da interação ( $P < .0001$ ) entre tempo e tratamentos. Na amostragem pré-transporte, as concentrações séricas de proteína total dos peixes dos dois grupos suplementados com L-TRP foram significativamente superiores às concentrações dos peixes controle (Fig. 6). Esta relação se inverteu às 2 e 4 horas do transporte e a partir daí, as flutuações observadas não seguiram um padrão regular.

Nos peixes do grupo controle, as concentrações de proteína total aumentaram significativamente após o transporte e não retornaram aos valores iniciais até a amostragem final. Nos peixes alimentados com L-TRP suplementar não se observou um padrão regular.

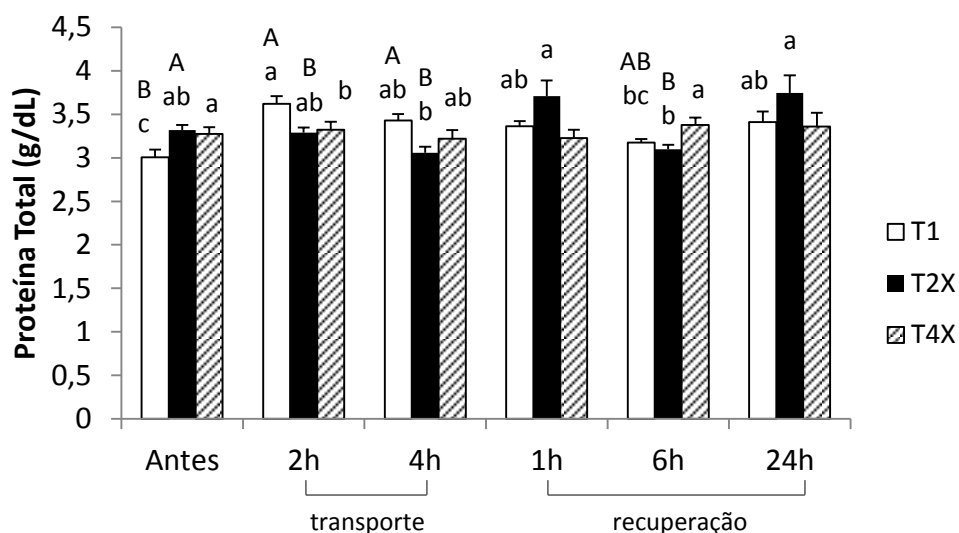


Figura 6. Concentração de proteína total antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

O hematócrito não apresentou diferença significativa para os tratamentos ( $P=0,0993$ ). Houve diferença nos valores de hematócrito para os tempos de amostragem ( $P < .0001$ ) e interação entre tempo e tratamentos ( $P < .0001$ ). Os valores de hematócrito na amostragem pré-transporte foram significativamente maiores nos dois grupos de peixes que receberam L-TRP suplementar, em relação ao grupo controle, e mais elevados no grupo 4X que no 2X (Fig. 7). Este padrão se inverteu às 2 e 4 horas de transporte, indicando um efeito mais pronunciado de redução dos valores iniciais do hematócrito com a suplementação de 4X a quantidade de L-TRP controle. Os valores voltam a se elevar na última amostragem.

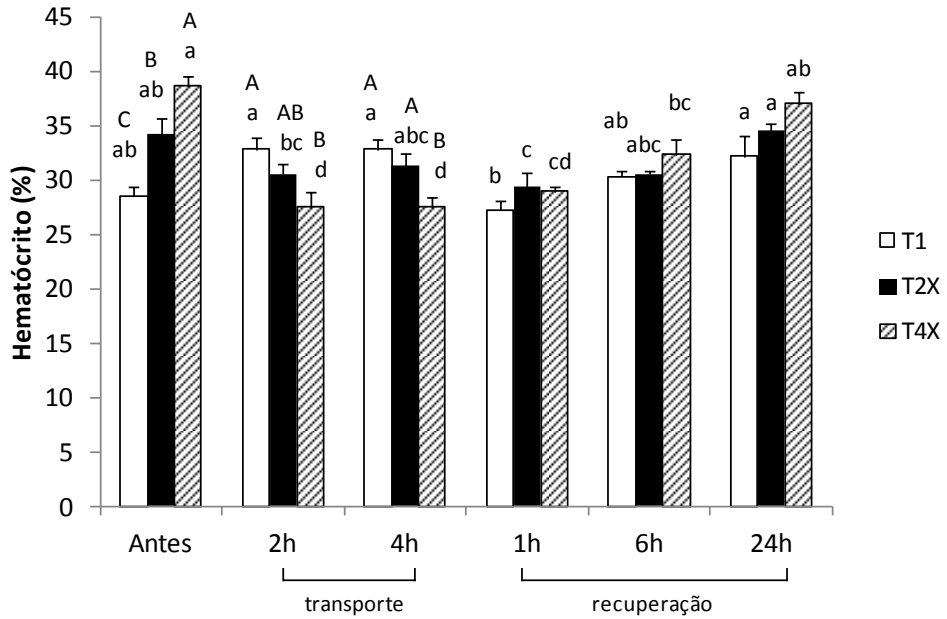


Figura 7. Hematócrito antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

O número de eritrócitos foi afetado significativamente apenas pelos tempos de amostragem ( $P < 0,0001$ ). Não houve efeito da interação entre tempos e tratamentos ( $P = 0,0608$ ). A contagem do número de células vermelhas foi significativamente mais elevada apenas uma hora após o transporte, independente dos tratamentos (Fig. 8), razão pela qual os dados de tratamentos são agrupados. O L-TRP não interferiu neste parâmetro ( $P = 0,6523$ ).

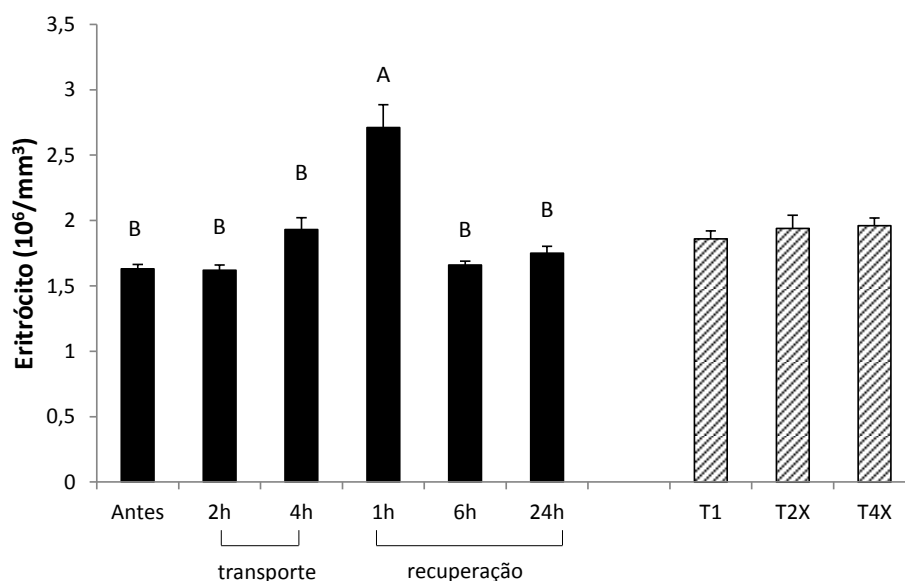


Figura 8. Número de eritrócito antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Os níveis de hemoglobina foram afetados pela tratamento ( $P=0,0012$ ), tempo ( $P < .0001$ ) e interação ( $P=0,035$ ). As concentrações de hemoglobina são mais elevadas nos peixes alimentados com suplementação de L-TRP antes do transporte (Fig. 9) e isso se repete às 2 e 4 h de transporte nos grupos 2X e 4X em relação ao grupo controle, respectivamente. No período pós transporte, as diferenças entre os grupos desaparecem embora todos apresentem um padrão de valores mais elevados que durante e antes do transporte, exceto pelos peixes do grupo 4X que já estava elevado às 4h.

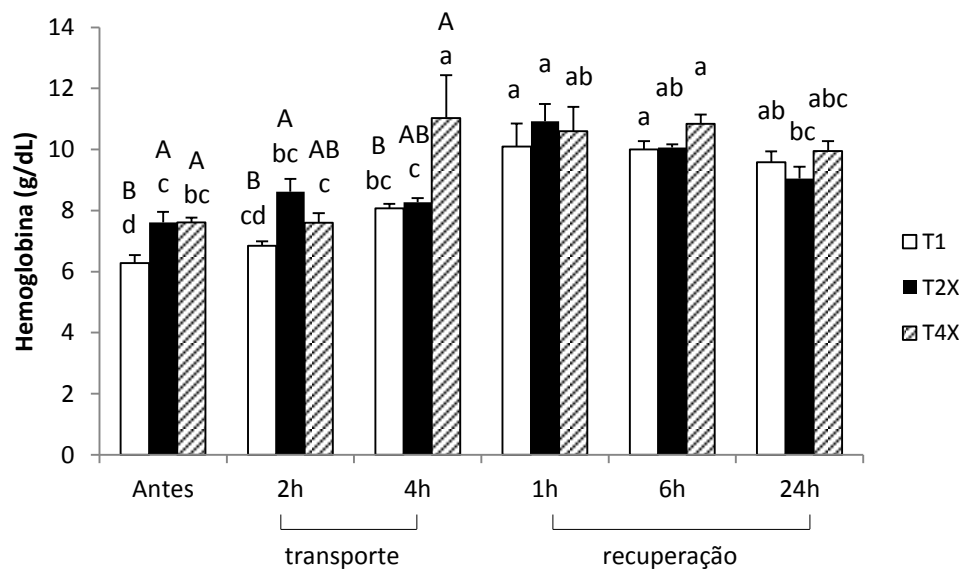


Figura 9. Concentração de hemoglobina antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas e o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

O volume corpuscular médio foi afetado pelo tempo ( $P < .0001$ ) e pela efeito de interação ( $P < .0001$ ) entre tempos e tratamentos, porém não houveram diferenças nos tratamentos ( $P = 0,1255$ ). O padrão geral da resposta do VCM se assemelha ao do hematócrito, indicando que as alterações deste parâmetro ocorreram por alteração do volume das células e não pelo número delas (Fig. 10). Os peixes alimentados com triptofano apresentam VCM mais elevados antes do transporte e este padrão se inverte as 2 e 4 h de transporte, sendo os valores mais baixos nos peixes que receberam a maior quantidade de triptofano, às 4h.

Depois de 1 h de concluído o procedimento do transporte, os três grupos de peixes apresentaram, igualmente, os valores mais baixos de VCM, os quais voltaram a se elevar 6 e 24 h depois. Na última amostragem, os valores dos peixes com L-TRP foram mais elevados que nos controles.

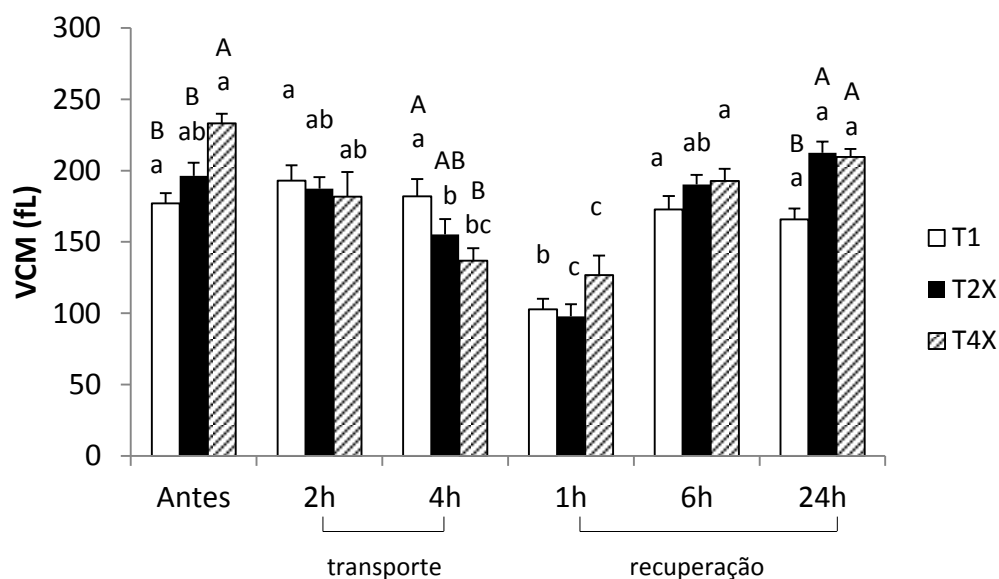


Figura 10. Volume corpuscular médio antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas o mesmo tratamento nos diferentes tempos ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

A resposta da CHCM observada indica padrão semelhante ao da hemoglobina (Fig. 11), com elevação gradual até a amostragem de 1h após o transporte e redução às 24h, embora os valores não retornem aos observados no pré-transporte. Não houve efeito da dieta ( $P=0,05994$ ) e nem da interação tempo x tratamento ( $P=0,0644$ ) neste parâmetro. As diferenças foram observadas apenas para os tempos de amostragem ( $P < .0001$ ).

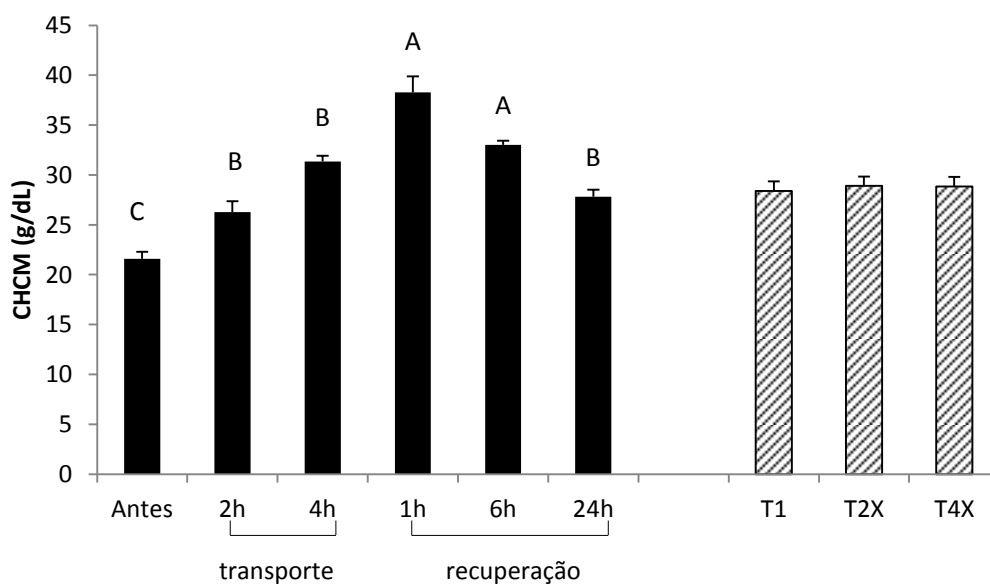


Figura 11. Concentração de hemoglobina corpuscular média antes, durante e após o transporte de matrinxã. Tratamentos: T1 (controle) – 0,74g de L-TRP/100g de ração; T2X – 1,21g de L-TRP/100 g de ração e T4X – 2,15g de L-TRP/100 g de ração. Tempos de coleta: antes do transporte, às duas horas de transporte, imediatamente após o transporte, uma hora, seis e 24 horas após o transporte. Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo de amostragem ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão.

### **3.2 Efeitos da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse e comportamento durante a interação social de peixes estocados em aquários**

#### **3.2.1. Variáveis de comportamento**

As tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados do tempo de latência para o primeiro ataque, total de mordidas e perseguição por peixe, respectivamente, nos peixes agrupados em diferentes densidades.

A latência para o primeiro ataque (Tabela 1) foi maior nos aquários com dois peixes alimentados com a suplementação 4x de L-TRP. No caso de 4 peixes, não houve diferença no tempo de latência independente dos tratamentos testados. No agrupamento de 6 peixes, observou-se uma latência mais tardia com a suplementação de 2x L-TRP em relação aos outros tratamentos. Comparando a resposta do número de peixes dentro de cada tratamento, observa-se que no T1 não houve diferença entre as densidades testadas, embora numericamente a latência diminuiu nos tratamentos com suplementação de L-TRP. No T2X, a latência foi menor apenas no agrupamento de 4 peixes, enquanto em T4X, a latência para o primeiro ataque mais alta foi observada no agrupamento de 2 peixes.

Tabela 1. Latência (segundos) para o primeiro ataque em juvenis de matrinxã alimentados com diferentes níveis de triptofano (L-TRP) durante interação social em diferentes densidades.

	<b>2 peixes</b>	<b>4 peixes</b>	<b>6 peixes</b>
<b>T1</b> (0,27 g L-TRP/100g)	25,0±3 <sup>Aa</sup>	13,4±2,6 <sup>Aa</sup>	11,6±4 <sup>Ba</sup>
<b>T2X</b> (0,54 g L-TRP/100g)	15,5±6,6 <sup>Aa</sup>	7,2±1,3 <sup>Ab</sup>	34,2±4,3 <sup>Aa</sup>
<b>T4X</b> (1,08 g L-TRP/100g)	148,6±1 <sup>Ba</sup>	11,5±3,5 <sup>Ab</sup>	13,2±3,5 <sup>Bb</sup>

Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada densidade e letras minúsculas o mesmo tratamento nas diferentes densidades ( $p < 0,05$ ). Média±erro-padrão.

O número de mordidas (Tabela 2) cresceu gradualmente nos T1, T2X e T4X, embora não houvesse significância estatística ( $P=0.624$ ). Na interação de 4 peixes, não houve diferença entre os tratamentos com L-TRP ( $P=0,1782$ ), enquanto no agrupamento de 6 peixes, a suplementação de 2x e 4x L-TRP aumentou o número de mordidas ( $P=0,0361$ ). Comparando as diferentes densidades de peixes dentro de cada tratamento, observa-se que nos agrupamentos de peixes que receberam a ração controle (T1), o maior número de mordidas ocorreu na interação de 4 peixes, sendo iguais as respostas de 2 e 6 de peixes. Na suplementação com 2X L-TRP, não houve diferença nesta variável, enquanto peixes que receberam 4X L-TRP apresentaram menor número de mordidas quando agrupados em 4 e 6 peixes.

Tabela 2. Número de mordidas, por peixe, em juvenis de matrinxã alimentados com diferentes níveis de triptofano (L-TRP) durante interação social em diferentes densidades.

	<b>2 peixes</b>	<b>4 peixes</b>	<b>6 peixes</b>
<b>T1</b> (0,27 g L-TRP/100g)	12,3±1,6 <sup>Ab</sup>	27,3±10,2 <sup>Aa</sup>	11,1±3,0 <sup>Bb</sup>
<b>T2X</b> (0,54 g L-TRP/100g)	31,4±10,6 <sup>Aa</sup>	28,7±2,4 <sup>Aa</sup>	27,4±8,5 <sup>ABa</sup>
<b>T4X</b> (1,08 g L-TRP/100g)	46,7±11,0 <sup>Aa</sup>	20,5±11,3 <sup>Ab</sup>	33,6±2,8 <sup>Ab</sup>

Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada densidade e letras minúsculas o mesmo tratamento nas diferentes densidades ( $p<0,05$ ). Média±erro-padrão.

O número de perseguição, por peixe (Tabela 3) cresceu nos tratamentos que receberam L-TRP, especialmente no T2X, quando dois peixes interagiram. No agrupamento de 4 peixes, o número de perseguição não foi afetado pelo L-TRP. Já no agrupamento de 6 peixes, o L-TRP suplementar aumentou gradualmente o número de perseguição, sendo T4X significativamente diferente de T1. Comparando as densidades testadas dentro de cada tratamento, observa-se que o maior número de perseguição aconteceu no agrupamento de 4 peixes que receberam a ração controle. Quando os peixes receberam a ração T2X L-TRP, houve redução no comportamento de perseguição nos agrupamentos de 4 e 6 peixes. O mesmo aconteceu quando os peixes receberam ração com 4X L-TRP,

embora, no agrupamento de 6 peixes, o valor observado fosse intermediário, entre T2X e T1.

Tabela 3. Número de perseguições, por peixe, de juvenis de matrinxã alimentados com diferentes níveis de triptofano (L-TRP) durante interação social em diferentes densidades.

	<b>2 peixes</b>	<b>4 peixes</b>	<b>6 peixes</b>
<b>T1</b> (0,27 g L-TRP/100g)	26,3±8,3 <sup>Ba</sup>	46,7±9,2 <sup>Aa</sup>	19,0±2,4 <sup>Ba</sup>
<b>T2X</b> (0,54 g L-TRP/100g)	104,6±26,7 <sup>Aa</sup>	39,1±4,6 <sup>Aab</sup>	32,8±8,5 <sup>Bb</sup>
<b>T4X</b> (1,08 g L-TRP/100g)	66,2±15,4 <sup>ABa</sup>	31,3±4,2 <sup>Ab</sup>	44,3±3,7 <sup>Aab</sup>

Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada densidade e letras minúsculas o mesmo tratamento nas diferentes densidades ( $p < 0,05$ ). Média±erro-padrão.

### 3.2.2. Indicadores fisiológicos de estresse

As concentrações de cortisol sérico dos peixes expostos a interação social encontram-se na Fig. 12. Os resultados observados na interação de diferente número de peixes são apresentados agrupados por tratamento com L-TRP, pois não houve diferença entre o número de indivíduos que foram expostos ao confronto. As diferenças foram observadas em relação a quantidade de L-TRP suplementar e mostram que os níveis hormonais foram mais elevados nos peixes alimentados com as rações suplementadas com L-TRP (T2X e T4X).

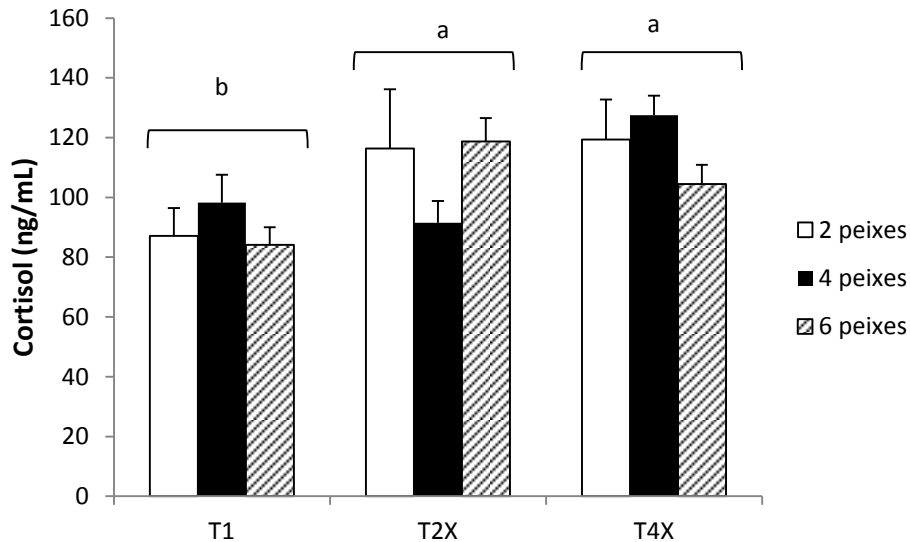


Figura 12. Cortisol sérico de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P=0.0020$ ); densidade ( $P=0,9156$ ); tratamentos x densidades ( $P=0,3075$ ).

Os resultados observados na análise da glicose sanguínea (Fig. 13) seguem o mesmo perfil do cortisol sérico. Os resultados observados na interação de diferente número de peixes são apresentados agrupados por tratamento, desde que não houve diferença em relação ao número de indivíduos colocados no aquário. As diferenças foram observadas em relação ao tratamento com L-TRP e mostram que, independente do número de peixes, os níveis de glicose plasmática foram mais elevados nos peixes alimentados com as rações suplementadas com L-TRP (T2X e T4X).

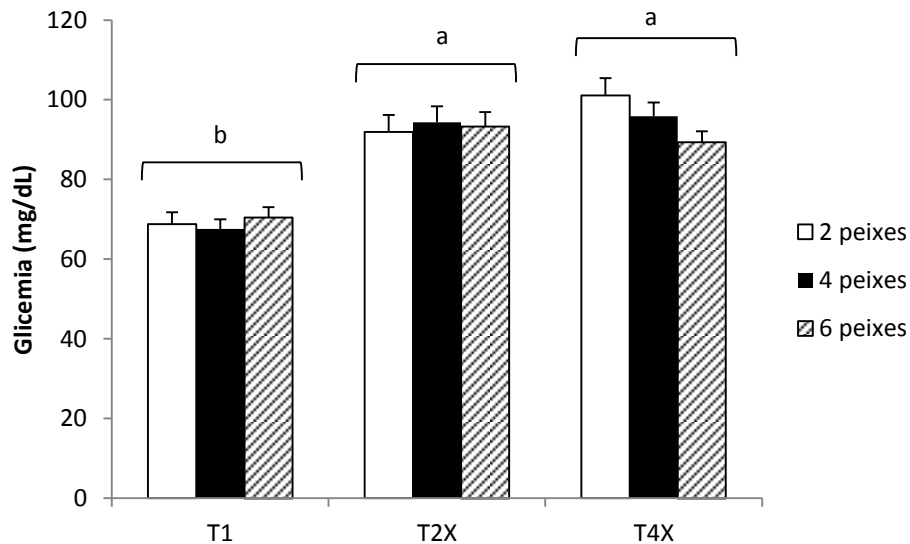


Figura 13. Glicose plasmática de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P < .0001$ ); densidade ( $P = 0,2259$ ); tratamentos x densidades ( $P = 0,1310$ ).

Similarmente ao observado nos resultados de cortisol sérico e glicose plasmática, as concentrações de cloreto sérico (Fig. 14) não diferiram entre as diferentes densidades de peixes nas interações sociais e os dados são apresentados agrupados por tratamento. As diferenças foram observadas apenas em relação ao tratamento com L-TRP e mostram que, independente do número de peixes, os níveis de cloreto circulante foram mais elevados nos peixes alimentados com as rações suplementadas com L-TRP (T2X e T4X).

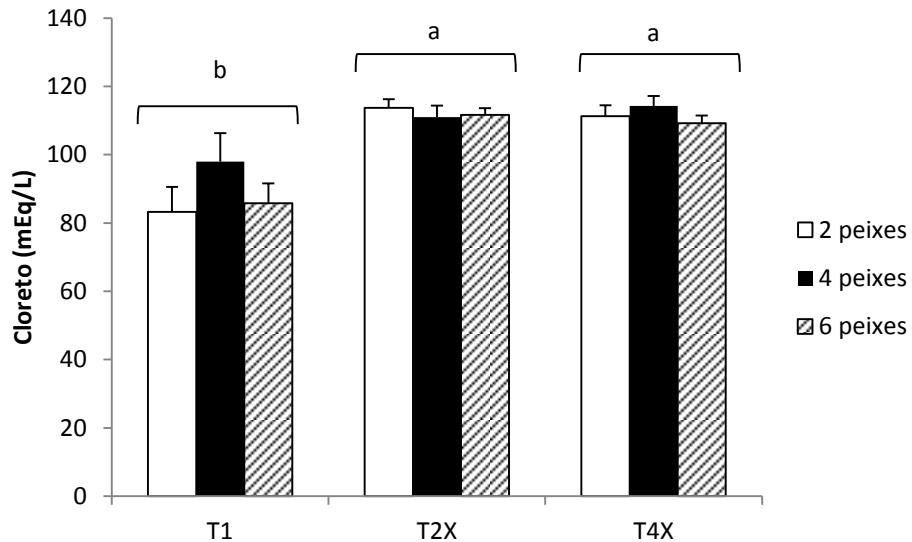


Figura 14. Cloreto sérico de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P < .0001$ ); densidade ( $P = 0,1938$ ); tratamentos x densidades ( $P = 0,3749$ ).

Não houve interação dos efeitos do tratamento com L-TRP com as densidades de peixes na concentração de proteína sérica (Fig. 15). A suplementação da dieta com L-TRP reduziu significativamente as concentrações de proteína total sérica dos peixes, enquanto que houve elevação das concentrações deste parâmetro nas interações sociais entre 4 e 6 matrinxãs, em relação à interação de apenas dois peixes.

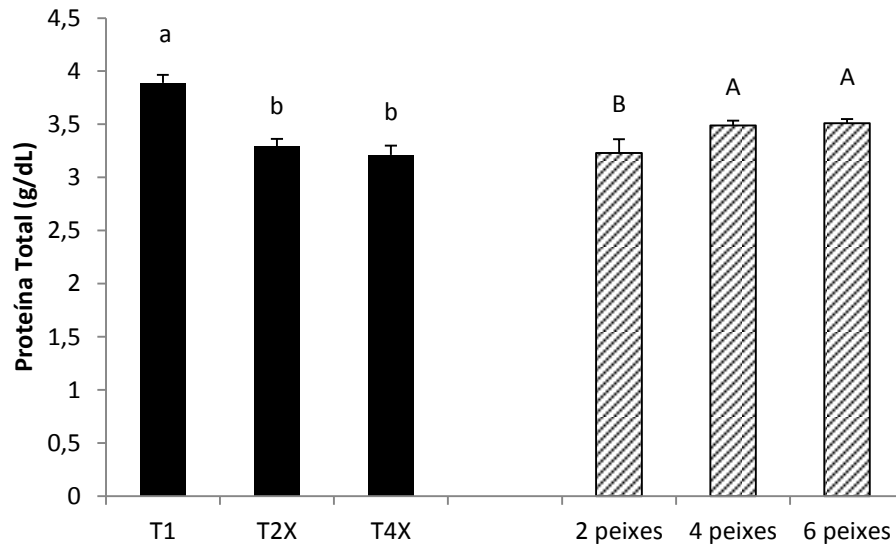


Figura 15. Proteína total sérica de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos e letras maiúsculas indicam diferenças na densidade de estocagem ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P < .0001$ ); densidade ( $P = 0,0111$ ); tratamentos x densidades ( $P = 0,3615$ ).

Os valores de hematócrito mostram que peixes de todos os grupos que interagiram (2, 4 e 6 peixes), alimentados com rações suplementadas com L-TRP apresentaram valores significativamente reduzidos deste parâmetro em relação aos peixes alimentados com a ração controle (Fig. 16).

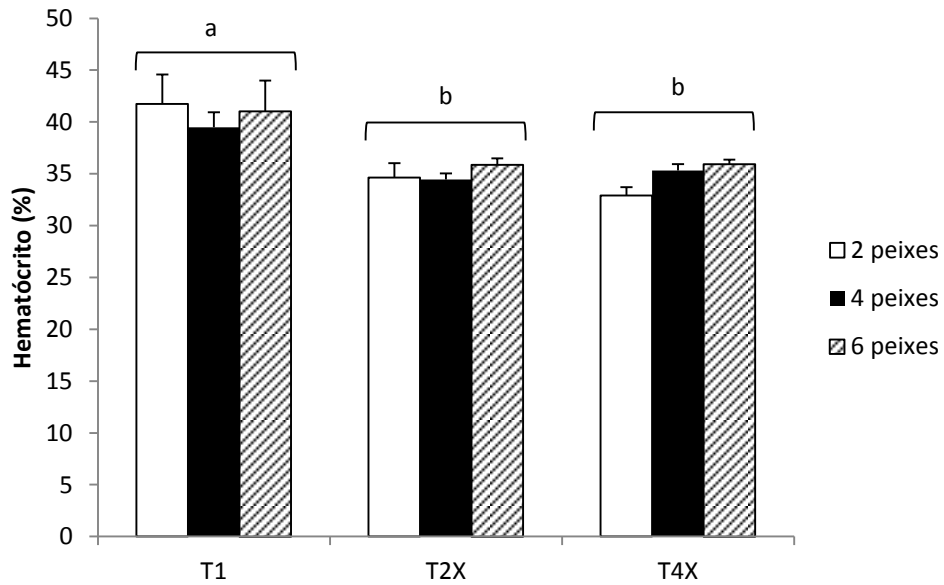


Figura 16. Hematócrito de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P < .0001$ ); densidade ( $P = 0,4736$ ); tratamentos x densidades ( $P = 0,6052$ ).

A contagem de eritrócitos mostrou padrão inverso ao do hematócrito (Fig. 17), sendo os valores observados nos peixes que receberam as rações suplementadas com L-TRP mais elevados que os observados nos peixes controle, independente do número de peixes colocados no aquário.

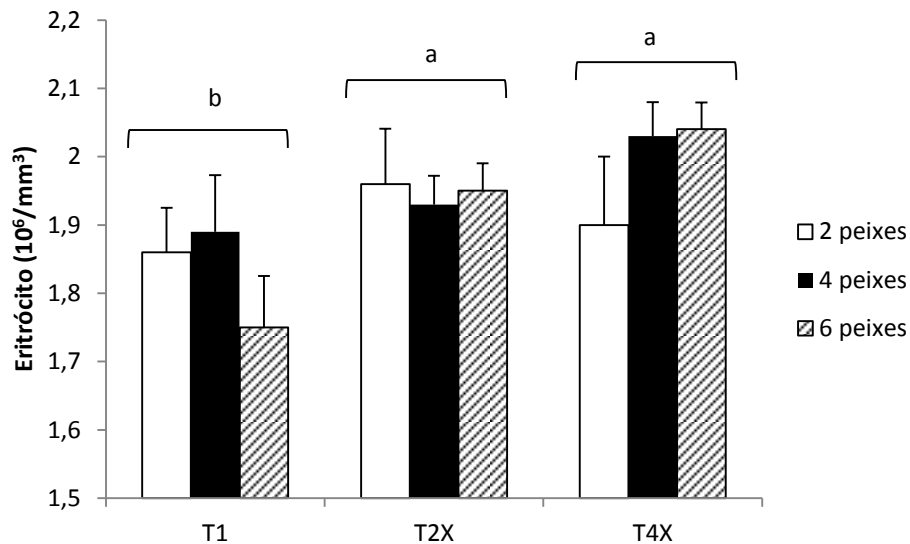


Figura 17. Número de eritrócitos de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P=0,0115$ ); densidade ( $P=0,7878$ ); tratamentos x densidades ( $P=0,3003$ ).

Em relação à concentração de hemoglobina (Fig. 18), houve redução gradual com o aumento da quantidade de L-TRP nas rações, sendo o valor observado em T4X significativamente diferente daquele de T1. Por outro lado, as concentrações de hemoglobina aumentaram com o aumento do número de peixes no aquário, sendo o valor observado no agrupamento de 6 peixes significativamente superior ao observado no agrupamento de apenas duas matrinxãs.

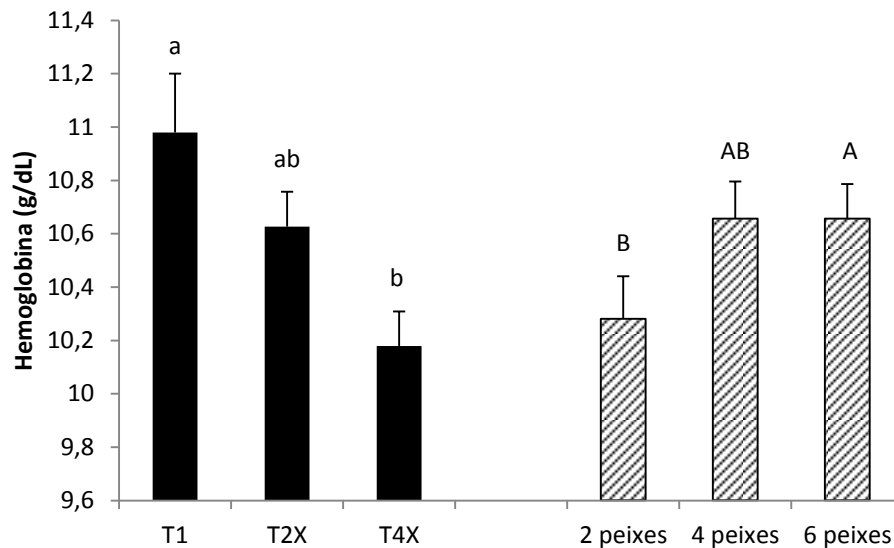


Figura 18. Hemoglobina de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos e letras maiúsculas indicam diferenças na densidade de estocagem ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P=0.0003$ ); densidade ( $P=0,1469$ ); tratamentos x densidades ( $P=0,8097$ ).

O perfil da resposta do VCM (Fig. 19) mostrou o mesmo padrão observado na resposta do hematócrito, indicando que este parâmetro está associado aos resultados do hematócrito. Os resultados mostram que peixes alimentados com as rações suplementadas com L-TRP, independente do número de peixes colocados no aquário, apresentaram valores deste parâmetro sanguíneo significativamente reduzidos em relação aos valores observados nos peixes do tratamento sem suplementação com L-TRP.

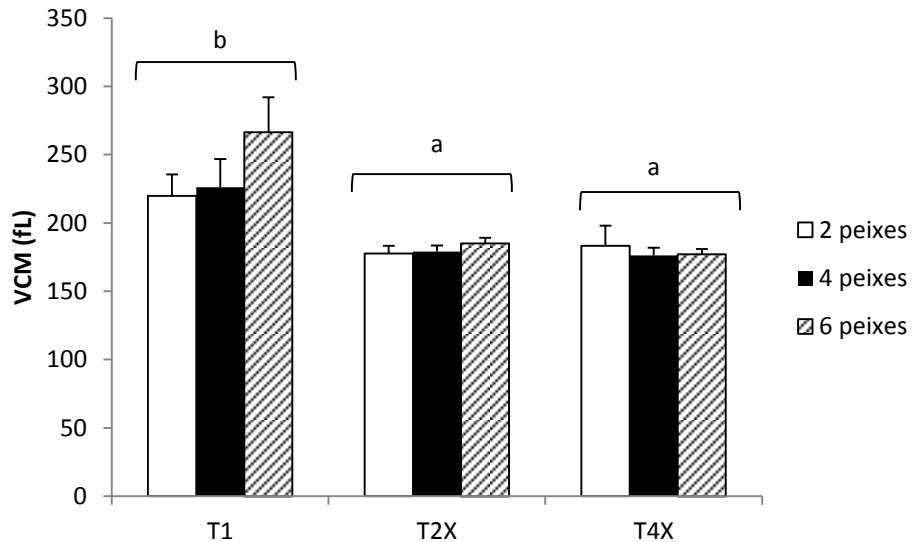


Figura 19. Volume corpuscular médio de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P < .0001$ ); densidade ( $P = 0,2786$ ); tratamentos x densidades ( $P = 0,3411$ ).

Os valores de CHCM mostram que os peixes alimentados com a ração suplementada com 2X a quantidade de L-TRP da ração controle, independente do número de peixes colocados nos aquários (Fig. 20), apresentaram valores significativamente superiores aos dos outros tratamentos com L-TRP (sem suplementação e suplementação de 4X a quantidade controle).

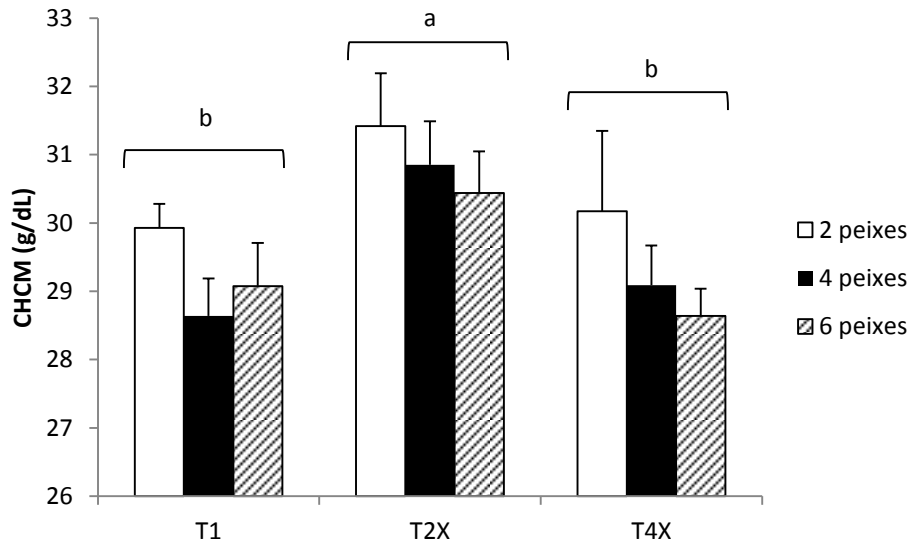


Figura 20. Hemoglobina corpuscular média de matrinxãs estocados em aquários com diferentes densidades (2, 4 e 6 peixes). Na ausência de diferença entre as densidades, os valores foram agrupados. Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p < 0.05$ ). Média  $\pm$  erro padrão. T1 – ração controle (0,27 g de L-TRP/100 g de ração); T2X - ração enriquecida 2X (0,54 g de L-TRP/100 g de ração); T4X – ração enriquecida 4X (1,08 g de L-TRP/100 g de ração). Tratamentos ( $P=0.0031$ ); densidade ( $P=0,6465$ ); tratamentos x densidades ( $P=0,4968$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a influência da suplementação dietética de triptofano na mediação de respostas de estresse geradas no transporte dos peixes em sistema fechado e na interação social de diferente número de juvenis de matrinxã.

Os dados obtidos mostram que a maior suplementação de L-TRP impediu o aumento do cortisol causado pelo estresse de transporte, no Experimento 1, enquanto que, independente do número de peixes que participaram dos confrontos, ambos os níveis de suplementação dietética com L-TRP aumentaram as concentrações do cortisol circulante, no Experimento 2.

Estes dados confirmam dados obtidos em estudos prévios realizados em nosso laboratório que mostraram redução dos níveis circulantes de cortisol em juvenis de matrinxã alimentados por uma semana com dieta suplementadas com L-TRP, depois que os peixes foram adensados por redução do volume de água da caixa de criação (MONTEDOR et al., submetido), enquanto que peixes que receberam suplementação dietética de L-TRP, pelo mesmo tempo, e foram submetidos a condições de confronto social, apresentaram aumento dos níveis de cortisol sanguíneo após 20 min de interação (WOLKERS et al., 2012).

#### ***4.1 Experimento 1: Efeito da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse durante o transporte de peixes.***

Este experimento evidenciou as respostas clássicas de estresse nos juvenis de matrinxã do grupo controle, submetidos a transporte em sistema fechado, além de um efeito inibitório do L-TRP dietético suplementar na elevação do cortisol sérico induzido pelo transporte.

Observamos, nos peixes que receberam a ração controle, aumento da concentração sanguínea de cortisol e da glicose e redução das concentrações de sódio, embora o perfil dos outros indicadores não tenha evidenciado padrões claros de resposta de estresse. O transporte de peixes é considerado uma prática estressante que provoca alterações hormonais, metabólicas e iônicas em peixes, incluindo a espécie modelo deste estudo (CARNEIRO; URBINATI, 2001; URBINATI; CARNEIRO, 2004). Sob condições de estresse, o sistema simpático-cromafim e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal dos peixes são ativados liberando catecolaminas e cortisol na circulação sanguínea. Estes hormônios são responsáveis por mudanças nas respostas metabólicas, iônicas e imunológicas como uma adaptação frente ao estressor (BARTON; IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997). A liberação de cortisol no plasma e o consequente aumento dos níveis de glicemia no sangue são considerados indicadores confiáveis de estresse em peixes (WENDELAAR BONGA, 1997).

Neste estudo, os níveis de cortisol antes do transporte foram afetados pelo L-TRP. Nos peixes dos grupos que receberam L-TRP suplementar o hormônio circulante era mais elevado. Após duas horas de transporte, o aumento

provocado pelo transporte foi inibido pelo L-TRP. Neste grupo de peixes, os níveis de cortisol se mantiveram constantes ao longo de todo o experimento. Nos outros grupos (controle e 2X L-TRP), os valores elevados do hormônio voltaram aos valores iniciais a partir de 4 horas e nenhuma diferença foi observada durante o resto do experimento.

O L-TRP suplementar nas rações foi utilizado, neste estudo, como estratégia para a redução das respostas de estresse. Estudos em várias espécies de peixes, utilizando o aminoácido L-triptofano como redutor da resposta de estresse e liberação do cortisol, demonstraram o efeito do L-TRP na elevação do cortisol sérico antes da exposição dos peixes ao estressor, como o observado no matrinxã antes do transporte, e do efeito inibitório na liberação do cortisol (LEPAGE et al., 2002; 2003; 2005; TEJPAL et al., 2009; HOSEINI e HOSSEINI, 2010; AKHART et al., 2012; HOSEINI et al., 2012; HOSSEINI e HOSEINI, 2013).

Dietas suplementadas com L-TRP reduziram respostas de estresse em carpa (*Cirrhinus mrigala*) em condição de adensamento (TEJPAL et al., 2009), além de aumentar a tolerância da mesma espécie em água salgada e reduzir a liberação de cortisol (HOSEINI e HOSSEINI, 2010). Em carpa comum (*Cyprinus carpio*), L-TRP dietético bloqueou estresse induzido pela exposição ao cobre (HOSEINI et al., 2012) e reduziu os níveis de cortisol plasmático expostos a exposição aérea ou abaixamento do nível da água do tanque (HOSSEINI e HOSEINI, 2013). Adicionalmente, a suplementação dietética com L-TRP ajudou a reduzir estresse térmico e de salinidade em “rohu” (*Labeo rohita*) (AKHTAR et al., 2012).

#### **4.2 Experimento 2: Efeitos da suplementação dietética de L-triptofano nas respostas de estresse e comportamento durante a interação social de peixes estocados em aquários**

Este experimento evidenciou que, quanto às variáveis comportamentais, de modo geral, a latência para o 1º ataque, o número de mordidas e de perseguição foi, menor nos confrontos de maior número de peixes que recebeu L-TRP. O número de indivíduos nos confrontos não afetou a liberação de cortisol, mas a

suplementação com L-TRP aumentou os valores de cortisol, glicose, cloreto, número de eritrócitos e CHCM, enquanto houve redução do hematócrito e VCM.

O L-TRP tem sido utilizado em estudos visando redução de comportamento agressivo, por seu papel como precursor da serotonina, neurotransmissor envolvido o controle deste comportamento (LEPAGE et al., 2002; HSEU et al., 2003; LEPAGE et al., 2003; HÖGLUND et al., 2005; LEPAGE et al., 2005; WOLKERS et al., 2013).

Relação entre o sistema serotoninérgico e o HHI já foi descrita anteriormente em outras espécies de peixes (WINBERG et al., 1997; ØVERLI et al., 1999; HÖGLUND et al., 2005; LEPAGE et al., 2002, 2005; WOLKERS et al., 2013). Além do papel da serotonina no controle do comportamento agressivo em alguns peixes (WINBERG et al., 2001; HÖGLUND et al., 2005; LEPAGE et al., 2005; LILLESAAR, 2011; WOLKERS et al., 2012), existem evidências mostrando que o sistema serotoninérgico central está envolvido no controle do eixo HHI e que a ação da serotonina é excitatória, promovendo liberação de cortisol (WINBERG et al., 1997; WINBERG; LEPAGE, 1998; HÖGLUND et al., 2000; WOLKERS et al., 2012), como ocorreu no presente estudo, em condições de confronto social.

Este comportamento na secreção de cortisol indica que o L-TRP atua no HHI por mecanismo diferente daquele verificado no Experimento 1 deste estudo. Os mecanismos pelos quais o L-TRP atua ainda não estão esclarecidos e podem ocorrer por diferentes vias neurais, cujos neurotransmissores dependem igualmente do TRP como precursor. A relação entre o sistema serotoninérgico e a produção de cortisol pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-interrenal já foi demonstrada (WINBERG et al., 1997; HÖGLUND et al., 2000; LEPAGE et al., 2002, 2003), mas a participação da melatonina na elevação de cortisol e no comportamento agressivo também já foi sugerida em outro estudo com trutas (LEPAGE et al., 2005). Além disso, foi evidenciado em salmão do Atlântico que a dopamina hipotalâmica pode estar envolvida no redutor de estresse do L-TRP em condições de confinamento (BASIC et al., 2013).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos dois experimentos, utilizando duas condições distintas de manejo, sugerem a participação do L-TRP na mediação das respostas de liberação do cortisol por diferentes mecanismos de controle, um inibitório e outro excitatório.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALDEGUNDE, M.; SOENGAS, J. L.; ROZAS, G. Acute effects of L-tryptophan on tryptophan hidroxylase rate in brain regions (hypothalamus and medulla) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 286, n. 2, p. 131-135, Feb. 2000.
- AKHTAR, M. S. et al. Physiological responses of dietary tryptophan fed *Labeo rohita* to temperature and salinity stress. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, doi: 10.1111/jpn.12017, Nov. 2012.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALLOSSI, D. M.; FIM, J. D. I. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1059-1069, 2002.
- BASIC, D. et al. Short- and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 388–391, p. 8-13, Apr. 2013.
- BARTON, B. A., IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Review of Fish Diseases**, New York, p. 3-26, 1991.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, VA, v. 42, n. 3, p. 517-525, July 2002.
- BENDHACK, F., URBINATI, E.C. Calcium sulfate as stress reducer in matrinxã *Brycon amazonicus* transportation. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 25, p. 105-109, 2009.
- BERKA, R. **The transport of live fish**: a review. Rome: FAO, 1986, 57 p.

- BRANDÃO, F. R. et al. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 299-303, mar. 2005.
- BOSCH, G. et al. Impact of nutrition on canine behaviour: current status and possible mechanisms. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 20, p.180-94, Dec. 2007.
- CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aqüicultura: um mercado em expansão. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, out./dez., 2005.
- CARMICHEL, G.J.; TOMASSO, J.R.; SCHWEDLER, T.E. Fish transportation. In: WEDEMEYER, G.A. (Ed). **Fish hatchery management**. 2. Ed. Bethesda: American Fisheries Society, 2001, p. 641-660.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 297-304, Apr. 2001.
- CARNEIRO P. C. F.; URBINATI, E.C. 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquaculture International**, London, v. 10, n.3, p. 221-229, June 2002.
- DREWS, C. The concept and definition of dominance in animal behaviour. **Behaviour**, Leiden, v. 125, n. 3-4, p. 283-313, June, 1993.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome. 2012. 209 p.
- FERNSTROM, J. D., WURTMAN R. J. Brain serotonin content: regulation by plasma neutral amino acids. **Science**, New York, v. 178, n. 4059, p. 414-416, Oct. 1972.
- FULLER, R. W. Serotonin receptors involved in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 215-219, 1996.
- GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Criação de matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 1. ed. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2005, p. 149-174.
- GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: BALDISSEROTTO B.; GOMES, L.C. (Eds). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2010, p. 149-167.
- HEYLIGER, S. O. et al. The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. **Pharmacological Research**, London, v. 38, n. 4, p. 243–250, Oct.,1998.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS, S. L.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2004.

HÖGLUND, E., BALM, P. H. M., WINBERG, S. Skin darkening, a potential social signal in subordinate Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 203, p. 1711-721, June 2000.

HÖGLUND, E. et al. Suppression of aggressive behavior in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, n. 1-4, p. 525-531, Sept. 2005.

HONCZARYK, A.O. Potencial da matrinxã *Brycon cephalus* na piscicultura da Amazônia. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL "AMAZÔNIA NO TERCEIRO MILÊNIO: Atitudes Desejáveis". 2000, **Resumos...** São Paulo: Associação Brasil SGI. CD-ROOM. 2000.

HOSEINI, S. M.; HOSSEINI, S. A. Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrech, v. 36, n. 4, p. 1061-1067, Dec. 2010.

HOSEINI et al. Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrech, v. 38, n. 5, p. 1419-1426, Oct. 2012.

HOSSEINI, S.A.; HOSEINI, S.M. Effect of Dietary Tryptophan on Stress Response of Wild Common Carp *Cyprinus carpio* L. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v.5, n.1, p. 49-55, 2013.

HSEU, J. R. et al. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1-4, p. 251-263, Mar. 2003.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. 3. ed. Jundiaí: Fernando Kubitza, 1999. 123p.

LEONARDO, A. F. G. et al. Canibalismo em larvas de matrinxã, *Brycon cephalus*, após imersão dos ovos à diferentes concentrações de triiodotironina (T<sub>3</sub>). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 231-239, 2008.

LEONARDO, A. F. G. et al. Improvement of matrinxã, *Brycon amazonicus*, larviculture by exposing eggs to triiodothyronine. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 44, n. 1, p. 141–147, Feb. 2013

LEPAGE, O. et al. Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant-subordinate relationship and aggression in rainbow-trout. **Hormones and Behavior**, New York, v. 48, n. 2, p. 233-242, Aug. 2005.

LEPAGE, O. et al. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Biology**, London, v. 206, p. 3589-3599, Oct. 2003.

- LEPAGE, O.; TOTTMAR, O.; WINBERG, S. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 205, p. 3679-3687, Dec. 2002.
- LILLESAAR, C. The serotonergic system in fish. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, n. 4, p. 294-308, July 2011
- LIM, L. C.; DHERT, P.; SORGELOOS, P. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 923-935, Sept. 2003.
- LIMA, A.O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1969, 653 p.
- LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: REIS, R.E.; KULANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (Orgs). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPURCS, 2003, p. 174-181.
- MARKUS, C. R. et al. The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 1536-1544, June 2000.
- MONTEDOR, A. P., GIMBO, R. Y., URBINATI, E. C. Dietary tryptophan mitigates the cortisol elevation during the stress of crowding in juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam (submitted).
- OLIVEIRA, S. R. **Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse de transporte do matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – INPA, Manaus, 2008.
- ØVERLI, Ø.; HARRIS, C.; WINBERG, S. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships of brain monoamines and cortisol in rainbow-trout. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v. 54, n. 5, p. 263-275, Nov. 1999.
- ØVERLI, Ø.; WINBERG, S.; POTTINGER, T.G. Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout – a review. **Integrative and Comparative Biology**, New York, v. 45, n. 3, p. 463-474, 2005.
- PERREAULT, H. A. N.; SEMSAR, K.; GODWIN, J. Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 79, n. 4-5, p. 719-724, 2003.

POTTINGER, T. G, PICKERING, A. D. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. **Journal of Fish Biology**, Oxford, UK, v. 41, n. 3, p. 435-447, Sept.1992.

SCHØYEN, H. F. et al. Effect of dietary bacterial protein or L-tryptophan supplementation on welfare and growth performance in silverfox. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, n. 1, p. 93-102, Mar. 2007.

SUMMERS, C.H.; WINBERG, S. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 209, p. 4581-4589, 2006.

TEJPAL, C. S. et al. Dietary supplementation of l-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 293, n.3-4, p. 272-277, Aug. 2009.

URBINATI, E. C. et al. Larval performance of matrinxã, *Brycon amazonicus*, after maternal triiodothyronine injection or egg immersion. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, n. 13, p. 1355-1359, Sept. 2008.

URBINATI, E. C. et al. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 229, n. 1-4, p. 389-400, Jan. 2004.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P. et al. (Eds). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: Editora TechArt, 2004, p. 171-194.

VAL, A. L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1995, 160 p.

WELD, et al. Effect of tryptophan treatment on self-biting and central nervous system serotonin metabolism in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 19, n. 4, p. 314-321, Oct. 1998.

WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, Bethesda, MD, v. 77, n. 3, p. 591-625, July 1997.

WINBERG, S. et al. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 113-116, July 1997.

WINBERG, S.; LEPAGE, O. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. **American Journal of Physiology**, Bethesda v. 274, n. 3, p. R645-R654, Mar. 1998.

WINBERG, S.; ØVERLI, Ø.; LEPAGE, O. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 204, p. 3867-3876, Nov. 2001.

WOLKERS, C.P.B. et al. Dietary L-tryptophan alters aggression in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 819-27, June 2012.

WOLKERS, C. P. B. et al. The time course of aggressive behavior in juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed with dietary L-tryptophan supplementation. **Journal of Fish Biology**, in press, 2013.