



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ZOOLOGIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA
RESPOSTA COMPORTAMENTAL DO CURIMBATÁ À
SUBSTÂNCIA DE ALARME**

JULIANE DE ABREU CAMPOS MACHADO LEUTZ

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO EGYDIO BARRETO

BOTUCATU – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Efeitos do enriquecimento ambiental na resposta comportamental
do curimatã à substância de alarme

JULIANE DE ABREU CAMPOS MACHADO LEUTZ

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO EGYDIO BARRETO

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Zoologia.

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Leutz, Juliane de Abreu Campos Machado.

Efeitos do enriquecimento ambiental na resposta
comportamental do Curimbatá à substância de alarme /
Juliane de Abreu Campos Machado Leutz. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Rodrigo Egydio Barreto
Capes: 20404000

1. Ecologia humana. 2. Homem - Influência do meio
ambiente. 3. Peixe - Pesquisa. 4. Avaliação de
comportamento. 5. Predação (Biologia). 6. Reflexo de
sobressalto. 7. Feromônios.

Palavras-chave: Enriquecimento ambiental; Pista química;
Resposta antipredatória; Substância de alarme.

“Seja a mudança que você deseja ver no mundo”

(Mahatma Gandhi)

Aos animais,

que possam usufruir dos resultados desta pesquisa.

Primeiramente agradeço a Deus por tantas bênçãos.

Agradeço aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, dando amor e conforto, ao meu marido Richard que mesmo na distância foi um porto seguro, minhas filhas peludinhas Lara e Lisa por serem meu descanso e meu filho Noah por me fazer mais forte.

Ao meu orientador, por ser uma pessoa ímpar, sempre presente, incentivando ao máximo e me ajudando a ser uma boa pesquisadora.

As amigas Vivian, Ana, Sílvia, Nicole, Laura e Maria Fernanda, por estarem sempre presente nos dias de cansaço dando força e incentivo.

Agradeço de todo coração a minha querida família de Botucatu, Rafaela, Bruno, Vanessa, Fernanda, Adriana, Clarissa, Graziela, Renata, Caroline, Marciano, Fábio, Isabela, Nina e Bruno Camargo, pela amizade, amor e cuidado (até demais) que tiveram ao longo da minha gravidez e após, quando não pude estar sempre presente, por fazerem do laboratório um lugar agradável deixando minha estadia em Botucatu mais leve, pelos ensinamentos, pelas milhares de dúvidas esclarecidas, pela doçura, pelas risadas, pelas horas a fio de discussões, pelas conversas, pelo carinho, pela ajuda no desenvolvimento deste projeto e por terem cuidado dos meus peixes quando eu não podia, nada disso teria sido realizado sem ajuda de vocês.

Agradeço a ajuda e presença dos professores Percília, Helton e Gilson, que foram fundamentais para meu crescimento profissional.

Por fim, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro a pesquisa e ao pessoal da pós graduação que estavam sempre dispostos a me ajudar.

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
Introdução	10
Objetivos.....	16
Materiais e métodos.....	17
Análises estatísticas	20
Nota Ética	21
Resultados.....	22
Discussão	26
Referências bibliográficas	29

Resumo

O impacto humano sobre o meio ambiente vem gerando diminuição da população de várias espécies em seus habitats naturais. Como solução, a reintrodução de espécies criadas em cativeiro vem sendo realizada como um meio de diminuir esse impacto. Porém, espécies criadas em cativeiro podem ter déficit comportamentais, gerada pela “domesticação” na criação, resultando em alta mortalidade na liberação na natureza. Isso devido em grande parte à predação, pois esses animais acabam não identificando, ou identificando tardiamente o predador. Aqui, testamos se curimbatás (*Prochilodus lineatus*) criados em tanques com enriquecimento ambiental identificam, através de pistas químicas, o risco de predação com mais eficiência do que os criados em tanques não enriquecidos, quando introduzidos em um ambiente novo. Para tal, criamos os animais em dois ambientes (enriquecidos ou não) e analisamos seu comportamento, através de filmagem, quando em contato com substância de alarme de um coespecífico, heterospecífico (odor controle) e o veículo. Como resultado foi observado que animais de ambiente enriquecido se mostram mais reativos a pistas químicas, aceitam melhor mudança ambiental e possuem uma melhor resposta antipredatória.

Palavras-chave: Pista química; Substância de alarme; Enriquecimento ambiental; Resposta antipredatória.

Abstract

The human impact on the environment has generated a decline in the population of several species in their natural habitats. Has a solution the reintroduction of cultivated species have been carried out as means to reduce this impact. However, behavioral deficits are caused in cultivated species by the process of “domestication”, resulting in high mortality when they are released in nature, due to impairment on dealing with predators. Here, we examined if curimbatás (*Prochilodus lineatus*) raised in ponds with environmental enrichment identified predation risk through chemical alarm cues more efficiently than those created in non-enriched tanks. For this, we have reared the animals in two environments (enriched or non-enriched), analyzing their behavior through videos recordings, that were exposed to alarm substances of a conspecific, heterospecific (odor control) and the vehicle. As a result, it was observed that enriched environment animals are more reactive to chemical cue, accept better environmental change and have a foremost antipredator response.

Keywords: Chemical cue; Alarm substance; Environmental enrichment; Antipredator response.

Introdução

O ambiente vem sendo significativamente impactado pelos seres humanos. Essa interferência humana tem sido associada a uma redução severa na biodiversidade (Lévêque et al., 2008). Em relação à fauna, uma das tentativas de lidar com tal problema é a realização de programas de reintrodução de espécies que sofreram redução populacional, algo dependente da criação em cativeiro para restaurar essas espécies em risco (Seddon et al., 2007). A criação em cativeiro, no entanto, pode resultar em ‘domesticação’, ou seja, a adaptação dos organismos ao ambiente de cultivo. O ambiente de cultivo é obviamente menos complexo que o ambiente natural, dessa forma existe uma alta previsibilidade das situações, gerando uma condição de ‘monotonia’ e muitas vezes estressante, diminuindo, por exemplo, as habilidades cognitivas dos animais (Salvanes et al., 2013), as alterações podem ir além de uma mera simplificação do repertório comportamental, levando ao desenvolvimento de comportamentos mal adaptativos; o que, de fato, tem sido reconhecido como uma das principais deficiências geradas por essas condições inerentes à criação artificial de animais (Dawkins, 2003; Huntingford et al., 2005). Isso acontece pois os locais de alojamento podem ser demasiadamente simples, as condições de criação extremamente uniformes e as fontes alimentares serem previsíveis e bem localizadas, gerando déficit de experiências do animal (o que representa o oposto da condição natural), promovendo portanto alterações comportamentais (Huntingford, 2004). Além disso, considerando peixes criados em aquiculturas, esses podem ter cérebros menores e habilidades cognitivas reduzidas em relação aos coespecíficos selvagens (Marchetti et al., 2003; Kihlslinger et al., 2006). Em comparação com os indivíduos selvagens, animais de cativeiro muitas vezes forrageiam de forma menos eficiente (Ellis et al., 1998; Sol et al., 2002), são malsucedidos em localizar e competir por territórios com boa qualidade de recursos (Deverill et al., 1999; Mathews et al., 2005) e levam mais tempo para detectar e evitar predadores (Griffin et al.,

2000; Seddon et al., 2007; Alvarez et al., 2003), gerando, por sua vez, excessiva mortalidade dos indivíduos reintroduzidos (Koolhaas et al., 1999; Fischer et al., 2000; Armstrong et al., 2007; Garner, 2005). Uma das consequências desse processo é que os animais de cativeiro podem ser inaptos para sobreviver na natureza (Olla et al., 1994; Brown et al., 2002).

Durante as interações no sistema presa-predador, a habilidade de reconhecer antecipadamente a ameaça de um predador em potencial tem papel fundamental na sobrevivência da presa para qualquer espécie animal (Endler, 1986). A detecção precoce da presença de um predador pode ser considerada o primeiro passo do mecanismo anti-predatório, pois permite que a presa tome medidas para se livrar da ameaça. Isso não é diferente para os sistemas aquáticos, nos quais as presas avaliam o risco de predação utilizando-se de indicadores ambientais. Tais indicadores estão diretamente associados ao sistema sensorial desses animais, sendo comumente estímulos visuais (Barreto et al., 2003), elétricos (Franchina et al., 1998) ou químicos (Giaquinto et al., 2001; Ide et al., 2003; Barreto et al., 2010, 2012, 2013 e 2014; Barbosa et al., 2010). No caso dos sinais químicos, esses são uma rica fonte de informações sobre o ambiente, especialmente em ambientes aquáticos, onde a água facilita a dispersão de pistas químicas (Liley, 1982; Wisenden et al., 1997). Além disso, são extremamente úteis em ambientes de visibilidade limitada, devido à turbidez ou baixa luminosidade, ou mesmo quando o organismo possui visão pouco desenvolvida (Wisenden, 2000). Considerando-se tais sinais químicos as presas podem ser alertadas, indiretamente, por um coespecífico (Chivers et al., 1998) ou podem detectar diretamente a presença de um predador (Kats et al., 1998). Indiretamente, no caso de alguns peixes, durante o ataque e captura de uma presa por um predador, alguns fatores químicos são liberados na água devido a traumas físicos da epiderme da presa (Pfeiffer, 1977; Wisenden, 2000; Barreto et al., 2010; Barbosa et al., 2010) ou mesmo pela liberação de sangue na água (Barreto et al., 2013). Tais fatores

químicos oriundos da pele lesada informam às presas em potencial que um predador está forrageando naquele determinado momento, sendo, portanto, denominados substâncias de alarme (Wisenden, 2000). Assim, quando outros indivíduos detectam a presença da substância na água, imediatamente deflagram resposta anti-predatória, a reação de alarme (Chivers et al., 1998). É suposto que as substâncias de alarme podem estar presentes em células epidérmicas especializadas, denominadas células 'club', sendo liberadas somente quando a pele do peixe é lesada, já que nas células que estão distribuídas ao longo da pele não há acesso à superfície externa do corpo (Pfeiffer, 1977; Smith, 2000). As substâncias de alarme são características presentes em peixes da Superordem Ostariophysi, um grupo que contém cerca de 65% de todos os peixes de água doce (Nelson, 1984). Contudo, alguns exemplos têm sido também observados em peixes acantopterígeos, como por exemplo, nas famílias Gobiidae (Smith, 1989; Smith et al., 1991; Barreto et al., 2014) e Cichlidae (Wisenden et al., 1997; Brown et al., 2004; Foam et al., 2005; Barreto et al., 2007c; Barreto et al., 2010). Embora menos frequentemente estudado, peixes com a pele não lesada, mas estressados, também são capazes de alertarem coespecíficos por pistas químicas (Chivers et al., 1998; Jordão et al., 2000). Em peixes ostariofisianos a detecção de substâncias de alarme de um coespecífico podem desencadear reações de alarme ou respostas comportamentais antipredatórias (Pfeiffer, 1977; Pandey, 1984; Chivers et al., 1998). Essas respostas podem incluir natação desordenada (dashes), congelamento postural ("freezing"), diminuição da atividade de natação, modulação da frequência ventilatória, entre outras; dependendo do contexto e a espécie de peixe envolvida (Giaquinto et al., 2001, Ide et al., 2003, Barreto et al., 2010, 2012, 2013 e 2014). Em peixes não ostariofisianos, a resposta de alarme ao extrato de pele de coespecífico apresenta diferentes padrões comportamentais. Como observado nos ciclídeos, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Barreto et al., 2007c; Barreto et al., 2010) e acará-do-Congo (*Amatitlania nigrofasciata*)

(Wisenden et al., 1997; Brown et al., 2004; Foam et al., 2005), quando em pares, exibem intensa interação agressiva, comportamento comum em ciclídeos, mas que diminui drasticamente em resposta a substância de alarme. Essas espécies também diminuem a atividade natatória frente à substância de alarme. A tilápia, ainda, aumenta a frequência ventilatória em resposta a essa substância (Barreto et al., 2010), assim como para outros estímulos estressantes e/ou de alerta (Barreto et al., 2004, 2006). Então a identificação precoce de predadores aumenta o sucesso dos programas de reintrodução.

Os recentes avanços nos programas da reintrodução têm defendido o uso de enriquecimento do ambiente de cultivo antes da liberação de animais na natureza (Maran et al., 2009). No entanto, o uso de enriquecimento ambiental para avaliar como os animais lidam com predadores (ex-situ) de taxa que não são mamíferos é muito limitado (Alberts, 2007). Entre os peixes, o enriquecimento ambiental tem demonstrado melhorar a eficiência de forrageamento (Brown, 2003) e melhorar comportamentos exploratórios (Berejikian et al., 2001; Braithwaite et al., 2005; Lee et al., 2008), o que também poderia aumentar a sobrevivência pós-liberação, mas a aplicação de enriquecimento na conservação de peixes ainda é relativamente rara. Assim, embora pareça ser considerável a possibilidade de aumentar a sobrevivência após a liberação pelo uso de enriquecimento ambiental pré-lançamento, não é claro se o benefício dessa prática pode ser ampliado para juvenis cultivados em termos de responder a pistas ambientais de predadores. Animais criados em ambientes de cativeiro com alta variedade de elementos e configurações espaciais apresentam maior habilidade de aprendizado comparado com animais criados em ambientes não enriquecidos (Lapchik et al. 2009). O objetivo do enriquecimento seria diminuir os comportamentos anormais e aumentar repertório de comportamentos específicos da espécie em questão (Lapchik et al., 2009). De fato, tem sido relatado que o enriquecimento proporciona um ambiente rico em estimulação sensorial, que aumenta o controle das atividades por parte dos animais e melhora o

contexto social e ambiente dos mesmos (Lapchik et al., 2009). O Enriquecimento Ambiental é classificado em cinco grupos: Físico, Sensorial, Cognitivo, Social e Alimentar (Silva, 2011). O Físico consiste em acrescentar estruturas como substrato, folhas, vegetações, entre outros; o sensorial consiste em estimular os sentidos dos animais, como o paladar dos alimentos, texturas, odores, exposição de sons entre outros, o cognitivo consiste em oferecer um problema para que o animal o solucione; o social consiste na interação inter ou intraespecífica; e o enriquecimento alimentar consiste na manipulação da forma que o alimento é oferecido. No ambiente natural, o animal precisa realizar várias funções, que por sua vez moldam os sistemas fisiológicos dos organismos, especialmente o sistema nervoso e o endócrino que atuam na organização de inúmeros comportamentos, como a busca por alimentos, interação com animais da mesma espécie, reprodução e defesa contra predadores (Silva, 2011). A formação e desenvolvimento neuronal dependem de estímulos que os animais adquirem em épocas específicas da vida e de fato há uma correlação positiva entre complexidade do ambiente e desenvolvimento do sistema nervoso; consequentemente, influenciando de maneira positiva o desenvolvimento das habilidades cognitivas (Strand et al., 2010; Salvenes et al., 2013). Por isso pode ser de grande relevância para animais de cultivo o desafio ambiental proporcionado pelo enriquecimento. Assim, propiciando desenvolvimentos neural, anatômico e de outros sistemas fisiológicos adequado. Neste estudo, nós nos atemos ao enriquecimento estrutural do ambiente de estoque, ou seja, o aumento da complexidade estrutural do ambiente. De fato, já existem relatos dos efeitos significativos do enriquecimento estrutural no comportamento de peixes (Kadry et al., 2010; Barreto et al., 2011; Torrezani et al., 2013). E dentro desse paradigma, focamos aqui na avaliação do enriquecimento ambiental em elementos do sistema presa-predador em peixes e usar-se-á como modelo experimental o peixe curimatá (*Prochilodus lineatus*). O Curimatá também conhecido como papa-terra ou Curimatã, pertence a família Prochilodontidae, o

que significa que possui dentes na frente. Apresenta corpo fusiforme e comprido com escamas relativamente grandes e hábito alimentar detritívoro. É originário da região sudeste e tem preferência por ambientes lóticos, em locais com águas lentas, pois há uma grande quantidade de detritos (Silva, 2007). Essa espécie é nativa da região neotropical e tem sido alvo de programas de reintrodução devido à diminuição de suas populações naturais.

Objetivos

Em resumo das evidências acima, ou seja, considerando as premissas a seguir:

- 1 – Os animais cultivados têm menor taxa de sobrevivência após reintrodução na natureza,
- 2 – Os animais de cativeiro têm as habilidades comportamentais diminuídas, especialmente para lidar com predadores;
- 3 – O enriquecimento do ambiente melhora as habilidades comportamentais dos animais e
- 4 – Uma das maneiras de lidar com predadores é perceber pistas químicas (p.ex. substância de alarme) que indicam risco de ataque do predador e responder adequadamente;

Tem-se como objetivo teórico avaliar os efeitos do enriquecimento estrutural do ambiente de estoque do curimatá em seu desempenho comportamental quando exposto à substância de alarme, analisando se animais criados em ambiente enriquecido melhoram o comportamento antipredatório quando em contato com a substância de alarme.

Materiais e métodos

Peixes

Foram utilizados 36 alevinos (~12 cm e ~7 g) de curimbatás (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837) adquiridos em piscicultura, que foram aclimatados por 25 dias em tanques indoor de 1000 L (densidade de estoque de 1,0 g/L de água) antes dos experimentos. A água dos tanques foi mantida em torno de 28 °C, com filtro biológico e renovação constante para evitar acúmulo de amônia e nitrito. O fotoperíodo foi de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, com iluminação provida por lâmpada fluorescente (tipo luz do dia). Os animais foram alimentados 1 vez ao dia com ração comercial (36% de proteína) em excesso.

Estratégia Experimental

A estratégia básica foi avaliar o comportamento defensivo induzido pela substância de alarme em curimbatás oriundos de ambientes enriquecido ou não enriquecido e que foram introduzidos em um ambiente novo (Figura 1). Como substância de alarme, usamos (1) extrato de pele de coespecíficos. Como controles dessa condição, usamos (2) extrato de pele de heteroespecífico, no caso a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* – Super-ordem Acanthopterygii) por ser filogeneticamente distante dos Curimbatás (Super-ordem Ostariophysi), portanto, deve provavelmente possuir uma substância diferente dos curimbatás. Por fim, usamos (3) água destilada (veículo do extrato), para controlar os procedimentos laboratoriais. Assim, totalizamos 6 condições experimentais de tamanho amostral $n = 6$ peixes cada. Para isso, peixes provenientes da população de estoque foram aleatoriamente escolhidos e alojados em dois tanques de 310 L, um enriquecido com a planta aquática elódea (*Egeria densa*) e substrato e outro que não possuía esses

artefatos (não enriquecido). Após 30 dias, indivíduos vindos dessas diferentes condições de enriquecimento foram colocados individualmente em aquários de vidro (40 x 24 x 23 cm; 22 L de água) para observação do comportamento defensivo. Após 4 dias, observamos o comportamento dos animais por 5 mim (linha basal), em seguida injetamos na água 2 mL de algum dos 3 estímulos químicos supramencionados e observamos o comportamento por mais 5 mim.

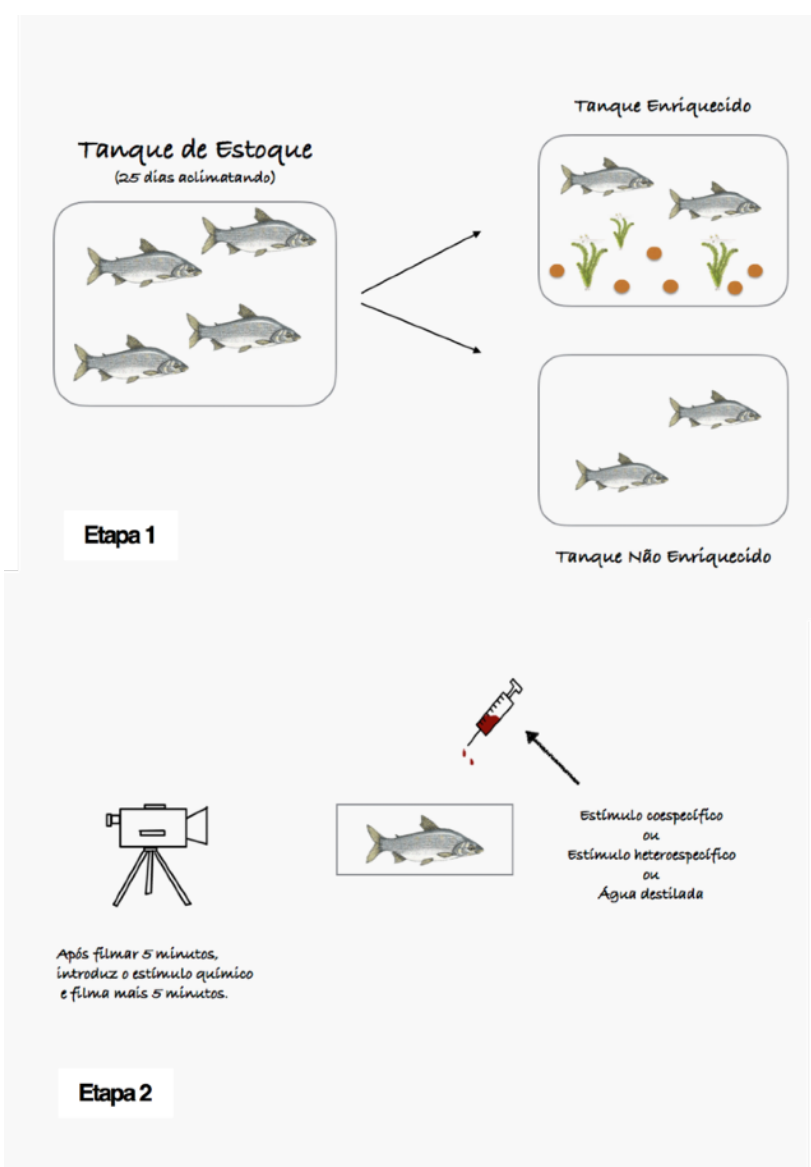


Figura 1 – Delineamento do estudo.

Substância de alarme

O extrato de pele foi preparado de acordo com Barreto et al. (2010). Para tal, utilizamos 2 peixes doadores de cada espécie (curimatá e tilápia-do-Nilo) do mesmo tamanho e peso aproximadamente similar, que foram sacrificados por secção da medula espinhal sem utilização de anestésico (para evitar interferência química). Três incisões bem superficiais foram feitas na pele dos animais ao longo do eixo longitudinal de cada lado do corpo, com cuidado para evitar o corte da musculatura ou vísceras. Em seguida os peixes foram colocados em béquer com 500 ml de água destilada e vagarosamente agitados por 5 min. O líquido resultante foi filtrado com papel de filtro (100% fibras celulósicas), para remover fragmentos remanescentes de tecido. A solução resultante foi armazenada em tubos falcon de 50 ml e congelados (-20 °C) até requeridos para o experimento. No dia do experimento, 2 ml de substância de alarme foi injetado cuidadosamente na superfície da água através de um cano (~ 0,5 cm de diâmetro) de silicone localizado no lado superior de cada aquário. Para evitar contato visual com o animal no dia do experimento uma cortina foi inserida atrás dos aquários (Figura 2).



Figura 2 – Aparatos experimentais.

Quantificação do comportamento

A avaliação comportamental foi realizada por meio de filmagens (10 minutos – 5 min antes e após a injeção de algum estímulo químico na água dos aquários). A atividade natatória foi avaliada pela técnica da quantificação da mudança de quadrantes (Barreto et al., 2010). No aquário foram traçados oito quadrantes idênticos. A atividade natatória foi estimada pelo número de vezes que os mesmos mudavam de quadrante. Na mesma análise foi possível analisar também a presença na superfície e no fundo (atividades relacionadas com comportamento de defesa) (Barbosa et al., 2009). Outra variável indicativa de resposta antipredatória analisada foi a quantidade de dashes. Esse comportamento defensivo é caracterizado pela natação rápida e desordenada de um lado para o outro do aquário, ou na coluna d'água (Giaquinto et al., 2001). A última resposta defensiva analisada foi o congelamento postural (freezing), onde o animal ao identificar uma situação de perigo apresenta imobilidade (Barbosa et al., 2009).

Análises estatísticas

Os dados foram analisados inicialmente quanto à presença de outliers, os quais, quando detectados, foram excluídos do modelo por serem valores raros na amostra, correspondendo a um valor maior do que dois desvios padrões. Após essa prospecção, avaliamos a normalidade e a homoscedasticidade dos dados. Como tais premissas foram atendidas, conduzimos análises paramétricas dos dados. No caso da atividade locomotora (mudança de quadrantes) e presença no fundo ou superfície utilizamos uma ANOVA de 3 fatores com medidas repetidas, onde a pista química e o enriquecimento eram os fatores independentes e o tempo (antes e depois da apresentação do estímulo

químico) foi a medida repetida. No caso do freezing e do dashes utilizamos uma ANOVA de 2 fatores, onde tínhamos apenas os fatores independentes citados anteriormente, sem o tempo. Quando necessário a ANOVA foi complementada por teste de Newman-Keuls. O teste de proporção de Goodmann foi também usado para a análise do número de animais que realizaram dashes. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Nota Ética

Essa tese de mestrado foi realizada sob os princípios éticos de pesquisa animal, seguindo o protocolo para experimentação com uso de animais do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), pelo protocolo de número 697.

Resultados

Considerando as mudanças de quadrantes, identificamos efeito do enriquecimento (ANOVA; $F(1;30) = 4,704$; $p = 0,038$) e do tempo (ANOVA; $F(1;30) = 4,620$; $p = 0,039$), embora esse último efeito seja de difícil interpretação e não foi considerado aqui. Nesse caso, observamos que os peixes do ambiente não enriquecido tiveram uma movimentação maior que os peixes do ambiente enriquecido (Figura 3). As pistas químicas, contudo, não afetaram a mudança de quadrante (ANOVA; $F(1;30) = 0,096$; $p = 0,908$). Além disso, não ocorreu interação entre os efeitos desses 3 fatores (ANOVA; $F(2;30) = 0,148$; $p = 0,864$).

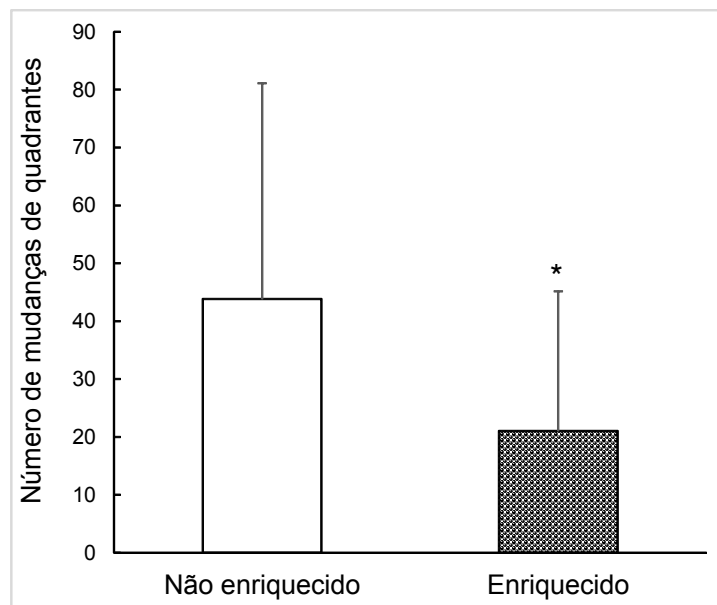


Figura 3 – Efeitos do enriquecimento do ambiente de estoque na movimentação de curimatás expostos à substância de alarme. Encontramos efeito significativo (*) do enriquecimento do ambiente na movimentação dos peixes (ANOVA; $F(1;30) = 4,704$; $p = 0,038$; $n = 18$ (pooled)).

A análise da presença no fundo também teve efeito apenas do enriquecimento (ANOVA; $F(1;30) = 8,667$; $p = 0,006$), sem alteração em relação às pistas químicas (ANOVA; $F(1;30) = 0,786$; $p = 0,464$) ou ao tempo (ANOVA; $F(1;30) = 0,636$; $p = 0,431$). Além disso, não houve interação significativa entre os efeitos do enriquecimento, pista química e tempo (ANOVA; $F(2;30) = 1,166$; $p = 0,325$). Os animais do ambiente não enriquecido ficaram por mais tempo no fundo do que os peixes do ambiente enriquecido (Figura 4).

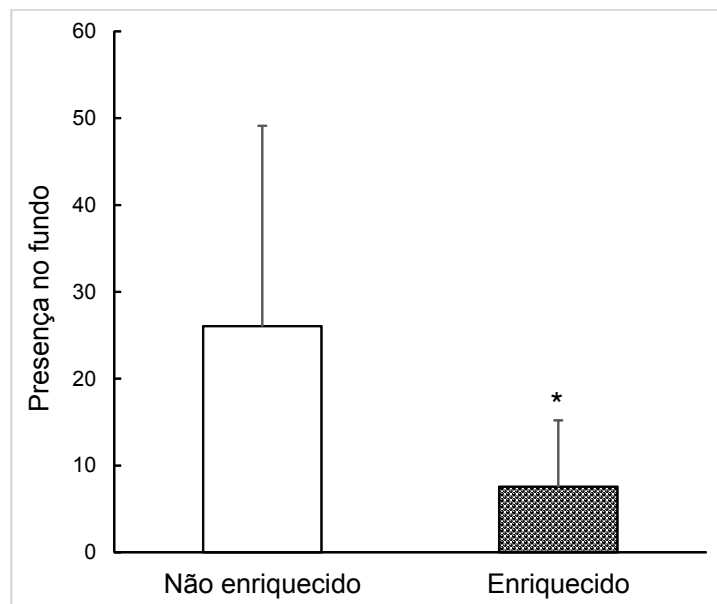


Figura 4 – Efeitos do enriquecimento do ambiente de estoque na frequência de visitas no fundo do aquário em curimbatás expostos à substância de alarme. Encontramos efeito significativo (*) do enriquecimento do ambiente na presença no fundo observada nos peixes (ANOVA; $F(1;30) = 8,667$; $p = 0,006$; $n = 18$ (pooled)).

O tempo de superfície não foi afetado pela pista química (ANOVA; $F = 0,100$; $p = 0,904$) enriquecimento (ANOVA; $F(1;30) = 0,818$; $p = 0,372$) ou tempo (ANOVA; $F(1;30) = 0,636$; $p = 0,431$). Esses fatores também não mostraram interação significativa entre si (ANOVA; $F(2;30) = 0,634$; $p = 0,538$). O freezing teve efeito do enriquecimento (ANOVA; $F(1;30) = 13,965$; $p = 0,0007$) e das pista químicas (ANOVA; $F(2;30) = 3,620$; $p = 0,039$), mas tais efeitos foram independentes, pois não houve interação significativa entre esses 2 fatores (ANOVA; $F(2;30) = 1,551$; $p = 0,228$). Os peixes oriundos do ambiente enriquecido, quando expostos à substância de alarme (de co- ou heteroespecífico), apresentaram comportamento de freezing em quantidade maior que os peixes do ambiente não enriquecido (independente da pista química) e aos expostos à água destilada (Figura 5).

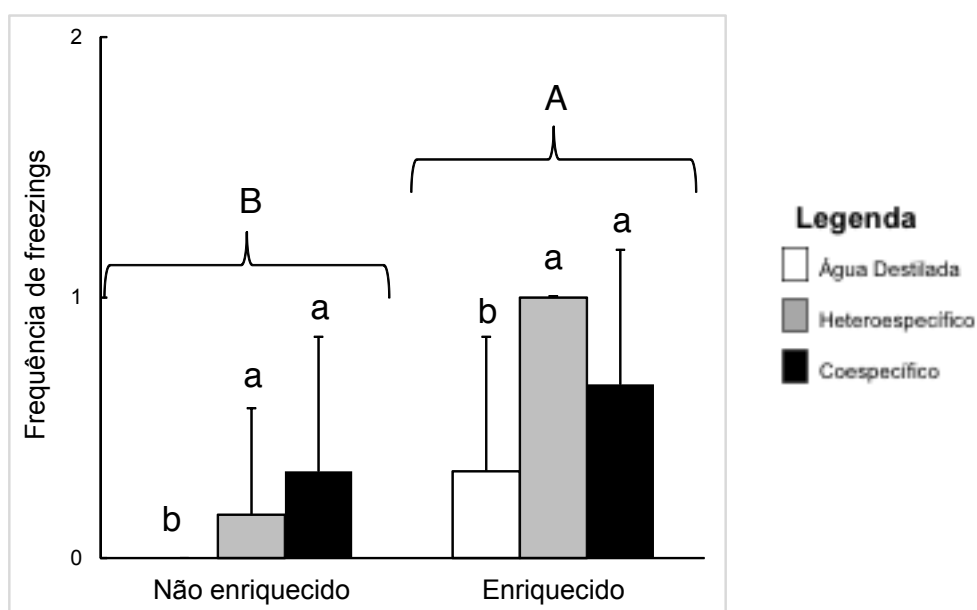


Figura 5 – Efeitos do enriquecimento do ambiente de estoque na frequência freezings em curimatás expostos à substância de alarme. Encontramos, independentemente, efeito significativo tanto do enriquecimento do ambiente (ANOVA; $F(1;30) = 13,965$; $p = 0,0007$; $n = 18$ (pooled)) quanto da pista química (ANOVA; $F(2;30) = 3,620$; $p = 0,039$; $n = 12$ (pooled)). Letras maiúsculas comparam os dados agrupados das condições de enriquecimento e as minúsculas os dados agrupados das pistas químicas. Em ambos os casos letras diferentes denotam diferenças estatísticas significativas.

Por último, a ocorrência de dashes teve efeito do enriquecimento (ANOVA; $F(1;30) = 5,000$; $p = 0,032$; Figura 6), sem alteração em relação às pistas químicas (ANOVA; $F(1;30) = 1,250$; $p = 0,301$) ou interação entre esses fatores (ANOVA; $F(1;30) = 1,250$; $p = 0,301$), onde os peixes do ambiente enriquecido apresentaram o comportamento de dashes em quantidade maior que o não enriquecido. Para entendermos o significado disso, complementarmente a ANOVA, fizemos análise de proporção de peixes reativos a pistas químicas e que exibiram dashes. Constatamos que apenas os animais expostos a uma pista química de co- ou heterospecífico oriundos do ambiente enriquecido de estoque apresentaram dashes (4 animais em 12; 2 animais de cada pista química) comparado com os animais de qualquer ambiente expostos à água destilada ou à pistas químicas, mas oriundos do ambiente não enriquecido (0 animais em 24). Essas proporções são estatisticamente diferentes (Teste de Goodman; Entre multinomiais; $G_{\text{calculado}} = 2,45 > G_{\text{crítico}} = 2,39$, logo $P < 0,05$).

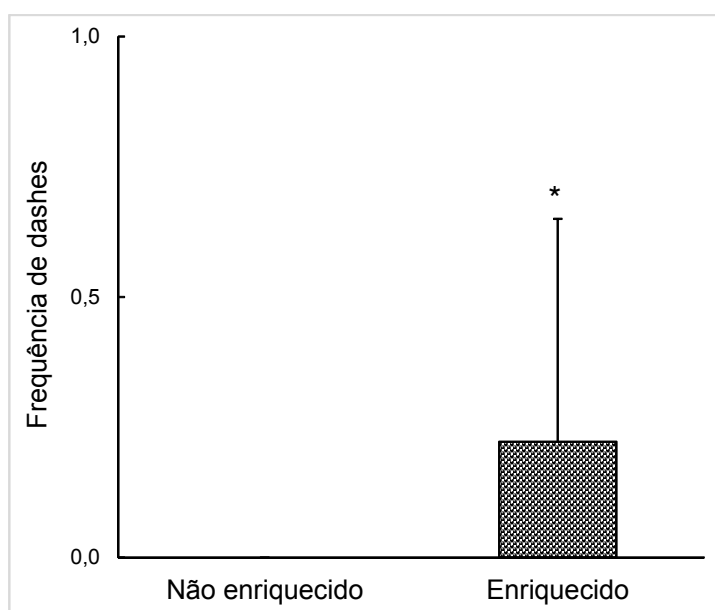


Figura 6 – Efeitos do enriquecimento do ambiente de estoque na frequência de dashes em curimatás expostos à substância de alarme. Encontramos efeito significativo (*) do enriquecimento do ambiente na frequência de dashes observada nos peixes (ANOVA; $F(1;30) = 5,000$; $p = 0,032$; $n = 18$ (pooled)).

Discussão

O enriquecimento estrutural do ambiente afetou o comportamento defensivo em curimatás introduzidos em ambiente novo. Animais expostos previamente ao enriquecimento ambiental apresentaram menor atividade no ambiente novo e apresentaram resposta defensiva a pistas químicas tanto de coespecífico, quanto de heteroespecífico. Os animais vindos do ambiente não enriquecido apresentaram resposta defensiva contínua sem o contexto do risco de predação. Essa conclusão decorre da manutenção de aumento da atividade natatória, mas principalmente por se manterem a maior parte do tempo próximo ao fundo, uma típica resposta defensiva (Speedie et al., 2008).

Em relação às respostas defensivas dos curimatás oriundos do ambiente enriquecido, observamos que eles não distinguiram a pista química de coespecífico da de heteroespecífico, indicando uma resposta inespecífica e generalizada a alguma substância de alarme. Metodologicamente, usa-se uma pista química de heteroespecífico filogeneticamente distante do peixe foco do estudo para controlar a resposta à presença de qualquer novo odor na água (Larson et al., 2005; Manassa et al., 2013). Quando se obtém resposta exclusiva à pista do coespecífico, ou seja, a pista do heteroespecífico é ignorada ou induz uma resposta não defensiva (por exemplo, estimula a alimentação – Sanches et al., 2015) conclui-se que há especificidade do odor (Larson et al., 2005; Manassa et al., 2013). Aqui não temos como distinguir se as pistas químicas são as mesmas, apesar da distância filogenética dos peixes, pois não se sabe qual (ou quais) molécula(s) é a substância de alarme, além de ser necessário utilizar outros químicos oriundos de heteroespecíficos diferentes do usado aqui e observar se os curimatás são reativos a estas ou não.

Em relação ao curimbatá, essa análise inicial indica que o uso de enriquecimento na criação desses animais em cativeiro é válida. O primeiro motivo para sustentar essa alegação é a menor atividade natatória no ambiente novo e a não utilização prioritariamente do fundo, o que representaria a manutenção de uma postura defensiva (Ide et al., 2003; Barreto et al., 2010 e 2013). Em um ambiente novo o animal precisará obviamente se defender, mas outras demandas existirão. Além disso, o gasto energético será maior ao se responder com atividade natatória elevada, o que pode representar um agravante, pois pode levar a redução da energia disponível para outras atividades necessárias no momento da liberação na natureza. Dessa forma, assumimos que os animais oriundos do ambiente enriquecido aceitaram melhor a mudança de ambiente. Em relação ao comportamento defensivo, o enriquecimento do ambiente de estoque impactou positivamente o curimbatá. Isso por que os peixes oriundos de local enriquecido se mostraram mais reativos a pistas químicas que indicam risco de predação, mesmo não apresentando especificidade de resposta. Os curimbatás, uma vez introduzidos em um ambiente novo, ao responder a uma substância de alarme, ao se depararem com alguma, pode, certamente, ser um comportamento assumido como adaptativo, visto que vai aumentar a probabilidade de sobreviver no ambiente.

Os animais oriundos do ambiente enriquecido foram mais propensos a exibirem dashes e freezings ao perceberem alguma substância de alarme. A resposta denominada dash representa uma atividade similar a um nado em fuga. Em um aquário experimental os animais nadam de um alado a outro, pois estão confinados, mas, no ambiente, isso representaria natação rápida em direção oposta à fonte da pista química de alarme, ou seja, uma manobra defensiva de fuga (Giaquinto et al., 2001). Além disso, somado ao nado em fuga, episódios de freezings também representam uma importante resposta defensiva. Esse comportamento representa exibir congelamento postural (Lawrence et al., 1989) e isso é considerado positivo ao lidar com predadores, pois estes costumam utilizar

os movimentos das presas para localizá-las no ambiente (Lima et al., 1990; Burrows 1994; Burrows et al., 1995). Assim, em dado contexto, exibir imobilidade representa desmotivar o predador a atacar, pois dificultará a tarefa do mesmo em localizar a presa no ambiente. Assim, o enriquecimento do ambiente de estoque reforça os componentes freezing e dash do comportamento defensivo em resposta a substância de alarme no curimbatá.

Em síntese, podemos concluir que o enriquecimento do ambiente de estoque pode representar uma possibilidade para garantir o desenvolvimento de alguns comportamentos defensivos do curimbatá quando liberado em ambiente novo. O presente estudo representa um ponto inicial, obviamente, pois foi realizado em microescala (laboratório) e tal constatação deve ser mostrada futuramente em escalas maiores (p.ex. criação intensiva), com liberação real no ambiente para confirmar a efetividade dessa prática como um processo tecnológico viável, somado à análises financeiras do mesmo.

Referências bibliográficas

1. Alberts AC. Behavioral considerations of headstarting as a conservation strategy for endangered Caribbean rock iguanas. *Appl Anim Behavi Sci* 2007; 102: 380–391.
2. Alvarez D, Nicieza AG. Predator avoidance behavior in wild and hatcheryreared brown trout: the role of experience and domestication. *J Fish Biol* 2003; 63:1565-1577.
3. Armstrong DP, Seddon PJ. Directions in reintroduction biology. *Trends Ecol. Evol* 2007; 23:20–25.
4. Barbosa A, Hoffman A. Involvement of serotonergic system in the alarm reaction in Piauçu fish (*Leporinus macrocephalus*). In: XXVII Encontro Anual de Etologia, 2009, Bonito.
5. Barbosa A, Magalhaes EJ, Hoffmann A, Ide LM. Conspecific and heterospecific alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*. *Acta Etholog* 2010; 13:119-126.
6. Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behav Process* 2003; 60:235-239
7. Barreto RE, Volpato GL. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. *Behav. Process* 2004; 66:43-51.
8. Barreto RE, Volpato GL. Ventilatory frequency of Nile tilapia subjected to different stressors. *J Exp Anim Sci* 2006a; 43:189–196.
9. Barreto RE, Hoffmann A. Behavioural responses to conspecific skin extract in the Nile tilapia. *Comp Biochem Physiol A - Molec Integrat Physiol* 2007c 148, Suppl 1, S38.
10. Barreto RE, Barbosa A, Giassi ACC, Hoffmann A. The 'club' cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. *Mar Freshwater Behav Physiol* 2010; 43:75-81.
11. Barreto RE, Arantes GGC, Volpato GL. The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment. *Zoology (Jena)* 2011; 114:53-57.
12. Barreto RE, Barbosa A, Hoffmann A. Ventilatory responses to skin extract in catfish. *Aquat Biol* 2012; 15 (3): 205-214.
13. Barreto RE, Miyai CA, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL. Blood Cues Induce Antipredator Behavior in Nile Tilapia Conspecifics. *Plos One* 2013; 8(1), e54642.
14. Barreto RE, Barbosa A, Urbinati EC, Hofmann A. Cortisol influences the antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the frillfin goby. *Horm Behav* 2014; p. 394-400.
15. Berejikian BA, Tezak EP, Riley SC, Larae AL. Competitive ability and social behavior of juveniles steelhead reared in enriched and convetional hatchery tanks and a stream enviroment. *J Fish Biol* 2001; 59:1600-1613.
16. Braithwaite VA, Salvanes, AGV. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild populations. *Proceeding of the Royal Society of London. Biol Sci* 2005; 272:1107–1113.

17. Brown C, Day RL. The future of stock enhancements: lesson for hatchery practice from conservation biology. *Fish Fish* 2002; (Oxf) 3: 79-94.
18. Brown GE. Learning about danger: chemical alarm cues and local risk assessment in prey fishes. *Fish Fish* 2003; (Oxf) 4:227–234.
19. Brown GE, Foam PE, Cowell HE, Fiore PG, Chivers DP. Production of chemical alarm cues in convict cichlids: the effects of diet, body condition and ontogeny. *Ann. Zool Fennici* 2004; 41, 487-499.
20. Burrows MT. An optimal foraging and migration model for juvenile plaice. *Evol Ecol* 1994; 8:125-149.
21. Burrows MT, Gibson RN. The effects of food, predation risk and endogenous rhythmicity on the behavior of juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Anim Behav.* 1995; 50:41-52.
22. Chivers DP, Smith RJF. Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. *Ecoscience* 1998; 5:338-352.
23. Dawkins MS. Behaviour as a tool in the assessment of animal welfare. *Zoology* 2003; 106:383–387.
24. Deverill JL, Adams CE, Bean CW. Prior residence, aggression and territory acquisition in hatchery-reared and wild brown trout. *Jornal of Fish Biology* 1999; 55:868-875.
25. Ellis T, Nash RDM. Predation on wild-0-group flatfishes by released and wild turbot (*Scophthalmus maximus*). In: Stocking and introduction of fish. *Fish Fishing News Books Oxford* 1998. pp. 319-326.
26. Endler JA. Defense against predators, In: (Eds.) Feder, ME, Lauder, GV, *Predator-prey relationships: Perspectives and approaches from the study of lower vertebrates*. University of Chicago, New York 1986. pp. 109-134.
27. Fischer J, Lindenmayer DB. An assessment of the published results of animal relocation. *Biol Conserv* 2000; 96: 1-11.
28. Foam PE, Mirza RS, Chivers DP, Brown GE. Juvenile convict cichlids (*Archocentrus nigrofasciatus*) allocate foraging and antipredator behaviour in response to temporal variation in predation risk. *Behav* 2005; 142:129-144.
29. Franchina CR, Stoddard PK. Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*-I. Quantification of day-night changes. *J Comp Physiol A- Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 1998;183:759-768.
30. Garner JP. Stereotypes and other abnormal repetitive behaviors: potential impacts of validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR Journal* 2005; 46:106-117.
31. Giaquinto PC, Volpato GL. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behav* 2001; 138: 1205-1214.
32. Griffin AS, Blumstein DT, Evans CS. Training captive-bred or translocated animals to avoid predators. *Conserv Biol* 2000; 14: 1317–1326.
33. Huntingford F. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *J Fish Biol* 2004; 65:122–142.

34. Huntingford F, Adams C. Behavioural syndromes in farmed fish: implications for production and welfare. *Behav* 2005; 142:1207–1221.
35. Ide LM, Urbinati EC, Hoffmann A. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *J Fish Biol* 2003; 63: 332-343.
36. Jordao LC, Volpato GL. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behav* 2000; 137:681-690.
37. Kadry VO, Barreto RE. Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid (*Geophagus brasiliensis*) during resident-intruder interactions. *Neotropical Ichthyology* 2010; 8:329-332.
38. Kats LB, Dill LM. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 1998; 5, 361-394.
39. Kihlslinger RL, Nevitt GA. Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *J Exp Biol* 2006; 209, 504–509.
40. Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 1999, 23: 925-935.
41. Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Enriquecimento ambiental, In: (Eds.) Mattaraia GMV, Cuidados e manejo de animais de laboratório. Atheneu, São Paulo; 2009. pp.537- 547.
42. Larson JK, McCormick MI. The role of chemical alarm signals in facilitating learned recognition of novel chemical cues in a coral reef fish. *Anim Behav* 2005; 69:51-57.
43. Lawrence BJ, Smith RJ. Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance. *J Chem Ecol* 1989; 15:209–218.
44. Lee JSF, Berejikian BA. Effects of the rearing environment on average behaviour and behavioural variation in steelhead. *J Fish Biol* 2008; 72:1736-1749.
45. Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny MLJ, Tedesco PA. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 2008; 595, 545–567.
46. Liley NR. Chemical communication in fish. *Can J Fish Aquat Sci* 1982; 39:22-35.
47. Lima SL, Dill LM. Behavioural decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Can J Zool* 1990; 68: 619-640.
48. Manassa RP, Dixon DL, McCormick MI, Chivers DP. Coral reef fish incorporate multiple sources of visual and chemical information to mediate predation risk. *Anim Behav* 2013; 86: 717-722.
49. Mathews F, Orros M, McLaren G, Gelling M, Foster R. Keeping fit on the ark: assessing the suitability of captive-bred animals for release. *Biol Conserv* 2005; 121:569-577.
50. Maran T, Põdra M, Põlma M, Macdonald DW. The survival of captive-born animals in restoration programmes - case study of the endangered European mink *Mustela lutreola*. *Biol Conserv* 2009; 142: 685–1692.

51. Marchetti MP, Nevitt GA. Effects of hatchery rearing on brain structures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Environ. Biol Fishes 2003; 66:9-14.
52. Nelson J. Fishes of the world 2nd ed. Wiley Interscience, New York; 1984.
53. Olla BL, Davis MW, Ryer CH. Behavioural deficits in hatchery-reared fish: potential effects on survival following release. Aquatic Fisheries Management 1994; 25:19–34.
54. Pandey AK. Chemical signals in fishes: theory and application. Acta Hydroch Hydrob 1984; 12: 463–478.
55. Pfeiffer W. Distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. Copeia 1977; 4:653-665.
56. Salvanes AGV, Moberg O, Ebbersson LOE, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. Proc R Soc B 2013; 280: 20131331.
57. Sanches FHC, Miyai CA, Pinho-Neto CF, Barreto RE. Stress responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. Physiol Behav 2015; 8-13.
58. Seddon PJ, Armstrong DP, Malonely RF. Developing the science of reintroduction biology. Conserv Biol 2007; 21: 303-312.
59. Silva, JMA. Características reprodutivas de Curimba (*Prochilodus lineatus*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). M.Sc.Thesis, Universidade Federal de Lavras UFLA. 2007. Avaliável from: [http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2790/1DISSERTAÇÃO_Características%20reprodutivas%20de%20curimba%20\(Prochilodus%20lineatus\),%20Pacu%20\(20Piaractus%20mesopotamicus\)%20e%20Piracajuba%20\(%20Brycon%20orbignyanus\).pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2790/1DISSERTAÇÃO_Características%20reprodutivas%20de%20curimba%20(Prochilodus%20lineatus),%20Pacu%20(20Piaractus%20mesopotamicus)%20e%20Piracajuba%20(%20Brycon%20orbignyanus).pdf).
60. Silva RO. Enriquecimento ambiental cognitivo e sensorial para onças pintadas (*Panthera onca*) sedentárias em cativeiro induzindo redução de níveis de cortisol promovendo bem estar. M.Sc.Thesis, Universidade de Brasília UnB. 2011. Avaliável from: http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/10023/1/2011_RodrigoOliveiraSilva.pdf.
61. Smith RJF. The response of *Asterropterix semipuncattus* and *Gnatholepis anjerensis* (Pisces, Gobiidae) to chemical stimuli from injured conspecifics, an alarm response in gobies. Ethol 1989; 81: 279-290.
62. Smith RJF, Lawrence BJ, Smith MJ. Cross-reaction to skin extract between 2 gobies, *Asterropterix semipuncatus* and *Brachygobius sabanus*. J Chem Ecol 1991; 17: 2253-2259.
63. Smith ME. Alarm response of *Arius felis* to chemical stimuli from injured conspecifics. J Chem Eco 2000 26: 1635–1647.
64. Sol D, Timmermans S, Lefebvre L. Behavioural flexibility and invasion success in birds. Anim Behav 2002; 63: 495-502.
65. Speedie N, Gerlai R. Alarm substance induced behavioral response in zebrafish (*D. rerio*) Behav Brain Res 2008; 188:168-177.
66. Strand DA, Utne-Palm AC, Jakobsen PJ, Braithwaite VA, Jensen KH, Salvanes AGV. Enrichment promotes learning in fish. Mar Ecol Prog Ser 2010; 414: 273-282.

67. Torrezani CS, Pinho-Neto CA, Miyai CA, Sanches FHC, Barreto RE. Structural enrichment reduces aggression in *Tilapia rendalli*. *Marine and Freshwater Behav Physiol* 2013; 46: 183-190.
68. Wisenden BD, Sargent RC. Antipredator behavior and suppressed aggression by convict cichlids in response to injury-release chemical cues of conspecifics but not to those of an allopatric heterospecific. *Ethology* 1977; 103: 283-291.
69. Wisenden BD. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philosophic Trans Royal Soc London B - Biol Sci* 2000; 355: 1205-1208.