

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Resposta para diferentes tipos de odores
depende do contexto agressivo em matrinxã,
Brycon amazonicus.**

Ana Paula Montedor Russi

Jaboticabal, SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Resposta para diferentes tipos de odores
depende do contexto agressivo em matrinxã,
Brycon amazonicus.**

Ana Paula Montedor Russi

**Orientador: Dra. Profa. Elisabeth Criscuolo Urbinati
Co-orientadora: Dra. Mônica Serra**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Aquicultura da UNESP –
CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Doutor.

Jaboticabal, SP
2018

M773r Montedor-Russi, Ana Paula
Resposta para diferentes tipos de odores depende do contexto agressivo em matrinxã, *Brycon amazonicus* / Ana Paula Montedor Russi. -- Jaboticabal, 2018
lxx, 72 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp, 2018

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientadora: Mônica Serra

Banca examinadora: Percília Cardoso Giaquinto, Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, Luciana Thie Seki Dias

Bibliografia

1. Comunicação química. 2. Peixes. 3. Comportamento. I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aquicultura da Unesp.

CDU 639.3:591.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Respostas para diferentes tipos de odores do contexto agressivo em matrinxã, *Brycon amazonicus*

AUTORA: ANA PAULA MONTEADOR

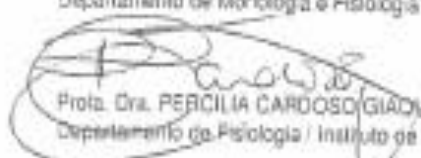
ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

COORIENTADORA: MÔNICA SERRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



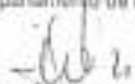
Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. PERCÍLIA CARDOSO GIADOMINTO,
Departamento de Psicologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Profa. Dra. LUCIANE HELENA GREGAGKIONI BATALHÃO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUCIANA THIE SEKI DIAS
Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal de São Carlos



Dr. FÁBIO SABBADIN ZANUZZO
Department of Ocean Sciences / Memorial University of Newfoundland, Canada

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2018

Sumário

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1: Introdução Geral	4
1. A importância do matrinxã no contexto da aquicultura nacional.....	5
2. Comportamento e comunicação química.....	6
3. Estresse e comunicação química.....	9
4. Referências.....	12
CAPÍTULO 2: Resposta de alarme a odor de coespecífico machucado depende da concentração e do contexto em juvenis de matrinxãs, <i>Brycon amazonicus</i>	19
Resumo	20
Abstract	21
1. Introdução	22
2. Material e métodos	24
2.1. Animais e aclimação.....	24
2.2. Tratamentos	24
2.3. Delineamento Experimental.....	25
2.4. Testes comportamentais.....	26
2.4.1. Testes comportamentais de alarme Experimento 1.....	26
2.4.2. Testes comportamentais de agressividade Experimento 2.....	27
2.5. Preparação do extrato de pele, do odor de animal machucado e odores de diferentes condições sociais.....	28
2.6. Análises fisiológicas de estresse.....	31
2.7. Análise estatística.....	32
3. Nota ética	32
4. Resultados	32
4.1. Resultados Experimento 1.....	32
4.1.1. Tempo de locomoção ao longo das adições dos odores em cada tratamento.....	33
4.1.2. Número de cruzamentos nos quadrantes ao longo das adições dos odores em cada tratamento.....	33
4.1.3. Frequência da resposta bifásica.....	35
4.1.4. Comparação entre tratamentos no período basal e adições 1, 2 e 3.....	36
4.1.4.1. Período basal.....	36
4.1.4.2. Adições 1, 2 e 3 dos diferentes odores.....	36
4.1.5. Parâmetros fisiológicos de estresse – cortisol e glicose.....	37
4.2. Resultados Experimento 2.....	38
4.2.1. Número de mordidas ao longo adições dos odores em cada tratamento.....	39

4.2.2. Número de demonstrações ao longo adições dos odores em cada tratamento.....	39
4.2.3. Número de investidas ao longo adições dos odores em cada tratamento.....	40
4.2.4. Tempo de locomoção ao longo adições dos odores em cada tratamento.....	41
4.2.5. Tempo que o peixe permaneceu longe do espelho.....	42
4.2.6. Frequência da resposta bifásica.....	43
4.2.7. Comparação entre tratamentos no período basal e nas adições 1, 2 e 3.....	43
4.2.7.1. Período basal.....	43
4.2.7.2. Adições 1, 2 e 3 dos diferentes odores.....	43
4.6. Parâmetros fisiológicos de estresse – cortisol e glicose.....	42
5. Discussão.....	46
6. Conclusão.....	54
7. Referências.....	54
Anexo 1.....	61
Anexo 2.....	62
Anexo 3.....	63

AGRADECIMENTOS

À Profª Beth, por me apoiar e me dar forças nos momentos mais difíceis (e olha que não foram poucos!rs)! Por fazer valer a pena continuar quando eu já estava quase desistindo! Por toda a doçura sempre! Por toda a paciência! Por todos os ensinamentos! Pelo exemplo de pessoa, sempre muito amável! Muito obrigada por ter tornado tudo mais simples!

À minha co-orientadora Mônica Serra, que amo tanto! Amor, mutíssimo obrigada pelo apoio, pela ajuda incansável (até mesmo nos fins de semana! rs) pela paciência, pelos ensinamentos diários e, principalmente, por te confiado em mim para fazer esse trabalho! Seu apoio foi fundamental para mim, muito obrigada!

A banca por aceitarem nosso convite e pelas grandes sugestões feitas.

Aos meus pais, Maria e Francisco, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Muito obrigado por investirem tanto em minha educação e pelo incansável apoio. Obrigada pelo exemplo de seres humanos que são para mim, Luciano e Andréia. Obrigada por tudo! Amo ser filha de vocês, Deus não poderia ter escolhido pais melhores!

Ao meu irmãos, Luciano e Andréia, pelo apoio e pelos cuidados com a irmã mais novinha. Sempre me espelhei nos dois para chegar até aqui, obrigado!

Aos meus cunhados, mais que queridos, pelo companheirismo e por tornarem os dias da família mais gostosos com as delícias, João Vitor e Maria Cecília! Amo ser tia dessas fofuras!

Ao Marcel, minha melhor escolha, meu muito obrigada! Você torna meus dias mais gostosos! Por me ajudar a lavar muitos aquários nos fins de semana e, também, pela ajuda na limpeza das caixas de matrinxãs, mesmo tomando algumas mordidas nos dedos! Obrigada pela ajuda incansável sempre! Pelo apoio incondicional nesses anos de doutorado, que muitas vezes precisei de colo e você estava presente sempre! Te amo!

À todos os colegas do laboratório que me acolheram (mais uma vez! Rs) tão prontamente desde que cheguei. Aprendo muito com vocês e também dou muita risada! É muito bom estar com vocês sempre! Meu agradecimento, mais que especial, a Dri e a Lari, pela ajuda na lavagem dos aquários, todos os dias...muitas vezes deixando de fazer suas coisas para me ajudar! Muito obrigada!

À nossa Damares, pelo apoio em todos os momentos, por nos socorrer no laboratório sempre, por toda a ajuda no meu experimento (lavou bastante aquário mesmo estando com uma dor daquelas nas costas!). Muito obrigada Dá!

A todos, que de alguma maneira contribuíram na realização deste trabalho.

FINANCIAMENTO:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES (Bolsa
Doutorado

RESUMO GERAL

Substâncias químicas podem se dissolver facilmente na água, facilitando a comunicação química. No entanto, pouco se sabe como ela ocorre nos peixes e se afeta respostas de estresse e, ainda, a influência da mesma em peixes de diferentes condições sociais. Para isso, conduzimos dois experimentos com o peixe matrinxã, *Brycon amazonicus*. O delineamento do experimento 1 consistiu em testar se extrato de pele em diferentes concentrações e odor de coespecífico machucado podem provocar respostas comportamentais de alarme e estresse. Para isso, testamos os seguintes tratamentos: água pura (AP); extrato de pele controle (EC), extrato de pele diluído (E-) e extrato de pele concentrado (E+) (5,5 µl/L, 2,7 µl /L e 11,0µl /L, respectivamente); ou água contendo odor de peixe machucado (Mac) (machucados advindos de briga com coespecífico). O comportamento dos peixes foi registrado antes e depois das adições (três adições), em cada tratamento (n=12). No Experimento 2, o delineamento consistiu em testar se odores de coespecíficos de diferentes condições sociais afetam o comportamento agressivo e as respostas de estresse. Para isso, matrinxãs foram isolados em aquário contendo um espelho, e após o início do confronto agressivo, foram feitas três adições (uma a cada treze minutos) de odor de coespecífico (n=21), dos seguintes tratamentos: AP; EC; Mac; vencedor Venc; perdedor – Perd; isolado – Isol. Analisamos as respostas comportamentais de alarme como, a atividade de locomoção (Exp. 1 e 2), tempo que o peixe permaneceu longe do espelho e, também, comportamentos agressivos no Experimento 2. Como indicadores de estresse utilizamos cortisol e glicose. O extrato provocou respostas comportamentais de alarme em ambos os experimentos, mostrando ser um odor artificialmente muito concentrado, provocando resposta de alarme em qualquer contexto. Já no tratamento Mac houve respostas de alarme no Experimento 1. No entanto, no Experimento 2 houve aumento progressivo da agressividade, sendo possível que nesse contexto o odor de um peixe machucado pode ser interpretado como sinal de que o indivíduo está vencendo a luta. Cortisol e glicose plasmáticos não foram alterados por nenhum dos tratamentos, indicando que os tratamentos não foram distúrbios suficientes para promover respostas de estresse. Para futuras intervenções nas pisciculturas

ainda são necessários mais trabalhos básicos desse tipo de comunicação influenciando nos comportamentos dos peixes.

ABSTRACT

Chemical substances can dissolve easily in Waters, facilitating chemical communication. However, little is known how it occurs in fish and whether it affects stress responses. Furthermore, we do not know the influence of chemical communication on fish of different social conditions. For this, we conducted two experiments with the matrinxã fish, *Brycon amazonicus*. The protocol of Experiment 1 consisted of extract of skin in different concentrations and odor of injured conspecific can cause behavioral alarm and stress responses. For this, we tested the following treatments: pure water (AP); (EC), diluted skin extract (E-) and concentrated skin extract (E +) (5.5 µl / L, 2.7 µl / L and 11.0 µl / L, respectively); or water containing smell of injured conspecific fish (Mac) (simulation of injuries resulting from a fight with a specific species). Fish behavior was recorded before and after the additions (three additions) in each treatment (n = 12). In Experiment 2, the protocol consisted of testing whether conspecific odors from different social conditions affect aggressive behavior and stress responses. For this, matrinxãs were isolated in an aquarium containing a mirror, and after the beginning of the aggressive confrontation, three additions (one every thirteen minutes) of conspecific odor (n=21) were made from the following treatments: AP; EC; Mac; winner Venc; loser - Perd; isolated - Isol. We analyzed behavioral alarm responses such as the locomotion activity (Exp. 1 and 2), time the fish stayed away from the mirror and also aggressive behaviors in Experiment 2. As indicators of stress we used cortisol and glucose. In both experiments we evaluated the behavior before the additions and after the additions of each treatment. The extract elicited behavioral alarm responses in both experiments, proving to be an artificially concentrated odor capable of triggering the alarm response in any context. Already in the Mac treatment there were alarm responses in Experiment 1. However, in Experiment 2 there was a progressive increase of aggressiveness, possibly because that in this context the odor of a injured fish can be interpreted as a sign that the individual is winning the fight. Plasma cortisol and glucose were

not altered by any of the treatments, indicating that the treatments were not disturbances sufficient to promote stress responses.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. A importância do matrinxã no contexto da aquicultura nacional

A aquicultura vem crescendo em todo o mundo por ser uma importante alternativa na produção de alimentos. Um bilhão de pessoas tem o pescado como fonte principal de proteínas em sua dieta e este consumo tende a aumentar com o crescimento da população (FAO, 2016). Segundo a FAO (2016), a aquicultura é o setor de produção de alimentos com o crescimento mais rápido e representa quase 50% do pescado destinado à alimentação mundial, alcançando a produção de 97,2 milhões de toneladas em 2013. No Brasil, a produção aquícola atingiu 474.159 toneladas em 2013 (FAO, 2016) e tende a registrar um aumento na produção de 104% até 2025. No entanto, esse aumento na produção e a dependência pelo peixe cultivado aumentam os problemas associados à criação intensiva (Urbinati e Carneiro, 2004). A estagnação da pesca extrativa, aliada ao aumento populacional e à crescente demanda por proteína animal, incentiva a domesticação de novas espécies aquáticas para a aquicultura (FAO, 2016).

O Brasil é um país com grande riqueza de peixes, com espécies das mais variadas formas e tamanhos (Nelson, 1994). Dentre eles, a espécie *Brycon amazonicus*, popularmente conhecida como matrinxã, é encontrada na Bacia Amazônica. A espécie pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Brycon*. A criação do matrinxã cresceu muito na década de 1990 devido o hábito voraz da espécie, tornando a espécie atrativa nas pescas esportivas. Além disso, a espécie aceita bem a ração artificial, tem crescimento rápido e carne de qualidade (Gomes e Urbinati, 2013). É um peixe de grande importância econômica na região amazônica. Além da importância na pesca, é também um dos peixes mais utilizados na aquicultura regional (Santos *et al.*, 2006).

No entanto, apesar das vantagens zootécnicas, o matrinxã é uma espécie muito agressiva em todas as suas fases de vida, sendo que os confrontos agressivos na espécie resultam não só em estresse, mas também em machucados que podem levar à morte (Urbinati *et al.*, 2015). No caso do matrinxã, essa agressividade elevada também se deve ao fato de que, mesmo após a resolução de um embate agressivo, com um vencedor e um perdedor, o confronto agressivo continua, com os ataques do vencedor aumentando ainda mais contra o perdedor (Serra *et al.*, 2017).

Essa agressividade nas espécies territoriais, como o matrinxã, pode se agravar em condições de cativeiro (Urbinati *et al.*, 2015), acarretando grandes perdas na sua criação. Portanto, entender o comportamento social dessas espécies pode ser útil para orientar estratégias de manejo nos sistemas de criação intensiva e reduzir as condições estressantes.

2. Comportamento e comunicação química

A comunicação é um processo social básico, pois ela que torna a vida em sociedade possível através da troca de informações (Palermo-Neto, 2010). Essa troca pode ocorrer de diferentes formas, podendo ser visual, tátil, química e sonora (Dunbar, 1998). No caso dos peixes, a comunicação química torna-se ainda mais importante devido ao meio que eles vivem, uma vez que a turbidez da água pode dificultar a comunicação visual (Winsenden, 2000). Além disso, o volume de informações que pode ser transmitido pela comunicação química é praticamente ilimitado, sendo a água um ótimo meio para a transmissão de sinais químicos (Hara, 1994; Ward e Mehner, 2010).

A comunicação química é usada pelos animais aquáticos para forrageamento, reprodução e também para avaliar o risco de predação (Winsenden, 2000). Ela ocorre através de substâncias liberadas no meio ambiente, podendo envolver somente alguns compostos químicos ou uma mistura de diferentes odores (Keller-Costa *et al.*, 2015). O epitélio olfatório dos peixes está localizado na cavidade nasal, que é repleta de vilosidades para aumentar a área de contato com o estímulo. Nessa cavidade estão os receptores olfatórios (neurônios bipolares) e, também células secretoras. A cavidade apresenta abertura anterior e posterior para garantir o suprimento contínuo de água no epitélio olfatório. Nos peixes, os neurônios olfatórios apresentam terminações dendríticas especializadas na detecção e transdução de estímulos químicos e se projetam para bulbo olfatório (Dogel, 1886; Zeiske *et al.*, 1992).

Na comunicação temos um organismo emissor e um receptor e, para que seja considerado comunicação, o sinal emitido deve resultar em alterações no organismo do receptor. Os sinais químicos utilizados na comunicação de peixes são diversos (Liley, 1982). No geral, as substâncias envolvidas neste tipo de comunicação são chamadas de semioquímicos. Quando os sinais agem

especificamente entre indivíduos da mesma espécie, ou seja, são percebidos por coespecíficos, são conhecidos como feromônios (Wyat, 2003), e consistem em dois tipos, os *releasers* e os *primers*. Os *releasers* são os que desencadeiam uma resposta comportamental rápida (com latência curta) no indivíduo receptor; já os *primers* desencadeiam efeitos fisiológicos de longa duração, que vão levar a alterações no metabolismo e também ativar processos regulatórios no receptor (Liley, 1982).

Alguns feromônios são também conhecidos como feromônios de alarme, ou substâncias de alarme (Pfeiffer, 1963). Uma substância só é denominada de alarme quando existe dano mecânico da pele do emissor, o que indica a presença de um predador. Pfeiffer (1963) inicialmente acreditava que somente a superordem Ostariophysi, que representa 64% de todos os peixes de água doce, apresentava essas substâncias de alarme e que estas substâncias estavam presentes em células especializadas da epiderme, denominadas células *club*. Em caso de um dano mecânico essas células *club* se rompem e as substâncias de alarme, presentes dentro delas, liberadas no ambiente. Mais tarde, foram encontradas células *club*, ou células semelhantes a elas, não somente nos Ostariophysi mas também em Percidae, Gobideos e Scorpaeniformes (Smith, 1992).

As substâncias de alarme produzem respostas denominadas por Pfeiffer (1977) como *fright reaction* ou reação de alarme. Ainda segundo esse autor, essas respostas podem variar entre as espécies. As reações de alarme são imediatas, e podem aumentar as chances de sobrevivência, indicando risco de predação (Chivers e Smith, 1998). Muitos estudos utilizam extrato feito de pele para analisar essas reações de alarme, pois as células *club* estão localizadas na pele (Pfeiffer, 1977; Mathis e Smith, 1993; Oliveira *et al.*, 2014). Nos peixes, o risco de predação leva a comportamentos antipredatórios e adaptativos, como: *freezing* (cessação da movimentação) em espécies como em zebrafish *Danio rerio* e, piaçu *Leporinus macrocephalus* (Oliveira *et al.*, 2014; Barbosa Júnior e Hoffman, 2007), *dashing* em pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Giaquinto e Volpato, 2001), redução da atividade de locomoção em *Bathygobius soporator* (Barreto *et al.*, 2014), aumento do uso de abrigo em *Pimephales promelas* (Lawrence e Smith, 1989), e evitação da área da substância de alarme em *P. promelas* (Mathis e Smith, 1993).

Muitos pesquisadores, no entanto, questionam se somente as células *club* estariam envolvidas na resposta anti-predatória e se as mesmas teriam outras funções. Segundo Smith (1992), se um animal sinaliza que está sendo predado, necessariamente ele precisa estar machucado para emitir essa sinalização e, na maioria das vezes, ele morre; portanto, esse animal predado não teria uma vantagem direta. Se não há vantagem em emitir a sinalização, a seleção dos indivíduos com células *club* e consequente evolução de sua presença nos peixes não poderia acontecer (Smith, 1992). Uma forma de vantagem da emissão das substâncias de alarme poderia ser o aviso a outras presas do sinal do predador. No entanto, o que poderia ocorrer, também, seria outros predadores se aproximarem do local pela possibilidade de outras presas (Smith, 1992). Até hoje, os questionamentos a respeito dos sistemas de alarme permanecem. Nesse sentido, questiona-se se essas células poderiam ter outras funções e que a função das células *club* como sistema de alarme seria secundária (Smith, 1992). Nesse sentido, Iger e Bonga (1994), analisando histologicamente as células *club* de carpas expostas a extrato de pele colocado em água ácida, encontraram evidências de linfócitos e leucócitos dentro das células *club*, o que sugeriria uma função imunológica. Outro trabalho, mostrou que *P. promelas* expostos a patógenos, parasitas e radiação UV apresentaram estimulação da produção de células *club*, mas o aumento do risco de predação não influenciou na produção dessas células, sugerindo que a função de resposta imune seria primária à função de alarme (Chivers *et al.*, 2007). Ainda, há estudos evidenciando a ocorrência de reações de alarme em peixes mesmo sem a presença do conteúdo das células *club*. Barreto *et al.* (2013) mostraram que reações de alarme (redução da alimentação e da locomoção) são suscitadas apenas com sangue de coespecífico, mesmo sem a participação das substâncias de alarme das células *club* ou da pele em tilápias-do-Nilo. Além disso, *P. promelas* apresentam respostas antipredatórias para pistas de alarme, num período de 8 a 17 dias após eclosão, embora as larvas não possuam células *club* antes de 28 – 37 dias (Carreau-Green *et al.*, 2008). Portanto, embora o extrato de pele seja largamente e eficientemente utilizado em estudos de reação de alarme em peixes, ainda faltam evidências de que são de fato as células *club* da pele a fonte das substâncias de alarme.

A comunicação química afeta vários comportamentos, e aparentemente, ela teria efeito nos comportamentos agressivos. Esses comportamentos acontecem nas espécies sociais quando recursos que são escassos (por exemplo, alimento, locais para reprodução, procura por parceiros e abrigos) são disputados (Huntingford *et al.*, 2012). Nesse sentido, alguns trabalhos analisaram se as substâncias de alarme estariam afetando o comportamento agressivo dos peixes (Wisenden, 1997; Barreto *et al.*, 2010). Wisenden (1997) mostrou que *Cicllassoma nigrofasciatum*, quando colocados em pares em um aquário e expostos a extrato de pele de animal da mesma espécie, apresentam redução da frequência de abordagens e também de mordidas. Barreto *et al.* (2010) utilizaram o paradigma intruso-residente (quando um peixe é inserido em um território que já possui um peixe residente) para avaliar as interações agressivas, e observaram que após injetarem, na água, extrato de pele de coespecíficos houve redução na frequência de agressões. A presença da substância de alarme no ambiente pode gerar um conflito motivacional nos peixes, sendo que o sistema motivacional do medo gera uma resposta de alerta, inibindo o sistema motivacional da agressividade e reduzindo os confrontos agressivos em um contexto no qual a agressividade não é prioridade. De fato, o sistema motivacional do medo, no geral, inibe o sistema motivacional da agressividade (Figler e Einhorn, 1983).

A comunicação química pode, também, influenciar aspectos muito importantes na criação de peixes. Por exemplo, há evidências de que o crescimento pode ser prejudicado por fatores químicos liberados na água, e que pistas de alarme liberadas por predadores reduzem a alimentação de alguns animais, que irão forragear somente se estiverem com fome (Milinski, 1993), podendo prejudicar o crescimento. Na realidade, ainda são poucos os trabalhos que relacionam a comunicação química no contexto da piscicultura, mas para isso é necessário conhecer os mecanismos básicos que envolvem a comunicação química, e também entender como as espécies utilizadas na piscicultura respondem a comunicação química, uma vez que as respostas são variáveis entre as espécies.

3. Estresse e a comunicação química

Os peixes, durante toda sua vida, enfrentam desafios que precisam ser superados e enfrentados para que possa sobreviver (Schreck e Tort, 2016). Esses desafios provocam alterações dos meios externo e interno que podem comprometer a homeostase do animal (Urbinati *et al.*, 2014). Para restabelecer a homeostase, ocorre uma cascata de eventos fisiológicos (Schreck e Tort, 2016) que capacitam o animal a superar a ameaça e garantir sua sobrevivência (Urbinati *et al.*, 2015), por isso o estresse é um mecanismo adaptativo. Os estressores podem ser temporários, ou agudos, mas no caso de persistência do estímulo estressor, chamados de estressores crônicos, as respostas de estresse deixam de ser adaptativas e perdem sua funcionalidade (Wendelaar Bonga, 1997; Schrek e Tort, 2016).

Em ambientes artificiais de criação, os peixes são expostos a condições inesperadas de ameaça, que diferem quanto à origem, intensidade e duração, submetendo-os a situações que vão além de sua capacidade de tolerância e que colocam em risco sua saúde (Urbinati *et al.*, 2014). Em um ambiente de piscicultura os estressores são diversos e podem ser físicos, químicos e sociais (Sneddon *et al.*, 2016). Após a percepção do estressor, os peixes apresentam um conjunto coordenado de respostas dividido em três grupos, sendo elas: as que têm início assim que o estressor é percebido, em nível neuroendócrino, e chamadas de primárias – trata-se da mobilização dos sistemas biológicos; as respostas generalizadas, que são resultado da ação neuroendócrina, e chamadas de secundárias – ajuste da condição corporal para resistir nas condições homeostáticas alteradas; e as respostas terciárias, que se caracterizam pela perda da capacidade adaptativa e exaustão dos sistemas biológicos frente ao estresse prolongado (crônico) (Urbinati *et al.*, 2014; Urbinati *et al.*, 2015). A resposta de estresse, ou seja, sua magnitude e duração, é dependente da severidade e duração do estressor (Schreck e Tort, 2016). Além disso, outros fatores também influenciam na resposta, tais como: o patrimônio genético do peixe, ambiente em que os peixes estão localizados, suas experiências anteriores e o estágio ontogenético (Schreck e Tort, 2016).

As respostas causadas pela ação do estressor nos peixes são controladas por dois eixos distintos: um complexo sistema neuroendócrino, constituído pelo sistema nervoso simpático-células cromafins, e o eixo hipotálamo-pituitária-tecido interrenal. A ativação do primeiro sistema culmina com a liberação de

catecolaminas pelas células cromafins (Fabbri e Moon, 2016), enquanto que no eixo hipotálamo-pituitária-interrenal, uma estimulação em cascata do hipotálamo leva a um aumento de CRH (hormônio liberador de corticotrofina), que, por sua vez, estimula a glândula pituitária a liberar ACTH (corticotrofina), que, liberado na corrente sanguínea, estimula as células inter-renais a produzirem glicocorticoides, principalmente o cortisol (Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati *et al.*, 2014). Em resposta a qualquer estressor agudo, as catecolaminas aumentam rapidamente seus níveis no organismo, devido à inervação direta das células cromafins pelo sistema nervoso simpático (Fabri e Moon, 2016). Já o cortisol circulante aumenta em poucos minutos, retornando às taxas normais em uma ou mais horas, sendo ele um dos indicadores de estresse mais usado (Mommensen *et al.*, 1999). O cortisol e as catecolaminas são responsáveis pela preparação fisiológica do peixe para enfrentar o estressor, promovendo respostas fisiológicas, metabólicas e osmorregulatórias, que chamamos de respostas secundárias do estresse. Os diferentes mecanismos são: alterações metabólicas em parâmetros como glicemia, ácido lático e glicogênio do fígado e dos músculos; hematológicas, como número de células vermelhas e brancas e, ainda, as alterações hidroeletrólíticas nas concentrações plasmáticas de íons (cloro, sódio, potássio), proteínas e na osmolaridade. Com relação à glicose, seu aumento é inicialmente devido à ação das catecolaminas na quebra do glicogênio hepático, sendo esta a primeira fonte de energia para atender a demanda do cérebro e de músculos (Urbinati *et al.*, 2014). Posteriormente, o cortisol mantém os níveis glicêmicos elevados por meio da neoglicogênese a partir de outros substratos energéticos (como aminoácidos e lipídeos), bem como estimula a restauração das reservas hepáticas de glicogênio (Wendelaar Bonga, 2011).

No caso da cronicidade da exposição dos peixes a estressores, a energia torna-se indisponível para processos vitais (Schreck e Tort, 2016), afetando o crescimento, reprodução e também a capacidade de tolerar outros agentes estressores adicionais (Wendelaar Bonga, 1997; Urbinati e Carneiro, 2004; Urbinati *et al.*, 2014). Essas são respostas que são caracterizadas como terciárias (Schreck e Tort, 2016).

Tanto a comunicação química pode resultar em estresse quanto o estresse pode influenciar a comunicação química dos peixes; no entanto, os resultados ainda são controversos. Oliveira *et al.* (2014) mostraram que *zebrafish* expostos a

substâncias de alarme de coespecíficos mortos apresentavam aumento dos níveis de cortisol, além de comportamentos defensivos, como o *freezing*. Segundo os autores, estas respostas encontradas estariam relacionadas a comportamentos antipredatórios e seriam adaptativas; de fato, o aumento dos níveis de cortisol prepara o animal para responder a situação de perigo (Wendelaar Bonga, 1997). Em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, aumentos dos níveis de cortisol também foram encontrados para exposição a extratos de pele de coespecíficos (Sanches *et al.*, 2015). No entanto, alguns trabalhos relacionados à comunicação química, que apresentam respostas comportamentais de alarme, não encontraram respostas fisiológicas de estresse. Por exemplo, matrinxãs expostos a extratos de pele de coespecíficos apresentaram respostas comportamentais de alarme, sem alteração dos níveis circulantes de cortisol (Ide *et al.*, 2003). Já em jundiá, *Rhamdia quelen*, extratos de pele não provocaram nenhum tipo de resposta de estresse, sendo que os níveis sanguíneos de cortisol e glicose permaneceram inalterados (Souza-Bastos *et al.*, 2014). Em contrapartida, Barreto *et al.* (2014), através de injeções intraperitoneais de cortisol em *Frillfin goby*, observaram que o cortisol contribuiu para melhorar a resposta anti-predatória.

Como exposto, as mudanças fisiológicas de estresse em peixes relacionadas à comunicação química ainda não são claras, com alguns trabalhos mostrando que extratos de pele conduzem a respostas de estresse, enquanto em outros estudos essas respostas não aparecem, apesar da resposta comportamental de alarme. Assim, há motivação para se buscar entender como a comunicação química afeta as respostas de estresse. O entendimento dos mecanismos básicos da comunicação química e do estresse poderá contribuir para futuras intervenções nas pisciculturas, uma vez que nesses ambientes, os peixes geralmente são estocados em altas densidades e a comunicação química, nestas condições, pode ser um fator de interferência no estabelecimento de um ambiente adequado de criação.

4. Referências

Barbosa-Júnior, A., Hoffman, A. **Alarm reaction in a South American teleost fish piaçu, *Leporinus macrocephalus***. Comparative Biochemistry and Physiology. 148, 39, 2007.

Barreto, R. E., Barbosa-Junior, A., Giassi, A. C. C., Hoffmann, A. **The club cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia**. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 43, 75–81, 2010.

Barreto, R. E., Miyai, C. A., Sanches, F. H. C., Giaquinto, P. C., Delicio, H. C., Volpato, G. L. **Blood cues induce antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics**. PLoS One 8(1): e54642, 2013.

Barreto, R. E., Barbosa-Júnior, A., Urbinati, E. C., Hoffmann, A. **Cortisol influences the antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the *frillfin goby***. Hormones and Behavior. 65, 394–400, 2014.

Carreau-Green, N. D., Mirza, R. S., Martinez, M. L., Pyle, G. G. **The ontogeny of chemically mediated antipredator responses of *fathead minnows Pimephales promelas***. Journal of Fish Biology. 73, 2390–2401, 2008.

Chivers, D. P., Smith, R. J. F. **Chemical Alarm Signalling in Aquatic Predator-Prey Systems: A Review and Prospectus**. Ecoscience. 5, 338–352, 1998.

Chivers, D. P., Wisenden, B. D., Hindman, C. J., Michalak, T. A., Kusch, R. J., Halbgewachs, C. F., Pollock, M. S., Alemadi, S., James, C. T., Savaloja, R. K., Goater, C. P., Corwin, A., Mirza, R. S., Kiesecker, J. M., Brown, G. E., Adrian, J. C., Krone, P. H., Blaustein, A. R., Mathis, A. **Epidermal ‘alarm substance’ cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation**. Proceeding of the Royal Society. 274, 2611–2619, 2007.

Dogel, A. S. **The Structure of the Olfactory Organ in Ganoids, Teleost Fish, and Amphibians**. Tr. Obshch. Estestvoispyt pri Kazan Univ. 16, 3–82, 1886.

Dunbar, R. I. M. **Grooming, gossip and the evolution of language**. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. 1998.

Fabbri, E., Moon, T. W. **Adrenergic signaling in teleost fish liver, a challenging path**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 199, 74–86, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global Aquaculture Production Statistics database update to 2013**. Fisheries and Aquaculture Department. 2015.

Figler, M. H., Einhorn. D. M. **The territorial prior residence effect in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum* Günther): temporal aspects of establishment and retention, and proximate mechanisms**. Behaviour. 85, 157–183, 1983.

Giaquinto, P. C., Volpato, G. L. **Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to Conspecific skin extract in pintado catfish**. Behaviour. 138, 1205-1214, 2001.

Gomes, L. C., Urbinati, E. C. **Matrinxã *Brycon amazonicus***. In: Baldisseroto, B., Gomes. L. C. (Org.). Espécies Nativas para piscicultura no Brasil. 2ed. Santa Maria: Editora UFSM, 149-167, 2013.

Hara, T. J. **The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gestation**. Reviews in Fish Biology and Fisheries 4, 1–35, 1994.

Huntingford, F., Tamilselvan, P., Jenjan, H. **Why Do Some Fish Fight More than Others?** Physiological and Biochemical Zoology. 85(6), 585–593, 2012.

Ide, L. M., Urbinati E. C., Hoffmann, A. **The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus***. Journal of Fish Biology. 63, 332-343, 2003.

Iger, S. E., Wendelaar, B. **Cellular responses of the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water.** Cell & Tissue Research. 275, 481-492, 1994.

Kasumyan, A. O. **The Olfactory System in Fish: Structure, Function, and Role in Behavior.** Journal of Ichthyology. 44, S180–S223, 2004.

Keller-Costa, T., Canário, A. D. M., Hubbard, P. C. **Chemical communication in cichlids: A mini-review.** General and Comparative Endocrinology. 221, 64-74, 2015.

Lawrence, B. J., Smith, R. J. F. **Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance.** Journal of Chemical Ecology. 15, 1, 1989.

Liley, N. R. **Chemical communication in fish.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 39, 22-35, 1982.

Mathis, A., Smith, R. J. F. **Fathead Minnows *Pimephales promelas* Learn to Recognize Northern Pike *Esox lucius* as Predator on the Basis of Chemical Stimuli from Minnows in the Pike's Diet.** Animal Behavior. 46, 645–656, 1993.

Milinsky, M. **Predation risk and feeding behaviour.** In: Pitcher, T. J., editor. Behaviour of Teleost Fishes, Chapman and Hall, London. 285-305, 1993.

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., Moon, T. W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** Reviews in Fish Biology and Fisheries. 9, 211–268, 1999.

Nelson, J. S. **Fishes of the world.** New York: John Wiley & Sons. 600, 1994.

Oliveira, T. A., Gessi, K., Motta, A. C., Piato, A. L., Barreto, R. E., Volpato, G. L., Barcellos, L. J. G. **Death-associated odors induce stress in zebrafish.** Hormones and Behavior. 65, 340–344, 2014.

Palermo-Neto, J. **A comunicação dos animais**. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Brasília, 16 (49), 24-34, 2010.

Pfeiffer, W. **The Fright Reaction of Fish**. Biological Reviews. Cambridge Phil. Soc. 37, 495–511, 1963.

Pfeiffer, W. **The Distribution of Fright Reaction and Alarm Substance Cells in Fishes**. Copeia. 4, 653–665, 1977.

Sanches, F. H. C., Miyai, C. A., Pinho-Neto, C. F., Barreto, R. E. **Stress responses to chemical alarm cues in Nile tilapia**. Physiology & Behavior. 149, 8–13, 2015.

Santos, G. M., Ferreira, E. J. G., Jansen A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea. 144, 2006.

Schreck, C. B., Tort, L. **The concept of stress in fish**. In: Biology of Stress in Fish. Fish and Physiology. Part 1. 35, 37, 2016.

Serra, M., Wolkers, C. P. B., Mello, M. M. M., Urbinati, E. C. **Agonistic trials with mirrors do not elicit the same aggressiveness of a real trial in the matrinxã fish, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)**. Journal of Applied Ichthyology. 33, 42–46, 2017.

Smith, R. J. F. **Alarm Signals in Fishes**. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2, 33–63, 1992.

Sneddon, L. U., Wolfenden, D. C.C., Thomson, J. S. **Stress Management and Welfare**. In: Biology of Stress in Fish. Fish and Physiology. Part 12. 35, 77, 2016.

Souza-Bastos, L. R., Freire, C. A., Fernandes-de-Castilho, M. **Skin extract from *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) does not promote stress in conspecifics**. Neotropical Ichthyology. 12(1), 125-132, 2014.

Urbinati, E. C., Carneiro, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.** In: Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalossi, D. M., Castagnolli, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 71-193, 2004.

Urbinati, E. C., Zanuzzo, F. S., Biller-Takahashi, J. D. **Estresse e sistema imune em peixes.** In: Baldisserotto, B., Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal. FUNEP. 87-105, 2014.

Urbinati, E. C., Zanuzzo, F. S., Serra, M., Wolkers, C. P. B., Sabioni, R. E. **Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas.** In: Tavares-Dias, M. Mariano, W. S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. 1, 429, 2015.

Ward, A. J. W., Mehner, T. **Multimodal mixed messages: the use of multiple cues allows greater accuracy in social recognition and predator detection decisions in the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*.** Behavioral Ecology. 21, 1315–1320, 2010.

Wendelaar Bonga, S. E. **The stress response in fish.** Physiological Reviews. 77(3), 591-625, 1997.

Wendelaar Bonga, S. E. **Hormone Response to Stress.** In: Farrel, A. P., Cech, J. J., Richards, J. G., Stevens, E. D. (Ed.). Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment. Elsevier Academic Press Inc, UK, 1515-1523, 2011.

Wisenden, B. D., Smith. R. J. F. **The effect of physical condition and shoalmate familiarity on proliferation of alarm substance cells in the epidermis of fathead minnows.** Journal of Fish Biology 50, 799-808, 1997.

Wisenden, B. D. **Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment**. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 355(B), 1205-1208, 2000.

Wyatt, T. D. **Pheromones and Animal Behaviour: communication by smell and taste**. Cambridge University Press. Cambridge. 2003.

Zeiske, E., Theisen B., Breucker, H. **“Structure, Development and Evolutionary Aspects of the Peripheral Olfactory System”**. in *Fish Chemoreception*, Ed. By T. J. Hara. Chapman and Hall, London, 13–39, 1992.

CAPÍTULO 2

Resposta de alarme a odor de coespecífico machucado depende da concentração e do contexto em juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus*.

RESUMO

A comunicação química é uma das formas de troca de informações entre os animais, especialmente entre indivíduos da mesma espécie. Extratos de pele de peixes provocam mudanças comportamentais e de estresse. Além disso, não se sabe como odores de coespecíficos em diferentes condições sociais afetam o comportamento agressivo e o estresse dos peixes. Por isso, conduzimos dois experimentos. No Experimento 1, nosso objetivo foi testar se extrato de pele em diferentes concentrações e odor de coespecífico machucado podem provocar respostas comportamentais de alarme e estresse em matrinxãs, *Brycon amazonicus*. Os tratamentos eram: água pura (AP); extrato de pele controle (EC), extrato de pele diluído (E-) e extrato de pele concentrado (E+) (5,5 µl/L, 2,7 µl /L e 11,0µl /L, respectivamente); ou água contendo odor de peixe machucado (Mac) (simulação de machucados de um confronto agressivo com coespecífico). O comportamento dos peixes foi registrado antes e depois das adições (três adições), em cada tratamento (n=12). Já, no Experimento 2, nosso objetivo foi identificar se a agressividade e as respostas de estresse dos peixes são moduladas pelos odores de coespecíficos de diferentes condições sociais e extrato de pele. Nesse estudo, os peixes foram isolados em aquários contendo um espelho, e iniciado o confronto agressivo, foram feitas três adições de odor de coespecífico (uma a cada treze minutos), dos tratamentos correspondentes (AP; EC; Mac; vencedor Venc; perdedor – Perd; isolado - Isol), (n=21). Analisamos as respostas comportamentais de alarme, como atividade de locomoção do animal (Exp. 1 e 2), tempo longe do espelho (Exp. 2) e, também, os comportamentos agressivos (Exp. 2). Como indicadores de estresse foram analisados os níveis sanguíneos de cortisol e glicose (Exp. 1 e 2). Todos os tratamentos de extrato de pele e odor de animal machucado, em ambos os experimentos, provocaram respostas de alarme, mostrando ser um odor artificialmente muito concentrado, capaz de provocar a resposta de alarme em qualquer contexto. No entanto, houve redução da agressão no tratamento EC (Exp. 1) e aumento progressivo da agressão no tratamento Mac, possivelmente porque, nesse último contexto o odor de um peixe machucado pode ser interpretado como sinal de que o indivíduo está vencendo a luta. Cortisol e glicose plasmáticos não foram alterados por nenhum dos tratamentos, indicando que os tratamentos não foram distúrbios suficientes para promover respostas de estresse.

ABSTRACT

Chemical communication is one of the ways that the information is exchanged between animals, especially among individuals of the conspecifics. Fish skin extracts cause changes in behavior and stress. Moreover, it is not known how conspecific odors in different social conditions affect the aggressive behavior and stress of the fish. So we conducted two experiments. In Experiment 1, our objective was to test whether extract of skin at different concentrations and injured odor of conspecific can trigger behavioral alarm and stress responses in matrinxãs, *Brycon amazonicus*. The treatments were: pure water (AP); (EC), diluted skin extract (E-) and concentrated skin extract (E+) (5.5 µl / L, 2.7 µl / L and 11.0 µl / L, respectively); or water containing smell of injured conspecific (Mac) (simulation of injuries from an aggressive confrontation with a conspecific). Fish behavior was recorded before and after the additions (three additions) in each treatment (n = 12). Already, in Experiment 2, our objective was to identify whether the aggressiveness and stress responses of fish are modulated by the conspecific odors of different social conditions and skin extract. In this study, the fish were isolated in aquariums containing a mirror, and when the aggressive confrontation began, we added (three times) the odors corresponding to each treatment (AP; EC; Winner Venc; loser - Perd; isolated - Isol), (n = 21). We analyzed behavioral alarm responses, such as the animals' locomotion activity (Exp. 1 and 2), time away from the mirror (Exp 2) and aggressive behavior (Exp 2). The blood levels of cortisol and glucose (Exp. 1 and 2) were analyzed as indicators of stress. All skin extract (Exp. 1 and 2) and injured conspecific (Exp. 2) treatments, in both experiments, elicited alarm responses, showing to be an artificially highly concentrated odor capable of triggering the alarm response in any context. However, there was a reduction in aggression in EC treatment (Exp. 1) and progressive increase of aggression in Mac treatment, possibly because in the aggressive context the odor of a injured conspecific fish can be interpreted as a sign that the individual is winning the fight. Plasma cortisol and glucose were not altered by any of the treatments, indicating that the treatments were not disturbances sufficient to promote stress responses.

1. Introdução

A comunicação é o meio pelo qual os animais trocam informações uns com os outros, podendo ser visual, tátil, química e sonora (Dunbar, 1998). Nos peixes, a comunicação química é muito importante, pois as substâncias químicas podem se dissolver facilmente na água, facilitando esse tipo de comunicação (Wisenden, 2000). Além disso, a comunicação química é muito importante para os peixes pois, além do reconhecimento de indivíduos coespecíficos, ela é utilizada em comportamentos relacionados a reprodução, migração, alimentação, agressão e predação (Wisenden, 2000). No entanto, o conhecimento básico relacionado à comunicação química entre peixes coespecíficos ainda é reduzido.

Em uma via da comunicação, resumidamente, temos o animal que envia uma mensagem/sinal (emissor) e o animal que recebe a mensagem enviada (receptor), no qual ocorre alterações (Wisenden, 2000; Keller-Costa *et al.*, 2015). O sinal, no caso da comunicação química, ocorre através de substâncias lançadas no meio ambiente e, nos peixes, elas são diversas (Kasumyan, 2004). As substâncias de alarme, ocorrem quando existe dano mecânico da pele e podem indicar a presença de um predador (Pfeiffer, 1963). As respostas de alarme são estudadas através da exposição de peixes a extratos de pele. No entanto, as respostas, que são adaptativas e antipredatórias, variam muito entre espécies, podendo ocorrer: *freezing* em zebrafish, piaçu *Leporinus macrocephalus* e matrinxã *Brycon amazonicus* (Barbosa Júnior e Hoffman, 2007; Oliveira *et al.*, 2014); atividade de locomoção reduzida em *F. goby*, *Bathygobius soporator* (Barreto *et al.*, 2014), aumento do uso de abrigos e evitação da área da substância de alarme em stickleback, *Culaea inconstans* (Lawrence e Smith, 1989; Mathis e Smith, 1993).

As substâncias de alarme também podem influenciar nos comportamentos agressivos. As espécies territorialistas podem marcar seu território através de odores, o que reduz os contatos agressivos dentro de uma população (Courtenay *et al.*, 1997). O aumento da renovação de água em aquários com tilápias (dominante e subordinada) aumenta a frequência de ataques por tilápias subordinadas, influenciando, de modo negativo, na estabilidade da hierarquia social (Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008). Segundo Olsén *et al.* (2002), um peixe dominante pode concentrar mais produtos químicos ou liberar mais sinais do que

um subordinado. Essas substâncias de alarme também influenciam o comportamento agressivo de coespecíficos, como no caso de *C. nigrofasciatum*, que, quando colocados em pares em um aquário e expostos a extrato de pele de coespecífico, mostraram redução da frequência de abordagens e também de mordidas (Wisenden, 1997). Barreto *et al.* (2010) também mostraram redução na frequência de agressão em tilápias-do-Nilo, sendo a agressividade analisada em peixes que foram colocados num paradigma intruso-residente (quando um peixe entra em um local que já tem um peixe residente) e expostos a extratos de pele de coespecíficos.

Além das mudanças comportamentais devido a comunicação química há também mudanças nas respostas de estresse nos peixes (Barreto *et al.*, 2014; Sanches *et al.*, 2015). Frente a um estressor o comportamento de um indivíduo será uma consequência de decisões que serão afetadas pelo estado de desenvolvimento do animal e, também, por experiências prévias (Noakes e Jones, 2016). Essa decisão do animal diante de um estressor culmina numa cascata de eventos fisiológicos que ele tem que lidar (Noakes e Jones, 2016). Dentre esses eventos, dois indicadores de estresse muito importantes são a liberação do hormônio cortisol pelas células interrenais no rim cefálico (Mommsen *et al.*, 1999, Sopinka *et al.*, 2016) e o aumento da glicose sanguínea, através da ação das catecolaminas (Fabbri e Moon, 2016). Oliveira *et al.* (2014) mostraram aumentos dos níveis de cortisol, além da respostas de alarme (*freezing*), em *zebrafish* expostos a extratos de pele de coespecíficos mortos. Estas respostas hormonais seriam antipredatórias e adaptativas (Oliveira *et al.*, 2014), já que aumento dos níveis de cortisol prepara o animal para responder a situações de perigo (Wendelaar Bonga, 1997). Já em tilápia-do-Nilo, houve aumento dos níveis de cortisol em resposta a alarme químico, sem aumento dos níveis de glicose (Sanches *et al.*, 2015). Em estudos com outras espécies expostas a extrato de pele, não se observou alteração na resposta de estresse, como em matrinxã *Brycon amazonicus* (Ide *et al.*, 2003) e jundiá *Rhamdia quelen* (Souza-Bastos *et al.*, 2014).

As respostas até então conhecidas relacionando comunicação química entre coespecíficos são variáveis em diferentes espécies. Além disso, é conhecido que extratos de pele desencadeiam respostas de alarme nos peixes; no entanto o extrato em si é uma forma muito concentrada e não natural de

investigar a resposta de alarme nos peixes, uma vez que em ambiente natural somente o odor de um animal machucado, menos concentrado que o extrato, já deve ser suficiente para desencadear essas respostas de alarme e de estresse. Outro ponto desconhecido na comunicação química é se existe influência da mesma em animais de diferentes condições sociais. Para testar tais hipóteses, escolhemos como modelo o peixe matrinxã, *Brycon amazonicus*, espécie nativa, originária da Bacia Amazônica, bastante utilizada na aquicultura e que apresenta um comportamento bastante ativo de interação social com coespecíficos (Wolkers *et al.*, 2014; Serra *et al.*, 2015).

2. Material e métodos

Foram conduzidos dois experimentos. No experimento 1, utilizamos diferentes concentrações de extrato de peixes e, também, odor de animal machucado, para observamos a amplitude das respostas comportamental e fisiológica de alarme frente a odores de diferentes concentrações. No experimento 2, avaliamos se odores de diferentes condições sociais, extrato de pele e odor de coespecífico machucado modulam a agressividade e desencadeiam respostas de alarme e estresse em matrinxãs.

2.1. Animais e aclimação

Utilizamos um total de 230 juvenis de matrinxã, sendo que no Experimento 1 foram utilizados 69 exemplares ($34,4 \pm 0,86g$) e, no Experimento 2, utilizamos 161 exemplares juvenis ($34,0 \pm 0,37g$). Os peixes foram mantidos em caixas de prolipropileno de 300 L antes do início dos experimentos, a uma densidade de 40 peixes por caixa, com renovação constante de água e temperatura de 27°C. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz (07:00h – 19:00h). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial até a saciedade aparente.

2.2. Tratamentos

No Experimento 1 testamos cinco tratamentos: água pura (AP); extrato de pele controle (EC); extrato de pele menos concentrado (E-); extrato de pele mais

concentrado (E+) e odor de machucado (Mac). O extrato de pele controle utilizado foi preparado conforme Ide *et al.* (2003) e as concentrações utilizadas se basearam no mesmo estudo.

No Experimento 2 testamos seis tratamentos (n=21): água pura (AP) - ausência de odor; extrato de pele (EC) - o mesmo utilizado no Experimento 1 e também por Ide *et al.* (2003); Machucado (Mac) - machucados provocados pelo pesquisador, de forma a imitar o número médio e forma de mordidas a que um matrinxã perdedor é submetido; peixe vencedor (Venc) - que venceu um confronto agressivo; peixe perdedor (Perd) - que perdeu um confronto agressivo e peixe isolado (Isol) - que não passou por interação social.

2.3. Delineamento experimental

O delineamento do Experimento 1 consistiu em testar se extrato de pele e o odor de um animal machucado (simulação de machucados resultantes de interação agressiva) geravam respostas de alarme e de estresse em matrinxãs. Para isso, colocamos os peixes foco isolados em aquários, e após 13 minutos adicionamos as soluções contendo os odores (5 mL) correspondentes a cada tratamento, com mais duas adições subsequentes, em intervalo de treze minutos, totalizando três adições. Para análise da resposta comportamental de alarme contabilizamos a locomoção dos peixes. Após o teste comportamental, os peixes foram anestesiados (benzocaína, 60 mg/L) e o sangue coletado para análise de parâmetros de estresse (concentração sanguínea de cortisol e glicose).

O delineamento do Experimento 2 consistiu em testar se o odor de coespecíficos (peixes doadores) em diferentes condições sociais afeta o comportamento agressivo e a resposta fisiológica de matrinxãs (peixes foco) contra um espelho. Para isso, colocamos os peixes foco isolados em aquários contendo um espelho e após treze minutos do início do confronto agressivo adicionamos os odores correspondentes a cada tratamento, e mais duas adições subsequentes com intervalos de treze minutos, totalizando três adições. Nesse experimento, avaliamos os comportamentos agressivos frente ao espelho (mordida, investida e demonstração) e dados de locomoção do animal (tempo de locomoção, tempo que permaneceu longe do espelho). Após o teste comportamental, os peixes foram anestesiados (benzocaína, 60 mg/L) e o sangue

coletado para análise de parâmetros de estresse (concentração sanguínea de cortisol e glicose).

2.4. Testes comportamentais

2.4.1. Testes comportamentais de alarme Experimento 1

Para os testes comportamentais, os peixes foco foram isolados em aquários por três dias, e no quarto dia transferidos para os aquários teste (30x30x40 cm), preenchidos com 31,80 L de água. Os aquários teste tinham uma cânula fixada, em um dos cantos, para a adição dos odores, que se estendia até a parte de trás de uma cortina, colocada atrás dos aquários para impedir que os peixes visualizassem a câmera de filmagem e a pessoa que fazia a adição dos odores nos aquários. As paredes laterais e do fundo dos aquários foram cobertas com papel pardo para impedir que peixes de aquários adjacentes se visualizassem, e a parede do fundo de cada aquário foi quadriculada para análise da atividade de locomoção (4 quadrantes de 15x20 cm). Uma vez colocados nos aquários, tinha início a filmagem do comportamento dos peixes. Por três vezes, adicionamos a solução do odor do tratamento específico em cada réplica, aos treze, vinte e seis e trinta e nove minutos após a entrada do peixe no aquário. Esse período de 13 minutos é o tempo médio de duração do confronto agressivo antes do estabelecimento de um vencedor na espécie (Serra, 2014). Para garantir que a solução com o odor fosse toda distribuída no aquário, após sua adição, a pessoa responsável pelo procedimento injetava mais 20 mL de água pura e 20 mL de ar na cânula. Comparamos o tempo de locomoção e número de cruzamentos do peixe antes e após as adições. Além disso, analisamos a frequência de resposta bifásica descrito anteriormente para matrinxãs (Ide *et al.*, 2003), que se trata de um breve período inicial que envolve o deslocamento abrupto e aparentemente desorientado e/ou natação rápida, e um segundo período mais longo que o animal permanece imóvel, ou apresenta poucos movimentos. Após a última adição (trinta e nove minutos), os peixes foram filmados por mais treze minutos. Em seguida, foram anestesiados e o sangue foi coletado em seringas contendo EDTA fluoretado por punção caudal para as análises fisiológicas (Item 2.6). A filmagem dos peixes foi de treze minutos após

cada adição, mas os resultados apresentados são de seis minutos e trinta segundos (390 segundos) antes e seis minutos e trinta segundos após cada adição, pois como o período de observação foi longo o efeito do tratamento no comportamento poderia diluir-se. Desse modo, as respostas a cada tratamento foram mais consistentes. No Anexo 1, no final da tese, encontramos tabela com os dados obtidos nos treze minutos de observação. Ao final de cada teste comportamental, os aquários e a cânula eram lavados com sabão e solução de hipoclorito de sódio para que nenhum odor permanecesse no aquário e interferisse nos testes seguintes.

2.4.2. Testes comportamentais de agressividade Experimento 2

Do mesmo modo que no Experimento 1, isolamos os peixes foco por três dias e após isso transferimos os peixes para os aquários teste (30x30x40 cm) contendo 31,80 L de água. Neste experimento os aquários teste tinham um espelho fixo em uma das laterais e uma cânula inserida próxima do espelho, para adição da amostra da água contendo os diferentes odores. O espaço entre o espelho e o vidro do aquário foi vedado com silicone para que nenhum odor permanecesse no vão após a lavagem dos aquários. A cânula de cada aquário estendia-se até a parte de trás de uma cortina, colocada na frente dos aquários, que não permitia aos peixes a visualização das câmeras para filmagem e da pessoa que fazia as adições de odores nos aquários. As paredes laterais e do fundo dos aquários foram cobertas com papel pardo para prevenir que peixes em aquários adjacentes se visualizassem, e a parede do fundo de cada aquário foi quadriculada para análise da atividade de locomoção (4 quadrantes de 15x20 cm). O espelho foi utilizado para desencadear as interações agressivas sem interferência de outro tipo de comunicação que pudesse afetar a informação química avaliada. Ao final de cada teste comportamental, os aquários e a cânula eram lavados com sabão e solução de hipoclorito de sódio para que nenhum odor permanecesse no aquário e interferisse nos testes seguintes.

Momentos antes dos peixes entrarem no aquário experimental, adicionamos 5 mL de água com o odor basal do peixe doador, coletada dos aquários de isolamento dos peixes doadores (água pura no caso dos tratamentos sem odor) e, então, inserimos os peixes foco em seus respectivos aquários teste,

para registro do comportamento. Por três vezes, adicionamos a solução do odor do tratamento específico em cada réplica, sendo que a primeira adição era feita após treze minutos do início do confronto agressivo e mais duas adições com intervalos de treze minutos, totalizando três adições. O período de 13 minutos é o tempo médio de duração do confronto agressivo antes do estabelecimento de um vencedor na espécie. Os 13 minutos iniciais, antes da primeira adição, foi denominado basal. Para garantir que o odor chegasse até o aquário, após a adição dos 5 mL de conteúdo das seringas de cada tratamento inseríamos mais 20 mL de água pura e 20 mL de ar na cânula com uma seringa, até observar através da câmera o momento que saíam bolhas na cânula dentro do aquário. Analisamos o comportamento agressivo - mordida, investida e demonstração agressiva. Além disso, foram comparados o tempo de locomoção, tempo longe do espelho e a resposta bifásica antes das adições e após as adições, avaliando se o odor do coespecífico modula a locomoção e posicionamento do peixe foco. Após a última adição, observamos os peixes por mais treze minutos e então os peixes foram anestesiados (benzocaína, 60 mg/L) e o sangue coletados em seringas contendo EDTA fluoretado, por punção caudal, para análises fisiológicas (Item 2.6). A filmagem dos peixes foi de treze minutos após cada adição, mas os resultados apresentados são de 390 segundos antes após cada adição, pois como o período de observação foi longo o efeito do tratamento no comportamento poderia diluir-se. Desse modo, as respostas a cada tratamento foram mais consistentes. No Anexo 2 e 3 deste Capítulo, encontramos tabela com os dados obtidos nos treze minutos de observação.

2.5. Preparação do extrato de pele, do odor de animal machucado e odores de diferentes condições sociais

Para a preparação do extrato de pele utilizamos três doadores, sendo que o odor de cada doador de pele foi utilizado para quatro peixes de cada tratamento de extrato no Experimento 1 e para sete peixes de cada tratamento de extrato no Experimento 2. Para o tratamento odor de machucado, no experimento 1, utilizamos seis doadores e o odor de cada doador foi utilizado para dois peixes do tratamento. Já no experimento 2, para o tratamento machucado e dos demais tratamentos de diferentes condições sociais utilizamos sete doadores por

tratamento, sendo que o odor de cada doador foi utilizado para três peixes de cada tratamento.

Pesamos os doadores e receptores para que tivessem pesos similares. No Experimento 1 não houve diferença de peso nos tratamentos EC (doadores: $33,9 \pm 3,4$, receptores: $34,1 \pm 1,5$, teste t, $P=0,348$), E- (doadores: $33,9 \pm 3,4$, receptores: $30,7 \pm 1,1$, $P=0,451$), E+ (doadores: $33,9 \pm 3,4$, receptores: $30,5 \pm 1,5$, $P=0,360$), Mac (doadores: $33,9 \pm 1,5$, receptores: $34,8 \pm 0,9$, $P=0,888$). No experimento 2, também, não houve diferença de peso nos tratamentos EC (doadores: $33,9 \pm 3,4$, receptores: $33,7 \pm 1,27$, teste t, $P=0,942$), Mac (doadores: $33,9 \pm 1,55$, receptor: $33,9 \pm 0,91$, $P=0,963$), Venc (doadores: $33,8 \pm 0,95$, receptor: $33,7 \pm 0,47$, $P=0,697$), Perd (doadores: $34,4 \pm 0,89$, receptor: $34,2 \pm 0,49$, $P=0,451$) e, Isol (doadores: $34,9 \pm 1,46$, receptor: $34,2 \pm 0,84$, $P=0,832$).

Os peixes doadores de todos os tratamentos, em ambos os experimentos, foram previamente isolados por três dias em aquários de 10 L para evitar o efeito de interações sociais prévias. Após esse período, coletamos água dos aquários de isolamento, que consistiu no odor basal de cada doador (sem contexto social – odor basal). Essa água foi inserida no aquário experimental, somente no Experimento 2, antes de colocar o peixe para o teste, para aclimatar o peixe ao odor do doador antes das adições experimentais, uma vez que já havia uma informação visual (espelho).

Após o isolamento de três dias, os peixes doadores dos tratamentos Machucado e Extratos foram mantidos por 30 minutos em aquários individuais. Esse tempo de 30 minutos se refere ao tempo de 13min (Serra, 2014), em média, para definição de um embate em matrinxã (quando um dos peixes para de revidar os ataques, apenas fugindo do oponente que venceu o confronto agressivo – Serra *et al.*, 2015) mais 13 minutos, em média, após a definição. Para considerar as variações os peixes permaneceram nos aquários por 30 minutos. Passado esse tempo, os peixes eram transferidos para baldes contendo água e gelo, por 5 minutos, para anestesia. O gelo substituiu os anestésicos para prevenir a interferência de outros odores químicos e para que os peixes permanecessem vivos, pois substâncias como cadaverina e putrescina são liberadas com a morte dos peixes, sinalizando morte para os outros animais (Hussain *et al.*, 2013) e prejudicando os tipos de sinalização alvo deste trabalho. Após a anestesia em gelo, cada peixe doador do tratamento Machucado foi transferido individualmente

para um aquário contendo 10 L de água, onde foram realizados os procedimentos para a simulação de animal machucado, e os peixes doadores dos tratamentos Extratos tiveram a pele removida.

Os procedimentos para obtenção dos extratos de pele foram realizados de acordo com Ide *et al.* (2003). Resumidamente 13,5 cm² de pele foi removido, em ambos os lados, dos doadores e homogeneizado em 100mL de água destilada. O homogenado foi filtrado e foi adicionado água destilada para um volume final de 200 mL. Para mantermos a mesma concentração utilizada por Ide *et al.* (2003), mantivemos a adição em 5,5 µL de extrato por litro de água em cada aquário no tratamento EC, metade dessa concentração no tratamento E- e o dobro no tratamento E+. Esses volumes de extratos de cada tratamento foi diluído nos 5 mL de água armazenado nas seringas para posterior utilização.

No caso do tratamento Machucado, após os 30 minutos no aquário e anestesia em balde contendo gelo, os peixes doadores foram transferidos para o aquário coletor de odor, de 10 L de água. No aquário coletor o peixe teve a pele “mordiscada” 190 vezes (número médio de mordidas desde o início do confronto agressivo até 13 minutos após a definição do confronto agressivo na espécie) por pinça do mesmo tamanho da boca do peixe para reproduzir os ferimentos causados em um confronto agressivo real. Após esse procedimento, os peixes foram imediatamente eutanasiados, por overdose de benzocaína (100 mg/L).

Para os tratamentos Venc e Perd, dois peixes de seus aquários de isolamento foram transferidos para um aquário (30x30x40 cm) onde a interação agressiva foi observada. Treze minutos após a definição do vencedor e do perdedor (quando um dos peixes parou de revidar os ataques, apenas fugindo do oponente que venceu do confronto agressivo – Serra, 2014), os peixes foram rapidamente colocados sob água corrente para remover o odor um do outro e separados em aquários menores (10 L) por três horas, para posterior coleta de água com o odor dos tratamentos vencedor e perdedor. A análise do comportamento dos doadores vencedores e perdedores, seguiu etograma descrito previamente para matrinxã (Serra *et al.*, 2017):

- **Mordidas:** mordidas efetivas em qualquer parte do corpo do oponente;
- **Perseguição:** explosão de movimento (deslocamento rápido) do perseguidor na direção do oponente, que por sua vez foge do agressor, deslocando-se ao menos um quadrante do padrão desenhado no fundo do

aquário. Se quem inicia o movimento é o oponente (fugindo antes do perseguidor se deslocar) ou mesmo se o oponente não fugir do agressor, não se considera perseguição;

- **Colisão:** colisão com o oponente, causada por deslocamento em sua direção, ou desvio da rota na direção do corpo do oponente;

- **Ameaças:** abertura do opérculo e boca, seguido de ondulações do corpo, na direção do oponente.

A diferença no comportamento dos peixes receptores de cada doador dentro de cada tratamento foi avaliada por *One-way* Anova para os dados paramétricos e *Kruskal-Wallis* para os não paramétricos. O número de mordidas dos peixes doadores vencedores foi maior do que nos peixes doadores perdedores (vencedores: $74 \pm 12,60$, perdedor: $6,07 \pm 1,52$, $P < 0,001$).

No Tratamento Isolado, os peixes foram transferidos individualmente para um aquário igual àquele onde ocorreu a interação agressiva dos vencedores e perdedores, para manter a mesma condição, e após 30 minutos (mesmo período em média do tratamento vencedor e perdedor) os peixes foram transferidos individualmente para os aquários menores (10 L) para coleta do odor, também por três horas.

Em todos os tratamentos acima descritos coletamos alíquotas de 5 mL da água do aquário com odor, em seringas de plástico, que foram seladas e congeladas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) para uso posterior. Alíquotas de 5 mL de água pura, da mesma fonte da água usada na coleta dos outros odores, foram congeladas da mesma forma. Os aquários utilizados na coleta de odor e para isolamento dos peixes possuíam aeração e temperatura constantes. Os aquários eram lavados antes de cada uso com uma solução aquosa contendo 2,5% de hipoclorito de sódio (NaClO), para evitar a interferência de odores provenientes de sua utilização prévia, e durante todo o procedimento utilizamos luvas de látex para evitar contaminação com odores humanos.

2.6. Análises fisiológicas da resposta de estresse

Em ambos os experimentos, o sangue coletado após os testes comportamentais foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma, para determinação dos níveis de glicose por método enzimático (Kit

Labtest Glicose PAP Liquiform, Ref. 133) e dos níveis de cortisol pelo método ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DRG International, Inc., USA; Cortisol ELISA, EIA 1887).

2.7. Análise estatística

Os dados foram testados quanto a normalidade e homecedasticidade. Como os dados não eram paramétricos, em ambos os experimentos, mesmo após transformações e retirada de *outliers*, para avaliar o efeito dos tratamentos no comportamento do animal e comparar a atividade do animal com as adições, analisamos cada tratamento ao longo do tempo (antes das adições, e após as adições 1, 2 e 3) separadamente por *one-way* Anova para medidas repetidas quando os dados eram normais e homocedásticos, e *Kruskal-Wallis* quando os dados não cumpriam essas premissas; em ambos o pós-teste utilizado foi Tukey. Adicionalmente, comparamos os comportamentos de cada tratamento em cada tempo de adição (antes e após as adições 1, 2 e 3). Nesse caso, utilizamos *One-way* Anova com teste de Tukey como pós teste. Os indicadores de estresse, cortisol e glicose sanguíneos, foram comparados entre os cinco tratamentos, em ambos os experimentos, por *One-way* Anova e, como pós-teste foi utilizado teste de Tukey. As frequências de ocorrência da resposta bifásica foram comparadas pelo teste de proporção de Goodman. Em todas as análises, o nível de significância estabelecido foi de 5%.

3. Nota ética

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil, protocolo (7.725/2016).

4. Resultados

4.1. Resultados Experimento 1

4.1.1. Tempo de locomoção ao longo das adições dos odores em cada tratamento

O tempo de locomoção modificou-se ao longo do tempo nos tratamentos AP ($F=4,736$, $P=0,007$, Figura 1a), EC ($F=99,974$, $P<0,001$, Figura 1b), E- ($F=36,900$, $P<0,001$, Figura 1c), E+ ($F=52,103$, $P<0,001$, Figura 1d) e Mac ($F=11,320$, $P<0,001$, Figura 1e). Os peixes do tratamento AP reduziram o tempo de locomoção após a adição 3 ($P=0,004$, Figura 1a), em relação ao período basal, nos 390 segundos de observação. Também houve redução no tempo de locomoção após as adições 1, 2 e 3, em relação ao período basal, nos tratamentos EC ($P<0,001$, Figura 1b), E- ($P<0,001$, Figura 1c) e E+ ($P<0,001$, Figura 1d). Já no tratamento Mac a redução do tempo de locomoção foi após as adições 2 e 3 ($P<0,001$, Figura 1e) em relação ao período basal. Ainda no tratamento Mac, houve redução do tempo de locomoção após a adição 3 ($P<0,001$), em relação a adição 1.

4.1.2. Número de cruzamentos nos quadrantes ao longo das adições dos odores em cada tratamento

O número de cruzamentos modificou-se ao longo do tempo nos tratamentos AP ($F=2,775$, $P=0,057$, Figura 2a), EC ($F=31,649$, $P<0,001$, Figura 2b), E- ($F=32,059$, $P<0,001$, Figura 2c), E+ ($F=56,586$, $P<0,001$, Figura 2d) e Mac ($F=13,623$, $P<0,001$, Figura 2e). Houve redução no número de cruzamentos após as adições 1, 2 e 3, em relação ao período basal, nos tratamentos EC ($P<0,001$, Figura 2b), E- ($P<0,001$, Figura 2c), E+ ($P<0,001$, Figura 2d). No tratamento Mac houve também redução no número de cruzamentos nas adições 1 ($P=0,012$), 2 e 3 ($P<0,001$, Figura 2e).

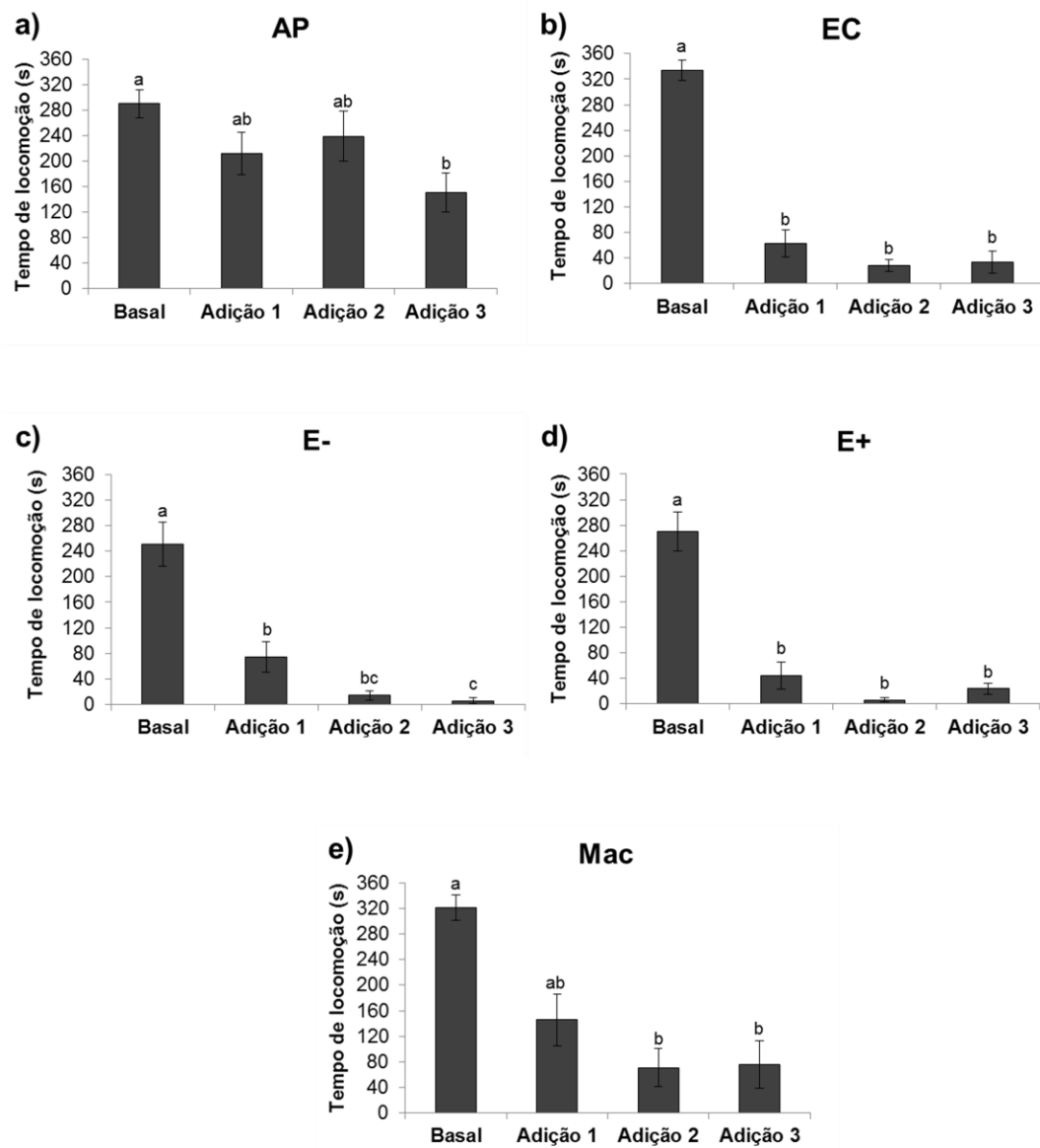


Figura 1. Tempo em segundos (média ± E.P) que o peixe se locomoveu no tempo basal (pré-adições) e após as adições de odor 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way* Anova para medidas repetidas. O teste de Tukey foi utilizado como pós teste. Letras diferentes mostram diferenças entre as adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; E- = extrato negativo; E+ = extrato positivo; Mac = machucado.

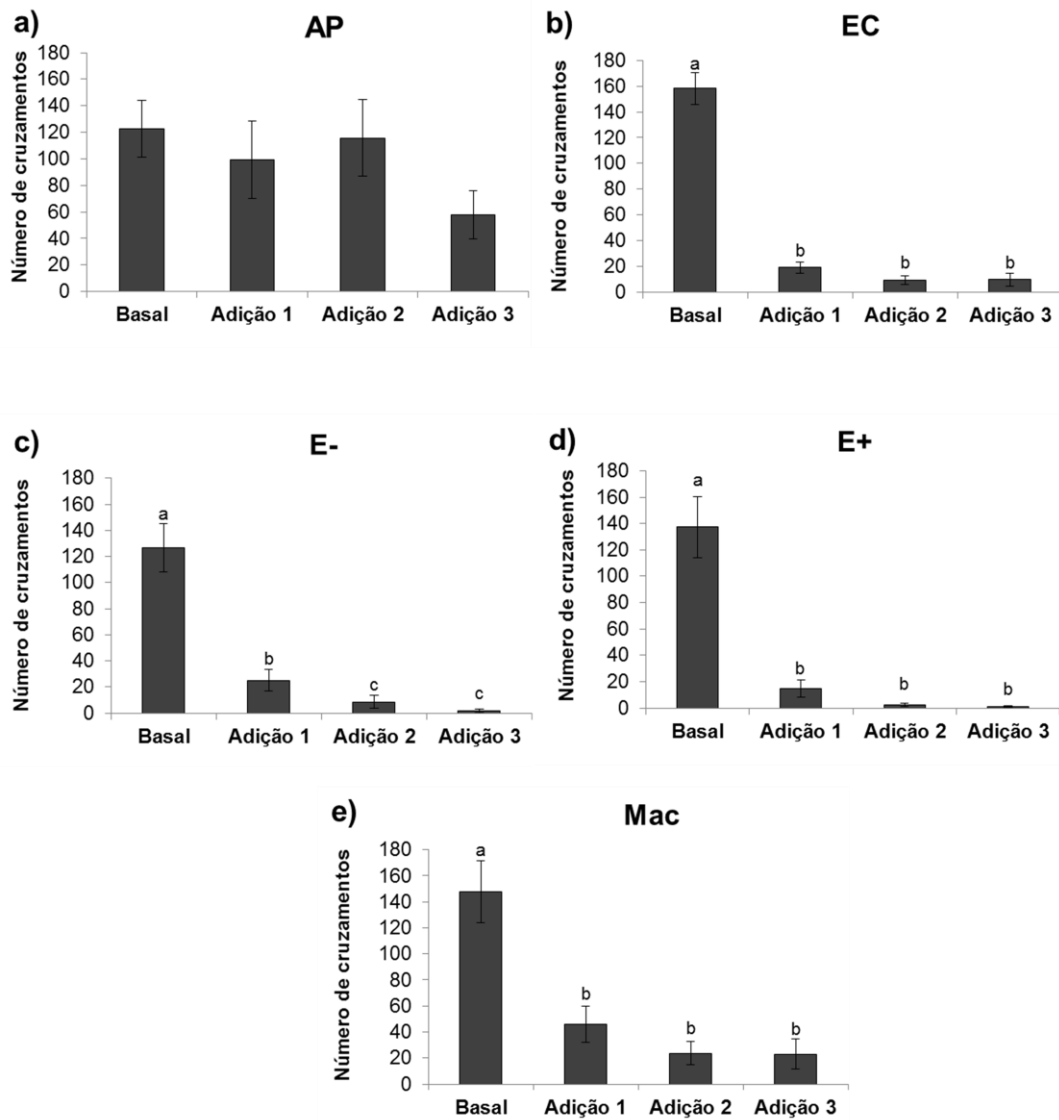


Figura 2. Número de vezes (média \pm E.P) que os peixes cruzaram os quadrantes do aquário no tempo basal e após as três adições (1 aos 13 min), (2 aos 26 min) e (3 aos 39 min). O comportamento foi analisado nos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way* Anova para medidas repetidas e teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença entre as adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; E- = extrato negativo; E+ = extrato positivo; Mac = machucado.

4.1.3. Frequência de resposta bifásica

A frequência de resposta bifásica foi significativa quando comparados os tratamentos AP e EC (Teste de Goodman, $G_{\text{calculado}}=3,464$, Tabela 1) e, também quando comparados os tratamentos EC e E- (Teste de Goodman, $G_{\text{calculado}}=3,464$, Tabela 1).

Tratamentos	$G_{\text{calculado}}$	Diferença estatística
AP x EC	3,464	Sim
AP x E+	2,000	Não
AP x E-	0	Não
AP x Mac	1,549	Não
EC x E+	1,309	Não
EC x E-	3,464	Sim
EC x Mac	1,851	Não
E+ x E-	2,000	Não
E+ x Mac	0,505	Não
E- x Mac	1,549	Não
$G_{\text{crítico}}=2,81$		

Tabela 1: Frequência de resposta bifásica entre os tratamentos AP, EC, E-, E+ e Mac. Teste de Goodman. AP = água pura; EC = extrato controle; E- = extrato negativo; E+ = extrato positivo; Mac = machucado.

4.1.4. Comparação entre tratamentos no período basal e nas adições 1, 2 e 3.

4.1.4.1. Período basal

Os peixes dos tratamentos AP, EC, E-, E+ e Mac não apresentaram diferenças estatísticas no tempo de locomoção ($H=8,986$, $P=0,061$, Tabela 2) e no número de cruzamentos nos aquários ($F=0,519$; $P=0,722$, Tabela 2) no período basal.

4.1.4.2. Adições 1, 2 e 3 dos diferentes odores

Na adição 1, foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no tempo de locomoção ($F=5,583$; $P<0,001$, Tabela 2) e, também, no número de cruzamentos ($F=5,444$; $P<0,001$, Tabela 2). O tempo de locomoção e o número de cruzamentos reduziu nos tratamentos EC, E- e E+ ($P<0,001$), em relação ao tratamento AP.

Na adição 2, foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no tempo de locomoção ($F=15,992$, $P < 0,001$, Tabela 2) e, também, no número de cruzamentos ($H=22,267$, $P < 0,001$, Tabela 2). O tempo de locomoção reduziu nos tratamentos EC, E-, E+ e Mac ($P<0,001$), em relação ao tratamento AP. Já no número de cruzamentos na adição 2 a redução foi nos tratamentos EC, E- e E+ ($P<0,001$), em relação ao tratamento AP.

Na adição 3, foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no tempo de locomoção ($F=5,583$; $P<0,001$, Tabela 2) e, também, no número de cruzamentos ($F=5,444$; $P<0,001$, Tabela 2). O tempo de locomoção e o número de cruzamentos reduziu nos tratamentos EC, E- e E+ ($P<0,001$), em relação ao tratamento AP.

Adições	Comportamento	Tratamentos				
		AP	EC	E-	E+	Mac
Basal	Tempo locomoção (s)	290,0 ± 22,0	334,1 ± 15,8	250,4 ± 34,5	270,3 ± 30,8	321,1 ± 19,7
	Nº de cruzamentos	122,7 ± 21,3	158,1 ± 12,2	126,7 ± 18,7	137,2 ± 23,3	147,6 ± 23,8
Adição 1	Tempo locomoção (s)	211,9 ± 33,6 a	62,8 ± 21,3 b	74,1 ± 23,3 b	44,2 ± 21,1 b	145,4 ± 40,8 ab
	Nº de cruzamentos	99,3 ± 29,4 a	19,0 ± 4,5 b	25,1 ± 8,3 b	14,8 ± 6,3 b	45,9 ± 13,8 ab
Adição 2	Tempo locomoção (s)	238,8 ± 38,8 a	28,2 ± 9,7 b	14,0 ± 7,1 b	6,1 ± 3,3 b	70,5 ± 29,6 b
	Nº de cruzamentos	115,6 ± 28,7 a	9,4 ± 3,3 b	8,6 ± 5,1 b	2,5 ± 1,3 b	23,6 ± 9,0 ab
Adição 3	Tempo locomoção (s)	150,6 ± 30,0 a	33,6 ± 16,9 b	5,2 ± 4,5 b	23,7 ± 8,3 b	76 ± 37,1 ab
	Nº de cruzamentos	58,0 ± 18,2 a	9,5 ± 5,1 b	1,5 ± 1,4 b	0,9 ± 0,6 b	23,0 ± 11,6 ab

Tabela 2. Tempo de locomoção e número de cruzamentos (média ± E.P) nos tratamentos dentro de cada adição. Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way* Anova (Locomoção: adição 1, 2; Cruzamentos: basal e adição 1). Nesse caso, letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos dentro de cada adição ($P<0,001$). *Kruskal-Wallis* (Locomoção: basal e adição 3; Cruzamentos: adição 2 e 3). Nesse caso, letras diferentes indicam diferença entre os tratamentos dentro de cada adição ($P<0,001$). Em ambos os casos, o teste de Tukey foi pós teste utilizado. AP = água pura; EC = extrato controle; E- = extrato negativo; E+ = extrato positivo; Mac = machucado.

4.1.5. Parâmetros fisiológicos de estresse – cortisol e glicose

Não observamos diferenças significativas nos níveis de cortisol plasmático entre os peixes dos tratamentos AC, EC, E+, E- e Mac ($F=2,461$, $P=0,037$, **Figura 3a**). Do mesmo modo, não observamos diferenças significativas nos níveis de

glicose plasmática entre os peixes dos tratamentos Água, EC, E-, E+ e Mac ($F=0,658$, $P=0,624$, **Figura 3b**).

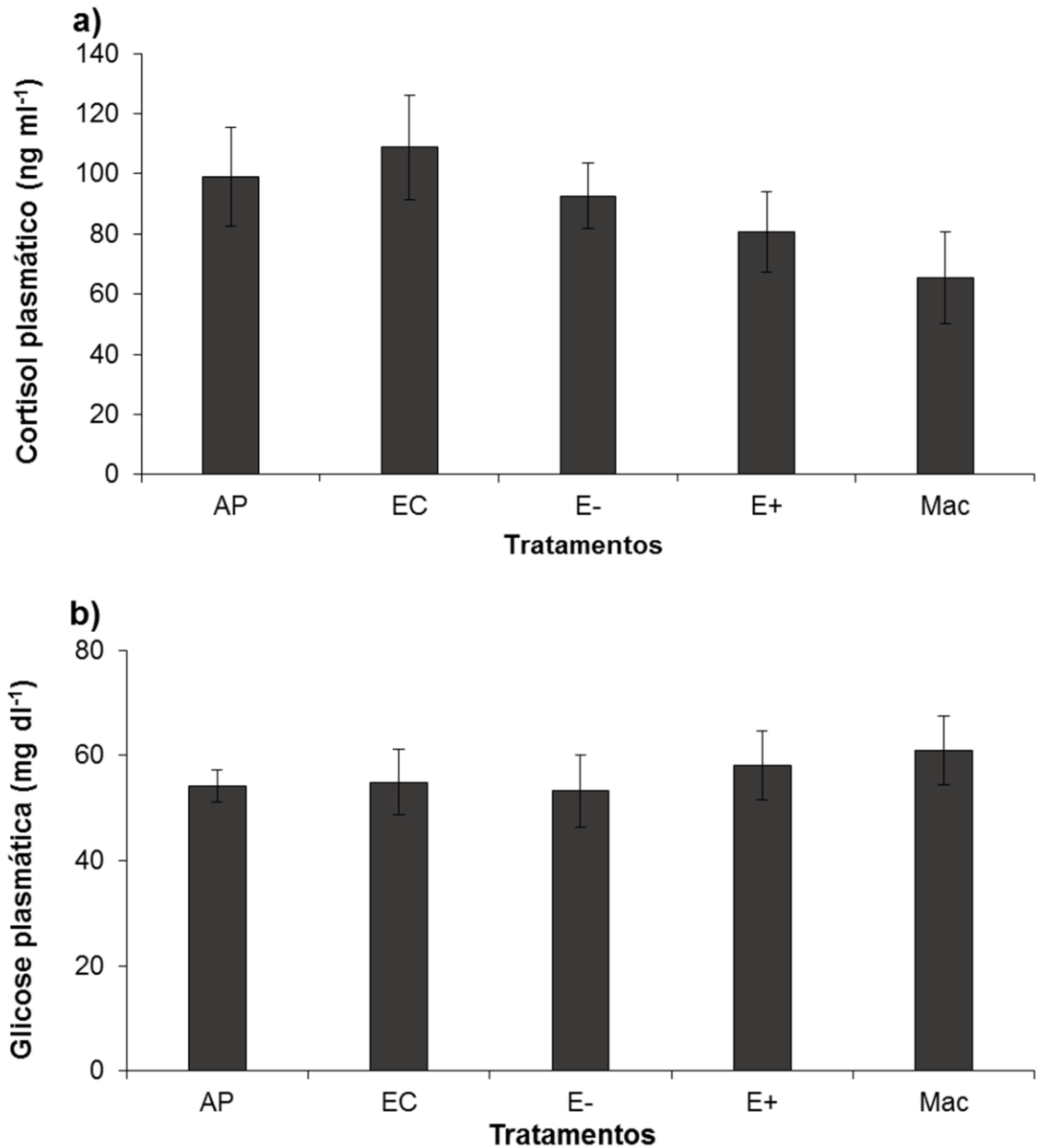


Figura 3. Concentrações plasmáticas (média \pm EP) de cortisol (A) e glicose (B) de peixes dos tratamentos AP, EC, E-, E+ e Mac. *One-way Anova* ($P=0,037$ e $P=0,624$, respectivamente). AP = água pura; EC = extrato controle; E- = extrato negativo; E+ = extrato positivo; Mac = machucado.

4.2. Resultados Experimento 2

4.2.1. Número de mordidas ao longo das adições dos odores em cada tratamento

Não houve diferença no número de mordidas ao longo do tempo nos tratamentos AP (Chi-square=2,809, P=0,422, Figura 4a), Venc (Chi-square=3,750, P=0,290, Figura 4d), Perd (F=1,195, P=0,320, Figura 4e) e Isol (Chi-square=8,713, P=0,033, Figura 4f).

O número de mordidas modificou-se ao longo do tempo nos tratamentos EC (F=16,832; P<0,001, Figura 4b) e Mac (F=4,125, P=0,010, Figura 4c). No tratamento EC, houve redução no número de mordidas após as adições 1, 2 e 3 (P<0,001), em relação ao período basal, nos 390 segundos de observação. Já no tratamento Mac, o número de mordidas aumentou após a adição 3, em relação ao período basal (P=0,007) e em relação à adição 1 (P=0,002), nos 390 segundos de observação.

4.2.2. Número de demonstrações ao longo das adições dos odores em cada tratamento

O número de demonstrações modificou-se ao longo do tempo nos tratamentos AP (H=18,701, P<0,001, Tabela 3), EC (F=31,254, P<0,001, Tabela 3), Mac (F=4,185, P=0,009, Tabela 3), Venc (F=8,271, P<0,001, Tabela 3), Perd (F=12,440, P<0,001, Tabela 2) e Isol (F=6,957, P<0,001, Tabela 3).

Houve redução no número demonstrações após as adições 2 e 3, em relação ao período basal, nos tratamentos AP (P<0,05, Tabela 3), Venc e Isol (P<0,001, Tabela 3). Ainda, no tratamento Isol, houve redução do número de demonstrações após as adições 2 e 3, em relação à adição 1 (P<0,001, Tabela 3), ambos nos 390 segundos de observação. No entanto, no tratamento EC e Perd, houve redução no número de demonstrações após as adições 1, 2 e 3 (P<0,001, Tabela 3), em relação ao período basal, nos 390 segundos de observação. No tratamento Perd, também houve redução do número de demonstrações após a adição 3, em relação a adição 1 (P<0,001, Tabela 3). Já no tratamento Mac, houve redução no número de demonstrações após a adição 3 (P<0,001), em relação ao período basal, nos 390 segundos de observação.

4.2.3. Número de investidas ao longo das adições dos odores em cada tratamento

Não foram encontradas diferenças significativas no número de investidas nos tratamentos AP (Chi-square=6,636, P=0,084, Tabela 3), EC (Chi-square=8,829, P=0,032, Tabela 3), Mac (Chi-square=14,094, P=0,003, Tabela 3), Venc (Chi-square=3,667, P=0,300, Tabela 3), Perd (Chi-square=10,790, P=0,013, Tabela 3) e Isol (Chi-square=5,857, P=0,119, Tabela 3) antes e após as adições dos odores.

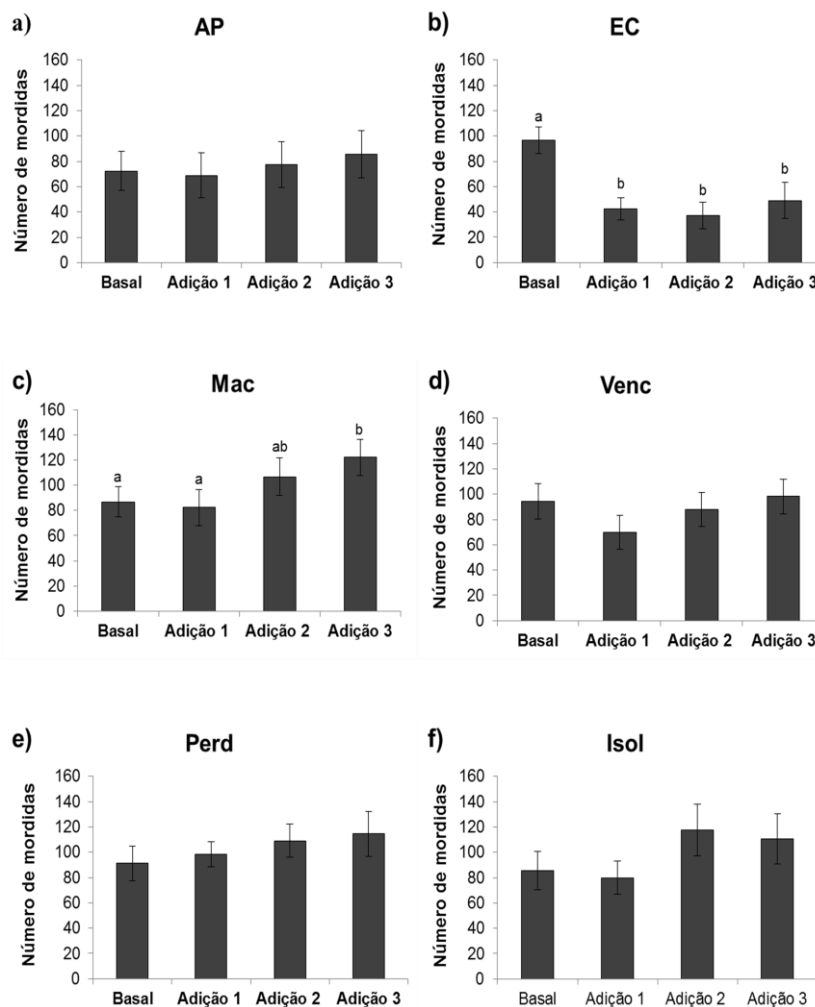


Figura 4. Número de mordidas (média ± E.P) antes das adições (basal) e após as adições 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way* Anova para medidas repetidas (tratamento extrato e machucado); *Kruskal-Wallis* (tratamento água, vencedor, perdedor e isolado). Letras diferentes mostram diferenças entre as

adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.

Comportamento analisado	Tratamentos	Adições a cada treze minutos			
		Basal	Após adição 1	Após adição 2	Após adição 3
Número de demonstrações	AP	30,1 ± 4,8 a	23,7 ± 5,1 ab	20,4 ± 5,0 b	15,3 ± 4,6 b
	EC	27,5 ± 5,0 a	10,2 ± 2,7 b	4,0 ± 1,6 c	2,8 ± 1,9 c
	Mac	28,6 ± 5,3 a	12,9 ± 3,2 ab	17,6 ± 5,2 ab	15,4 ± 5,1 b
	Venc	21,6 ± 5,4 a	11,1 ± 2,7 ab	10,3 ± 3,6 b	10,4 ± 3,1 b
	Perd	22,9 ± 3,8 a	15,7 ± 4,2 b	13,6 ± 4,7 bc	11,8 ± 6,2 c
	Isol	27,0 ± 5,9 a	23,1 ± 5,4 ab	17,1 ± 5,3 c	15,0 ± 4,2 c
Número de investidas	AP	1,8 ± 1,5	0,2 ± 0,2	0	0
	EC	0,7 ± 0,5	0,6 ± 0,6	0,04 ± 0,04	0
	Mac	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0	0
	Venc	0,1 ± 0,1	0,04 ± 0,04	0	0
	Perd	1,7 ± 0,8	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
	Isol	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0	0

Tabela 3. Número (média ± E.P) de demonstrações e investidas no tempo basal e após as adições 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way* Anova para medidas repetidas (número de demonstrações: tratamento EC, Mac, Venc, Perd e Isol); *Kruskal-Wallis* (número de demonstrações: tratamento AP; número de investidas: todos os tratamentos). Letras diferentes mostram diferenças entre as adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.

4.2.4. Tempo de locomoção ao longo das adições dos odores em cada tratamento

Não foram encontradas diferenças significativas no tempo de locomoção nos tratamentos AP (Chi-square=1,811, $P=0,613$, **Tabela 4**), Mac (Chi-square=0,107, $P=0,991$), Venc (Chi-square=3,866, $P=0,276$), Perd (Chi-square=6,898, $P=0,075$) e Isol (Chi-square=2,238, $P=0,525$) antes e após as adições dos odores.

No tratamento EC, o tempo de locomoção do animal reduziu ao longo tempo ($F=14,567$, $P < 0,001$, **Tabela 4**). Houve redução no tempo de locomoção após as adições 1, 2 e 3 ($P < 0,001$), em relação ao período basal, nos 390 segundos de observação.

4.2.5. Tempo que o peixe permaneceu longe do espelho ao longo das adições dos odores em cada tratamento

Não foram encontradas diferenças significativas no tempo que o peixe permaneceu longe do espelho nos tratamentos Venc ($F=1,563$, $P=0,208$, Tabela 4), Perd ($\text{Chi-square}= 13,518$, $P=0,031$, Tabela 4) e Isol ($\text{Chi-square}= 5,058$, $P = 0,168$, Tabela 4).

O tempo que o peixe permaneceu longe do espelho modificou-se ao longo do tempo nos tratamentos AP ($\text{Chi-square}=20,650$, $P<0,05$, Tabela 4), EC ($F=5,565$; $P=0,002$, Tabela 4) e Mac ($F=5,154$, $P=0,003$, Tabela 4). Houve redução no tempo que o peixe permaneceu longe do espelho após as adições 2 e 3, nos tratamentos AP e Mac ($P<0,05$). Já no tratamento EC, houve redução do tempo que o peixe permaneceu longe do espelho após a adição 1, em relação à adição basal ($P=0,001$) e, também, redução após a adição 3, em relação à adição 1 ($P<0,001$), ambos nos 390 segundos de observação.

Comportamento analisado	Tratamentos	Adições a cada treze minutos			
		Basal	Após adição 1	Após adição 2	Após adição 3
Tempo (s) de locomoção	AP	339,6 ± 24,2	316,7 ± 25,1	302,8 ± 32,9	360,4 ± 18,7
	EC	369,5 ± 10,8 a	232,4 ± 35,2 b	210,0 ± 34,7 b	176,9 ± 38,8 b
	Mac	321,3 ± 23,9	307,5 ± 27,0	309,4 ± 26,5	307,8 ± 27,5
	Venc	311,7 ± 30,5	284,8 ± 32,1	287,4 ± 31,8	271,2 ± 31,4
	Perd	319,5 ± 22,5	307,0 ± 19,8	324,0 ± 20,6	342,8 ± 20,6
	Isol	317,5 ± 25,0	320,5 ± 20,4	351,0 ± 14,3	339,6 ± 17,2
Tempo (s) longe do espelho	AP	7,5 ± 1,6 a	3,2 ± 1,0 ab	1,6 ± 0,9 b	2,9 ± 1,7 b
	EC	3,3 ± 1,7 a	8,8 ± 2,7 b	4,7 ± 2,1 ab	4,9 ± 3,3 a
	Mac	11,2 ± 3,5 a	8,0 ± 3,3 ab	1,7 ± 1,1 b	0,8 ± 0,4 b
	Venc	11,9 ± 6,2	22,6 ± 18,4	5,3 ± 3,3	1,6 ± 0,7
	Perd	8,6 ± 3,5	8,6 ± 7,2	1,5 ± 1,3	19,2 ± 18,5
	Isol	8,8 ± 6,9	18,1 ± 14,4	8,7 ± 3,8	4,1 ± 3,9

Tabela 4. Tempo (segundos; média ± E.P) de locomoção e tempo que o peixe permaneceu longe do espelho no tempo basal e após as adições 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way* Anova para medidas repetidas (tempo longe do espelho: tratamento EC, Mac e Perd; tempo locomoção: EC, Venc e Perd); *Kruskal-Wallis* (tempo longe do espelho: tratamento AP, Perd e Isol; tempo locomoção: AP, Mac e Isol); em ambos os casos, o teste de Tukey foi utilizado como pós teste. Letras diferentes mostram diferenças entre as adições ($P<0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.

4.2.6. Frequência de resposta bifásica

Não houve resposta bifásica em nenhum dos tratamentos neste experimento.

4.2.7. Comparação entre os tratamentos no período basal e nas adições 1, 2 e 3

4.2.7.1. Período basal

Os peixes dos tratamentos AP, EC, Mac, Venc, Perd e Isol não apresentaram diferença estatística no número de mordidas ($H=0,486$, $P=0,029$, Tabela 5), investidas ($H=8,999$, $P=0,109$, Tabela 5) e demonstrações ($F=0,383$, $P=0,860$, Tabela 5) no período basal.

Os peixes dos tratamentos AP, EC, Mac, Venc, Perd e Isol não apresentaram diferença estatística no tempo que o animal permaneceu longe do espelho ($H=10,180$, $P=0,070$, Tabela 6) e no tempo de locomoção ($H=3,866$, $P=0,569$, Tabela 6) na adição basal.

4.2.7.2. Adições 1, 2 e 3 dos diferentes odores

Na adição 1, não foram encontradas diferenças significativas no número de demonstrações ($F=1,853$, $P=0,108$, Tabela 5) e investidas ($H=2,375$, $P=0,795$, Tabela 5) e, também, no tempo de locomoção ($H=5,052$, $P=0,410$, Tabela 6) e no tempo que o peixe permaneceu longe do espelho ($H=8,883$, $P=0,114$, Tabela 6). Na adição 1, foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no número de mordidas ($F=2,588$, $P=0,029$, Tabela 5), que diminuiu no tratamento EC, em relação aos tratamentos AP, Mac, Venc, Perd e Isol ($P<0,001$).

Na adição 2, não foram encontradas diferenças significativas no número de demonstrações ($H=12,097$, $P=0,033$, Tabela 5) e investidas ($H=7,114$, $P=0,212$, Tabela 5) e, também, no tempo de que o peixe permaneceu longe do espelho ($H=6,802$, $P=0,236$, Tabela 6). Foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no número de mordidas ($F=5,798$, $P<0,001$, Tabela 5) e

demonstrações ($H=12,097$, $P=0,033$, Tabela 5), e, também no tempo de locomoção ($H=16,968$, $P=0,005$, Tabela 6). O número de mordidas reduziu no tratamento EC, em relação aos tratamentos AP, Mac, Venc, Perd e Isol ($P<0,001$). Já no número de demonstrações a redução ocorreu no tratamento EC, em relação ao tratamento AP ($P<0,05$). Ainda na adição 2, foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no tempo de locomoção dos peixes ($H=16,968$, $P=0,005$, Tabela 6), que diminuiu no tratamento EC, em relação aos tratamentos AP e Isol ($P<0,05$).

Na adição 3, não foram encontradas diferenças significativas no número de demonstrações ($H=11,015$, $P=0,051$, Tabela 5) e investidas ($H=5,0$, $P=0,416$, Tabela 5) e, também, no tempo de que o peixe permaneceu longe do espelho ($H=1,664$, $P=0,893$, Tabela 6). Foram encontradas diferenças significativas, entre os tratamentos, no número de mordidas ($F=4,718$, $P<0,001$, **Tabela 5**) e no tempo de locomoção dos peixes ($H=21,634$, $P<0,001$, **Tabela 6**). O número de mordidas reduziu no tratamento EC ($P<0,001$), em relação aos tratamentos AP, Mac, Venc, Perd e Isol e, o tempo de locomoção reduziu no tratamento EC ($P<0,05$), em relação aos tratamentos AP, Perd e Isol ($P<0,05$).

Adições	Comportamento (quantidade)	Tratamentos					
		AP	EC	Mac	Venc	Perd	Isol
Basal	Mordidas	72,4 ± 7,8	96,7 ± 10,5	86,9 ± 11,8	94,4 ± 14,1	91,1 ± 13,6	85,6 ± 15,2
	Investidas	1,8 ± 1,5	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,7 ± 0,8	0,3 ± 0,3
	Demonstrações	30,1 ± 4,8	27,5 ± 5,0	28,6 ± 5,3	21,6 ± 5,4	22,9 ± 3,8	27,0 ± 5,9
Adição 1	Mordidas	68,9 ± 8,7 a	42,3 ± 8,9 b	82,3 ± 14,2 a	69,9 ± 13,3 a	98,2 ± 9,8 a	79,9 ± 13,0 a
	Investidas	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,04 ± 0,04	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	Demonstrações	23,7 ± 5,1	10,2 ± 2,7	12,9 ± 3,2	11,1 ± 2,7	15,7 ± 4,2	23,1 ± 5,4
Adição 2	Mordidas	77,6 ± 9,8 a	37,1 ± 10,5 b	106,9 ± 15,0 a	87,9 ± 13,2 a	108,9 ± 13,1 a	117,8 ± 20,4 a
	Investidas	0	0,04 ± 0,04	0	0	0,1 ± 0,1	0
	Demonstrações	20,4 ± 5,0 a	4,0 ± 1,6 b	17,6 ± 5,2 ab	10,3 ± 3,6 ab	13,6 ± 4,7 ab	17,1 ± 5,3 ab
Adição 3	Mordidas	85,5 ± 9,0 a	48,9 ± 14,2 b	122,2 ± 14,3 a	98,2 ± 13,5 a	114,4 ± 17,5 a	110,5 ± 19,8 a
	Investidas	0	0	0	0	0,2 ± 0,2	0
	Demonstrações	15,3 ± 4,6	2,8 ± 1,9	15,4 ± 5,1	10,4 ± 3,1	11,8 ± 6,2	15,0 ± 4,2

Tabela 5. Número (média ± E.P) de mordidas, investidas e demonstrações nos tratamentos, dentro de cada adição de odores. Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição. *One-way Anova* (Mordidas: adição 1, 2 e 3; Demonstração: basal e adição 1; Nesse caso, letras diferentes mostram diferenças entre os tratamentos dentro de cada adição ($P<0,001$). *Kruskal-Wallis* (Mordidas: basal; Demonstração: adição 2 e 3; Investida: todos os tratamentos). Nesse caso, letras diferentes mostram diferenças entre os tratamentos dentro de cada adição ($P<0,001$). Em ambos os casos, o teste de Tukey foi utilizado como

pós teste. AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.

Adições	Comportamento tempo (s)	Tratamentos					
		AP	EC	Mac	Venc	Perd	Isol
Basal	Locomoção	339,6 ± 24,2	369,5 ± 10,8	321,3 ± 23,9	311,7 ± 30,5	319,5 ± 22,5	317,5 ± 25,0
	Longe do espelho	7,5 ± 1,6	3,3 ± 1,7	11,2 ± 3,5	11,9 ± 6,2	8,6 ± 3,5	8,8 ± 6,9
Adição 1	Locomoção	316,7 ± 25,1	232,4 ± 35,2	307,5 ± 27,0	284,8 ± 32,1	307,0 ± 19,8	320,5 ± 20,4
	Longe do espelho	3,2 ± 1,0	8,8 ± 2,7	8,0 ± 3,3	22,6 ± 18,4	8,6 ± 7,2	18,1 ± 14,4
Adição 2	Locomoção	302,8 ± 32,9 a	210,0 ± 34,7 b	309,4 ± 26,5 ab	287,4 ± 31,8 ab	324,0 ± 20,6 ab	351,0 ± 14,3 a
	Longe do espelho	1,6 ± 0,9	4,7 ± 2,1	1,7 ± 1,1	5,3 ± 3,3	1,5 ± 1,3	8,7 ± 3,8
Adição 3	Locomoção	360,4 ± 18,7 a	176,9 ± 38,9 b	307,8 ± 27,5 ab	271,2 ± 31,4 ab	342,8 ± 20,6 a	339,6 ± 17,3 a
	Longe do espelho	2,9 ± 1,7	4,9 ± 3,3	0,8 ± 0,4	1,6 ± 0,7	19,2 ± 18,5	4,1 ± 3,9

Tabela 6. Tempo (segundos; média ± E.P) que o peixe locomoveu e permaneceu longe do espelho nos tratamentos, dentro de cada adição. Os comportamentos foram analisados nos últimos 390 segundos antes da primeira adição e nos 390 segundos imediatamente após cada adição *Kruskal-Wallis* (Locomoção e longe do espelho: basal, adição 1, 2 e 3). O teste de Tukey foi utilizado como pós teste. Letras diferentes mostram diferenças entre os tratamentos dentro de cada adição ($P < 0,05$). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.

4.2.8. Parâmetros fisiológicos de estresse – cortisol e glicose

Não observamos diferenças significativas nos níveis de cortisol plasmático entre os peixes dos tratamentos AP, EC, Mac, Venc, Perd e Isol ($H=8,079$, $P=0,152$, Figura 5a). Do mesmo modo, não observamos diferenças significativas nos níveis de glicose plasmática entre os peixes dos tratamentos AP, EC, Mac, Venc, Perd e Isol ($F= 1,370$, $P= 0,241$, Figura 5b).

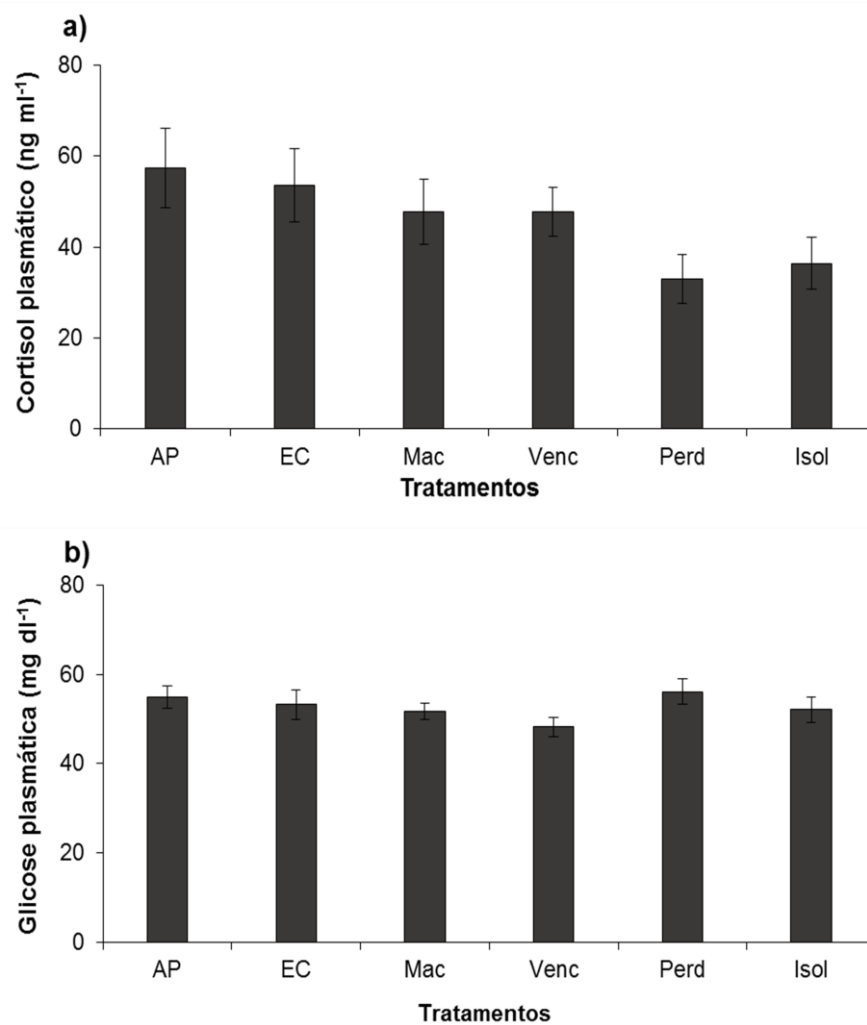


Figura 5. Concentrações plasmáticas (média \pm EP) de cortisol (A) e glicose (B) de peixes dos tratamentos AP, EC, Mac, Venc, Perd e Isol. *One-way Anova* ($P=0,037$ e $P=0,624$, respectivamente). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor e Isol = isolado.

5. DISCUSSÃO

Observamos que o estímulo (odor) proveniente de um animal com machucados, que atingiram camadas mais superficiais da pele, foi suficiente para induzir resposta comportamental de alarme em matrinxãs isolados, da mesma forma que o estímulo proveniente do extrato de pele nas diferentes diluições utilizadas. No entanto, embora o odor de peixe machucado provoque resposta de alarme em matrinxãs isolados, o mesmo aumenta a agressividade dos peixes no contexto agressivo. O odor de coespecíficos em outras condições (isolado,

vencedor, perdedor) e a exposição à água pura não promoveram aumento da agressividade ao longo do tempo, e o tratamento EC reduziu a agressividade, o que indica que o extrato de pele é um estímulo mais intenso que mesmo em contexto agressivo ainda provoca resposta de alarme. Além disso, nenhum dos estímulos, em ambos os estudos, provocou respostas de estresse nos peixes. Essa resposta pode ser atribuída a característica da resposta de alarme (redução de locomoção, ou até mesmo permanecendo parado) não requerer um grande aporte energético e, por isso, não termos observado aumento dos níveis de cortisol e glicose. No entanto, também é viável pensar que essa pode ser uma característica da espécie, uma maior resistência ao estresse.

Um aspecto a ser considerado é o fato de analisarmos os resultados observados nos 390 segundos antes da primeira adição de odores no aquário e nos 390 segundos após cada adição, quando o tempo de observação foi de treze minutos para cada adição. Em ambos os experimentos, apesar dos resultados apresentarem perfil semelhante em ambos os períodos de tempos, em seis e treze minutos (resultados do tempo total de 13 min se encontram em tabela no ANEXO 1, 2 e 3), o comportamento dos peixes se diluiu com tempo. Por se tratar de um longo período de observação, o tempo, por si, já poderia reduzir a atividade de locomoção dos peixes, interferindo na resposta aos odores. Desse modo, utilizando a análise com 390 segundos após as adições, obtivemos respostas mais consistentes, com a reação imediata à exposição dos peixes aos odores.

Outro aspecto a ser considerado é se a utilização de animais isolados como no Experimento 1 poderia afetar a resposta comportamental. Rehnberg e Smith (1988) testaram substância de alarme em peixes zebra, *Brachydanio rerio*, isolados e agrupados, e em ambas condições observaram respostas comportamentais semelhantes. Levamos em consideração, ainda, que outros tipos de comunicação, como por exemplo a visual, poderia afetar as respostas. Sabe-se que a comunicação visual é tão eficiente que algumas fêmeas podem desovar comunicando-se apenas visualmente com machos, na ausência de sinais químicos (Castro *et al.*, 2009). Assim, optamos por usar animais isolados para limitar as respostas ao efeito dos tratamentos, ou seja, apenas comunicação química.

No Experimento 2, utilizamos o espelho no lugar de um oponente real; essa escolha ocorreu para evitar que outro tipo de comunicação pudesse influenciar na

resposta referente à comunicação química. Além disso, o espelho tem sido amplamente utilizado em estudos com interações agressivas em peixes (eg. Holtby *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 2003; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2006; Ros *et al.*, 2006). Sabe-se que os peixes não reconhecem sua imagem no espelho e brigam com ela como se fosse um oponente (eg. Ruzzante, 1992; Dejardin & Fernald, 2010; Reddon *et al.*, 2012). Mais ainda, uma das vantagens do uso do espelho é o controle do “opponente virtual” e, dessa forma, o resultado é atribuído apenas ao comportamento do indivíduo focal (Baenninger, 1968).

No tempo basal, em ambos os experimentos, não houve diferença entre os tratamentos, o que sugere que as condições comportamentais antes da adição dos diferentes odores eram as mesmas. Assim, as alterações comportamentais observadas após as adições dos odores podem ser atribuídas de fato ao tratamento.

O extrato de pele, em todas as concentrações (EC, E- e E+), provocou respostas comportamentais de alarme, como redução no número de cruzamentos no aquário e redução do tempo de locomoção, ao longo da exposição (adições 1, 2 e 3). No experimento 2, as respostas comportamentais de alarme para o tratamento EC foram semelhantes, redução no tempo de locomoção e aumento do tempo do peixe longe do espelho (ou seja, longe do local de adição dos odores, que era do lado do espelho). O extrato de pele provocou respostas conhecidas como respostas comportamentais de alarme, consistentes com o descrito em outros peixes, como por exemplo, redução da atividade de locomoção em *F. goby* (Brown *et al.*, 2004; Barreto *et al.*, 2010), aumento do tempo parado em *zebrafish* (Oliveira *et al.*, 2014) e, ainda afastamento da área onde a substância de alarme é introduzida em *fathead minnow*, *Pimephales promelas* (Mathis e Smith, 1993). Todas essas respostas são anti-predatórias e condizentes com aquelas que foram primeiramente descritas por Pfeiffer (1977). Essas reações podem promover aumento na chance de sobrevivência ao perceber que há um predador próximo (Chivers e Smith, 1998).

As respostas de alarme, envolvendo extratos de pele, podem variar entre as espécies (Pfeiffer, 1977). Anteriormente foi observado para matrinxãs expostas a extratos de pele que eles apresentam a resposta bifásica (Ide *et al.*, 2003). No entanto, no presente trabalho, a frequência de resposta bifásica foi baixa no Experimento 1 e ausente no Experimento 2. Quando observadas essas respostas,

elas foram maiores justamente no tratamento EC, tratamento esse que teve as melhores respostas de alarme, justificando nossa escolha de concentração para o Experimento 2.

Ainda com relação ao extrato de pele, o número de mordidas e demonstrações diminuiu já na primeira adição do extrato, enquanto a redução do número de mordidas não ocorreu em nenhum outro tratamento. O comportamento de demonstração, no entanto, diminuiu em todos os tratamentos, inclusive quando houve adição de água pura no aquário. Esse padrão é natural, pois o animal utiliza mais comportamentos demonstrativos no início do confronto, como forma de avaliar o oponente e, depois, com o decorrer do confronto agressivo, as demonstrações diminuem e os ataques diretos são mais frequentes (Ros *et al.*, 2006). A redução da agressividade geral do matrinxã, após adição do extrato de pele, foi consistente com estudos anteriores que utilizaram odores de extrato de pele no contexto agressivo (Wisenden, 1997; Barreto *et al.*, 2010). Em *C. nigrofasciatum*, colocados em pares nos aquários e expostos a extratos de pele de coespecífico, houve redução da frequência de abordagens e das mordidas (Wisenden, 1997). Também tilápias-do-Nilo, colocadas em um paradigma intruso-residente e expostas a extrato de pele de coespecífico, apresentaram redução na frequência de agressão (Barreto *et al.*, 2010). Essas respostas, em conjunto com as respostas de redução de agressividade e de locomoção do presente estudo sugerem que no caso de exposição a extratos pode estar havendo sinalização da presença de um predador. Isso induz respostas comportamentais de alarme, que, naquele momento, são mais importantes que às respostas agressivas, pois, no caso de um predador por perto, a redução da agressividade e da locomoção poderiam aumentar as chances de sobrevivência no caso de um ataque. De fato, os peixes deixam de fazer uma atividade corrente na presença de um possível predador; esse tipo de comportamento já foi relatado por Milinski (1993), que observou que peixes deixam de forragear quando expostos a odores de coespecíficos, só alimentando-se quando estão realmente com fome. No capítulo 2 também encontramos respostas comportamentais de alarme na exposição a extrato de pele, portanto, não importa o contexto que o animal esteja, na presença, de extratos de pele de coespecíficos o peixe adota respostas de alarme que podem aumentar suas chances de sobrevivência.

Não somente o extrato de pele de matrinxã provocou respostas comportamentais de alarme, mas estas também foram observadas após a exposição dos peixes ao odor do peixe machucado (Experimento 1). No entanto, apesar do perfil das respostas para o extrato e o odor causado pelo machucado da pele dos peixes ter sido semelhante, na exposição ao odor de machucado a redução na locomoção foi significativa, em relação ao período basal, a partir da segunda adição da solução, enquanto o extrato de pele promoveu uma resposta imediata, já na primeira adição da solução.

O extrato de pele é uma condição experimental, com uma alta concentração de tecido, tratando-se de um super estímulo aos coespecíficos, o que explica sua resposta rápida e acentuada. No entanto, apenas o odor de animal machucado, diluído no volume de água do aquário (10 L), já foi suficiente para disparar respostas de alarme consistente com as descritas em outros estudos (Ide *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2014), o que demonstra que o peixe é capaz de detectar o odor mesmo em concentrações mais baixas. A condição de animal machucado seria uma condição mais próxima ao que acontece na natureza. Segundo Pfeiffer (1977) e Lawrence e Smith (1989), a diluição da substância de alarme é muito importante para a determinação da resposta, pois esta diluição pode representar a distância do animal à fonte do estímulo.

Já no Experimento 2, as respostas ao odor de um animal machucado foram diferentes das respostas ao extrato de pele, com redução do tempo longe do espelho e, ainda, aumento significativo do número de mordidas ao longo do tempo, em cada tratamento. Ainda, o tratamento com odor de peixe machucado resultou em maior número de mordidas após as diferentes adições do que nos outros tratamentos. Ao contrário do extrato de pele, o odor de animal machucado não induziu respostas comportamentais de alarme no contexto agressivo, embora o tenha feito fora desse contexto (Experimento 1). As respostas observadas no matrinxã após a adição de odor de peixe machucado em contexto agressivo são contrárias às respostas de alarme na exposição ao extrato de pele. Diferentemente do extrato, o odor de coespecífico machucado não aboliu a agressão no matrinxã, e sim aumentou-a progressivamente.

No contexto agressivo, a percepção de um coespecífico machucado pode ter aumentado a agressão, pois nessa situação o odor pode sinalizar que o coespecífico com quem ele está brigando (espelho) está sendo machucado. O

matrinxã é bastante agressivo com coespecíficos (Urbinati *et al.*, 2015) e mesmo após um dos peixes vencer o confronto há aumento da agressão, com o peixe vencedor atacando progressivamente o oponente (Ferraz e Gomes, 2009; Serra *et al.*, 2017), podendo levá-lo a morte. Se em um contexto agressivo o odor de um coespecífico machucado provocasse uma resposta de alarme, assim que o confronto agressivo escalasse e fossem desferidas mordidas o confronto agressivo cessaria pela liberação do odor na água, portanto faz sentido que, nesse contexto, a inibição da resposta de alarme tenha evoluído. No caso do matrinxã, em que se observa uma escalada de agressividade após a definição do confronto agressivo, e que o peixe vencedor ataca progressivamente o peixe perdedor, o odor do peixe machucado pode inclusive ser um deflagrador de maior agressividade, sinalizando um oponente mais fraco e que representa menor risco de revide do agressor.

Entretanto, mesmo em contexto agressivo, a adição de extrato de pele promoveu resposta de alarme, o que levanta a pergunta de porquê no contexto agressivo o extrato não provoca as mesmas respostas de aumento de agressividade que as observadas com o odor de um animal machucado. No extrato, há uma concentração muito alta de substâncias de alarme. Pode ser que, no contexto agressivo, o limiar para resposta de alarme ao odor de um coespecífico aumente, o que inibe a resposta de alarme ao odor liberado pelos machucados infligidos no coespecífico pelo próprio peixe que está confrontando. No entanto, o extrato de pele é artificialmente muito concentrado e, portanto, é um estímulo mais intenso capaz de deflagrar a resposta de alarme no matrinxã mesmo que o peixe esteja em um contexto agressivo. Além disso, esse estímulo intenso pode representar uma grande ameaça ao peixe e, segundo alguns autores, quanto maior a ameaça representada por um predador maiores serão as respostas de evasão (Helfman, 1989; Sih, 1987; Fraser e Huntingford, 1986). No entanto, como o odor de um peixe machucado é bastante diluído em comparação ao extrato, ele pode não atingir o limiar da resposta de alarme e não a deflagrar; mais ainda, ele pode provocar aumento da agressividade, por sinalizar que o oponente está ferido e não representa um risco. Essa avaliação do contexto acontece mesmo durante uma interação entre predador e presa (Helfman, 1989; Sih 1987; Fraser e Huntingford 1986). No nosso estudo, os peixes aumentaram a

agressão pois o oponente, que seria o possível predador, estaria ferido, não representando um risco.

Nos tratamentos vencedor, perdedor e isolado não ocorreram respostas comportamentais de alarme, e nem mudança na agressão, nem na comparação ao longo do tempo dentro dos tratamentos, nem quando comparados após as adições. No entanto, poderíamos esperar que nos tratamentos vencedor e perdedor de um confronto agressivo anterior houvesse alguma resposta se na espécie a condição após o confronto agressivo resultasse na liberação de pistas químicas que indicassem essa condição; como isso não ocorreu, podemos supor que esse tipo de sinalização não ocorre na espécie. Já foi mostrado que *Betta splendens* evitam se envolver em confrontos agressivos com coespecíficos que eles viram vencer uma interação agressiva (Oliveira *et al.*, 1998). Porém matrinxãs não definem hierarquias de dominância e seus ataques, ao contrário de um confronto agressivo para estabelecer hierarquias, aumentam após eles vencerem um embate agressivo (Ferraz e Gomes, 2009; Serra, 2014, Serra *et al.*, 2017). Por isso, faz sentido que não exista sinalização química da condição pós confronto agressivo em uma espécie que não define de fato hierarquia. Isso faz ainda mais sentido quando observamos esses resultados em conjunto com as respostas para coespecífico machucado, que resulta em aumento da agressividade uma vez que no matrinxã a escalada de agressão ocorre após a definição, quando o oponente já foi ferido e fica debilitado. Ainda, o peixe receptor poderia aumentar sua agressão quando recebesse o odor de um peixe perdedor, como ocorreu na adição de odor de animal machucado, uma vez que o peixe perdedor recebeu mordidas. No entanto, como removemos os odores do confronto agressivo em si antes de coletar o odor do perdedor, e no aquário de coleta de odor o peixe não sofreu mais machucados, a quantidade de odor de pele machucada pode ter sido ínfima demais para ser detectada pelos peixes receptores.

Quanto às respostas fisiológicas de estresse, não houve mudanças na glicose e cortisol plasmáticos, apesar da resposta comportamental de alarme no tratamento extrato, em ambos os experimentos, e, também, no tratamento machucado do experimento 1. Em outros trabalhos, respostas de estresse foram observadas em situações de alarme (Sanchez *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2014). Porém, Pfeiffer (1977) sugere que as respostas de estresse e as respostas

comportamentais de alarme não precisam, necessariamente, acontecer concomitantemente.

A exposição dos matrinxãs ao extrato de pele e ao odor do animal machucado não causaram mudanças nas respostas fisiológicas de estresse, apesar das respostas comportamentais de alarme observadas. Quando estressados, os peixes apresentam alterações fisiológicas e comportamentais, que são adaptativas, que permitem que eles enfrentem essa condição de estresse (Urbinati *et al.*, 2015). Entre as respostas indicadoras de estresse, o aumento das concentrações sanguíneas de cortisol e glicose são as mais confiáveis (Urbinati *et al.*, 2015). Seria razoável pensar que encontraríamos aumento desses indicadores concomitantes às respostas comportamentais de alarme, visto que estas últimas indicam que o animal detectou um possível predador (Pfeiffer, 1963). Aumentos da concentração de cortisol causados por substâncias de alarme já foram encontrados em outras espécies (Oliveira *et al.*, 2014; Sanches *et al.*, 2015). No entanto, outros estudos com substância de alarme não encontraram variação das respostas fisiológicas de estresse (Ide *et al.*, 2003; Souza-Bastos *et al.*, 2014), podendo então haver uma resposta de alarme comportamental mas não de resposta de estresse. Além disso, sabe-se que com o estresse ocorre aumentos dos níveis de glicose circulante e que o cortisol mantém esses níveis altos e, isso, seria necessário para os peixes enfrentarem situações de perigo como de luta ou fuga (Schreck e Tort, 2016). No entanto, uma das principais respostas de alarme, é se manter parado, ou em *freezing* e, nesse caso, não será necessário um grande aporte energético. Isso poderia explicar o motivo de não termos aumentos de cortisol e glicose no nosso trabalho.

Além da hipótese anterior para explicar a ausência de alteração dos parâmetros fisiológicos indicadores de estresse, outra possibilidade é que ausência de resposta poderia estar relacionada com própria espécie. Quando observamos os dados de cortisol e glicose também não houve diferenças entre os tratamentos, reforçando que seria uma característica da espécie. As respostas de estresse podem variar entre as espécies (Urbinati *et al.*, 2004). Há estudos com matrinxã envolvendo manejos rotineiros em piscicultura, em que as respostas de estresse não são observadas, diferente do observado em outras espécies submetidas aos mesmos tipos de manejo (Urbinati *et al.*, 2015). Já foi observado, por exemplo, que matrinxãs não alteram seus níveis de cortisol e glicose quando

expostos a manejos de perseguição, seguido de vários períodos de captura (Rocha *et al.*, 2004) ou quando submetidos a perseguição por puçás (Hoshiba *et al.*, 2009). Segundo Galhardo e Oliveira (2009), os peixes avaliam os estressores a eles impostos. A avaliação de estressor, segundo os mesmos autores, tem uma primeira etapa que envolve a avaliação do quanto aquele estressor é relevante (relevância individual) e uma segunda etapa em que os peixes avaliam quais são as opções disponíveis para enfrentar o estímulo estressor. Além disso, nas repostas de estresse, estariam envolvidos diferentes fatores, podendo ser eles dependentes do contexto e de alguma experiência prévia com um mesmo estímulo estressor, como também pode depender da personalidade do indivíduo (Galhardo e Oliveira, 2009). Deste modo, considerando os estudos que envolvem estresse em matrinxã e também os nossos resultados, parece que uma maior resistência ao estresse é uma característica da espécie.

6. Conclusão

Extrato de pele é um estímulo mais intenso que mesmo em contexto agressivo ainda provoca resposta de alarme. Além disso, nenhum dos estímulos, em ambos os estudos, provocou respostas de estresse nos peixes. Essa resposta pode ser atribuída a característica da resposta de não requerer um grande aporte energético e, por isso, não termos observado aumento dos níveis de cortisol e glicose. No entanto, também é viável pensar que essa pode ser uma característica da espécie, uma maior resistência ao estresse. Observamos que a comunicação química influencia nos comportamentos dos peixes, podendo ser um fator de importância nos peixes de pisciculturas, que se encontram em altas densidade de estocagem. Quanto a aplicabilidade ainda são necessários mais trabalhos a respeito da comunicação química para responder questões básicas da mesma para que possamos ter futuras aplicações

7. Referências

Baenninger, R. **Fighting by *Betta splendens*: Effects on aggressive displaying by conspecifics.** Psychonomic Science, 10: 185-186, 1968.

Barbosa-Júnior, A., Hoffman, A. **Alarm reaction in a South American teleost fish piauçu, *Leporinus macrocephalus***. Comparative Biochemistry and Physiology. 148, 39, 2007.

Barreto, R. E., Barbosa-Junior, A., Giassi, A. C. C., Hoffmann, A. **The club cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia**. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 43, 75–81, 2010.

Barreto, R. E., Barbosa-Júnior, A., Urbinati, E. C., Hoffmann, A. **Cortisol influences the antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the *frillfin goby***. Hormones and Behavior. 65, 394–400, 2014.

Brown, J., Walker, S.E., Steinmain, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestics species. Virginia, EUA, 2004.

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

Chivers, D. P. Smith, R. J. F. **“Chemical Alarm Signalling in Aquatic Predator-Prey Systems: A Review and Prospectus”**. Ecoscience 5, 338–352, 1998.

Courtenay, S. C., Quinn, T. P., Dupuis, H. M. C. **“Factors Affecting the Recognition of Population-Specific Odours by Juvenile Coho Salmon,”** Journal of Fish Biology. 50, 1042–1060, 1997.

Desjardins JK, Fernald RD. **What do fish make of mirror images?** Biology Letters. 6: 744-747, 2010.

Dunbar, R. I. M. **Grooming, gossip and the evolution of language**. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press. 1998.

Fabbri, E., Moon, T. W. **Adrenergic signaling in teleost fish liver, a challenging path.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 199, 74–86, 2016.

Ferraz, F. B., Gomes, L. C. **Social relationship as inducer of immunological and stress responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*).** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 153, 293–296, 2009.

Fraser, D. F., Huntingford, F. A. **Feeding and avoiding predation hazard: the behavioral response of the prey.** *Ethology* 73, 56.68, 1986.

Galhardo, L.; Vital, J.; Oliveira, R. F. **Psychological Stress and Welfare in Fish.** *Annual Review of Biomedical Sciences.* 11, 1-20, 2009.

Gonçalves-de-Freitas, E., Mariguela, T. C. **Social isolation and aggressiveness in the amazonian juvenile fish *Astronotus ocellatus*.** *Brazilian Journal of Biology.* 66(1B), 233-238, 2006.

Gonçalves-de-Freitas, E., Teresa, F. B., Gomes, F. S., Giaquinto, P. C. Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. *Applied Animal Behavior Science.* 112, 187–195, 2008.

Helfman, G. S. **Threat-sensitive predator avoidance in damselfish-trumpetfish interactions.** *Behavioral Ecology and Sociobiology.* 24, 47-58, 1989.

Holtby L. B., Swain D. P., Allan G. M. **Mirror-elicited agonistic behavior and body morphology as predictors of dominance status in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,* 50: 676-684, 1993.

Hoshiba, M. A., Gonçalves, F. D., Urbinati, E. C. **Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura.** *Acta Amazônica.* 39(2), 445 – 452, 2009.

Hussain, A., Saraivaa, L. R., Ferrerob, D. M., Ahujaa, G. Krishnaa, V. S., Liberlesb, S. D., Korschinga, S. I. **High-affinity olfactory receptor for the death-**

associated odor cadaverine. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110, 48, 2013.

Ide, L. M., Urbinati E. C., Hoffmann, A. **The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*.** Journal of Fish Biology. 63, 332-343, 2003.

Johnsson J. I., Parkkonen J., Forlin L. **Reduced territorial defence in rainbow trout fry exposed to a paper mill effluent: using the mirror image stimulation test as a behavioural bioassay.** Journal of Fish Biology. 62, 959-964, 2003.

Kasumyan, A. O. **The Olfactory System in Fish: Structure, Function, and Role in Behavior.** Journal of Ichthyology. 44, S180–S223, 2004.

Keller-Costa, T., Canário, A. D. M., Hubbard, P. C. **Chemical communication in cichlids: A mini-review.** General and Comparative Endocrinology. 221, 64-74, 2015.

Lawrence, B. J., Smith, R. J. F. **Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance.** Journal of Chemical Ecology. 15, 1, 1989.

Mathis, A., Smith, R. J. F. **Fathead Minnows *Pimephales promelas* Learn to Recognize Northern Pike *Esox lucius* as Predator on the Basis of Chemical Stimuli from Minnows in the Pike's Diet.** Animal Behavior. 46, 645–656, 1993.

Milinsky, M. **Predation risk and feeding behaviour.** In: Pitcher, T. J., editor. Behaviour of Teleost Fishes, Chapman and Hall, London. 285-305, 1993.

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., Moon, T. W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** Reviews in Fish Biology and Fisheries. 9, 211–268, 1999.

Noakes, D. L. G., Jones, K. M. M. **Cognition, learning and behavior**. Fish and Physiology. Part 9. 35, 32, 2016.

Oliveira, R. F., McGregor, P. K., Latruffe, C. **Know Thine Enemy: Fighting Fish Gather Information from Observing Conspecific Interactions**. Proceedings: Biological Sciences, 265(1401), 1045-1049, 1998.

Oliveira, T. A., Gessi, K., Motta, A. C., Piato, A. L., Barreto, R. E., Volpato, G. L., Barcellos, L. J. G. **Death-associated odors induce stress in zebrafish**. Hormones and Behavior. 65, 340–344, 2014.

Olsén, K. H., Grahn, M., Lohm, J. **Influence of MHC on sibling discrimination in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)**. Journal of Chemical Ecology. 28, 783–796, 2002.

Pfeiffer, W. **The Distribution of Fright Reaction and Alarm Substance Cells in Fishes**. Copeia. 4, 653–665, 1977.

Pfeiffer, W. **The Fright Reaction of Fish**. Biological Reviews. Cambridge Phil. Soc. 37, 495–511, 1963.

Reddon, A. R., O'Connor, C. M., Marsh-Rollo, S. E., Balshine S. **Effects of isotocin on social responses in a cooperatively breeding fish**. Animal Behaviour. 84, 753-760, 2012.

Rehnberg, B. G., Smith, R. J. F. **The influence of alarm substance and shoal size on the behavior of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae)**. Journal of Fish Biology. 33, 155-163, 1988.

Rocha, M. R., Carvalho, E. G., Urbinati, E. C. **Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869)**. Aquaculture Research. 35, 245-249, 2004.

Ros, A. F. H, Becker K, Oliveira, R. F. **Aggressive behaviour and energy metabolism in a cichlid fish, *Oreochromis mossambicus***. *Physiology & Behavior*. 89, 164-170, 2006.

Ruzzante D. E. **Mirror image stimulation, social hierarchies, and population differences in agonistic behaviour: a reappraisal**. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 49:1966–1968, 1992.

Sanches, F. H. C., Miyai, C. A., Pinho-Neto, C. F., Barreto, R. E. **Stress responses to chemical alarm cues in Nile tilapia**. *Physiology & Behavior*. 149, 8–13, 2015.

Schreck, C. B., Tort, L. **The concept of stress in fish**. In: *Biology of Stress in Fish*. Fish and Physiology. Part 1. 35, 37, 2016.

Serra, M. **Estratégia agressiva de matrinxãs *Brycon amazonicus*: conviver quando possível, matar quando preciso**. Botucatu-SP. Tese de doutorado. 2014.

Serra, M., Wolkers, C. P. B., Mello, M. M. M., Urbinati, E. C. **Agonistic trials with mirrors do not elicit the same aggressiveness of a real trial in the matrinxã fish, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)**. *Journal of Applied Ichthyology*. 33, 42–46, 2017.

Serra, M., Wolkers, C. P. B., Urbinati, E. C. **Novelty of the arena impairs the cortisol-related increase in the aggression of matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. *Physiology & Behavior*. 141, 51–57, 2015.

Sih, A. **Predators and prey lifestyles: an evolutionary and ecological overview**. In: Kerfoot WC, Sih A (eds) *Predation direct and indirect impacts on aquatic communities*. University Press New England, Hanover, pp 203 224, 1987.

Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Suski, C. R., Cooke, S. J. **Stress indicators in fish**. *Fish and Physiology*. Part 11. 35, 58, 2016.

Souza-Bastos, L. R., Freire, C. A., Fernandes-de-Castilho, M. **Skin extract from *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) does not promote stress in conspecifics.** Neotropical Ichthyology. 12(1), 125-132, 2014.

Urbinati, E. C., Carneiro, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.** In: Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalossi, D. M., Castagnolli, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 71-193, 2004.

Urbinati, E. C., Zanuzzo, F. S., Serra, M., Wolkers, C. P. B., Sabioni, R. E. **Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas.** In: Tavares-Dias, M. Mariano, W. S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. v. 1, p. 429, 2015.

Wendelaar Bonga, S. E. **The stress response in fish.** Physiological Reviews. 77(3), 591-625, 1997.

Wisenden, B. D. **Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment.** Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 355(B), 1205-1208, 2000.

Wisenden, B. D., Smith, R. J. F. **The effect of physical condition and shoalmate familiarity on proliferation of alarm substance cells in the epidermis of fathead minnows.** Journal of Fish Biology 50, 799-808, 1997.

Wolkers, C. P. B., Serra, M., Szawka, R. E., Urbinati, E. C. **The time course of aggressive behaviour in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus* fed with dietary L-tryptophan supplementation.** Journal of Fish Biology. 84, 45–57, 2014.

ANEXO 1

Comportamento analisado	Tratamentos	Adições a cada treze minutos			
		Período Basal	Após adição 1	Após adição 2	Após adição 3
Tempo (s) locomoção	AP	507,5 ± 56,7	488,1 ± 65,1	487,9 ± 65,1	413,2 ± 54,8
	EC	720,5 ± 23,7 a	117,8 ± 34,2 b	66,5 ± 24,1 b	71,7 ± 34,3 b
	E-	605,5 ± 44,2 a	34,4 ± 18,6 b	34,4 ± 18,6 b	27,5 ± 19,2 b
	E+	495,5 ± 75,8 a	65,3 ± 27,6 b	45,0 ± 32,4 bc	12,0 ± 7,6 c
	Mac	604,4 ± 51,9 a	319,2 ± 64,4 b	186,2 ± 61,9 bc	152,4 ± 73,7 c
Número de cruzamentos	AP	188,6 ± 41,9	228,5 ± 53,8	239,3 ± 60,5	170,5 ± 40,2
	EC	302,2 ± 25,0 a	36,5 ± 7,2 b	21,0 ± 6,9 bc	22,4 ± 12,0 c
	E-	269,6 ± 30,7 a	40,0 ± 12,1 b	8,5 ± 4,3 c	13,6 ± 9,3 c
	E+	221,0 ± 45,6 a	29,5 ± 14,0 b	8,0 ± 2,6 b	1,8 ± 0,8 b
	Mac	238,5 ± 33,7 a	116,1 ± 33,0 b	59,3 ± 16,7 b	43,5 ± 20,0 b

ANEXO 1: Tempo de locomoção e número de vezes (média ± E.P) que o peixe cruzou os quadrantes no tempo basal e após as adições 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Foram analisados treze minutos antes da primeira adição e, após, treze minutos para cada adição (1, 2 e 3). *One-way* Anova para medidas repetidas. O teste de Tukey foi utilizado como pós-teste. Letras diferentes mostram diferenças entre as adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; E- = extrato negativo; E+ = extrato positivo; Mac = machucado.

ANEXO 2

Comportamento analisado	Tratamentos	Adições a cada treze minutos			
		Basal	Após adição 1	Após adição 2	Após adição 3
Número de mordidas	AP	121,4 ± 15,6 a	115,7 ± 17,8 ab	165,4 ± 17,9 b	177,2 ± 18,8 b
	EC	156,4 ± 16,1 a	80,1 ± 14,5 b	82,0 ± 18,9 b	74,8 ± 20,2 b
	Mac	148,0 ± 18,6 a	177,9 ± 18,2 a	249,2 ± 29,2 b	254,2 ± 29,0 b
	Venc	157,1 ± 19,9	168,2 ± 25,2	196,3 ± 25,6	195,6 ± 25,7
	Perd	148,0 ± 22,6 a	217,1 ± 20,0 b	214,0 ± 23,4 b	219,1 ± 29,9 b
	Isol	156,9 ± 27,1 a	199,5 ± 30,1 ab	236,9 ± 37,9 b	229,3 ± 36,2 ab
Número de investidas	AP	2,6 ± 0,7 a	0,2 ± 0,1 ab	0,002 ± 0,002 b	0 b
	EC	0,9 ± 0,2	0,08 ± 0,05	0,04 ± 0,4	0,004 ± 0,047
	Mac	1,5 ± 0,4 a	0,2 ± 0,1 b	0 b	0 b
	Venc	0,2 ± 0,1	0,04 ± 0,4	0	0
	Perd	2,6 ± 0,7 a	0,02 ± 0,01 ab	0,02 ± 0,01 ab	0,009 ± 0,009 b
	Isol	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,06	0	0
Número de demonstrações	AP	58,7 ± 6,9 a	39,2 ± 6,6 a	33,2 ± 7,3 ab	25,7 ± 5,8 b
	EC	60,8 ± 7,8 a	21,1 ± 5,4 b	4,7 ± 1,2 c	1,6 ± 0,5 c
	Mac	68,9 ± 9,2 a	29,9 ± 6,6 a	28,3 ± 7,8 ab	16,3 ± 4,9 b
	Venc	56,1 ± 8,9 a	20,2 ± 4,8 b	18,8 ± 5,4 bc	13,3 ± 3,4 c
	Perd	55,4 ± 6,5 a	25,4 ± 6,3 b	18,8 ± 5,1 bc	11,3 ± 4,0 c
	Isol	66,3 ± 11,4 a	31,7 ± 6,3 ab	28,7 ± 8,2 b	26,1 ± 6,9 b

ANEXO 2: Número de mordidas, investidas e demonstrações (média ± E.P) no tempo basal e após as adições 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Foram analisados treze minutos antes da primeira adição e, após, treze minutos para cada adição (1, 2 e 3). *Kruskal-Wallis*. Letras diferentes mostram diferenças entre as adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.

ANEXO 3

Comportamento analisado	Tratamentos	Adições a cada treze minutos			
		Basal	Após adição 1	Após adição 2	Após adição 3
Tempo (s) locomoção	AP	640,9 ± 45,3 a	673,2 ± 38,8 ab	659,2 ± 47,6 ab	728,8 ± 37,2 b
	EC	686,9 ± 29,1 a	487,4 ± 63,9 b	425,3 ± 62,7 b	372,2 ± 371,5 b
	Mac	633,1 ± 45,0	651,7 ± 42,2	674,3 ± 39,7	644,1 ± 49,3
	Venc	632,1 ± 46,3	608,0 ± 51,3	609,9 ± 53,8	588,2 ± 52,1
	Perd	641,6 ± 34,0	668,7 ± 29,8	671,8 ± 35,2	703,6 ± 28,6
	Isol	609,8 ± 47,6	679,2 ± 27,1	709,1 ± 29,3	681,7 ± 29,1
Tempo (s) longe do espelho	AP	7,5 ± 1,6 a	3,2 ± 1,9 b	1,6 ± 0,94 b	2,9 ± 1,7 b
	EC	3,3 ± 1,7 a	8,8 ± 2,7 a	4,7 ± 2,1 a	4,9 ± 3,3 ab
	Mac	11,2 ± 3,5 a	8,0 ± 3,3 b	1,7 ± 1,1 c	0,8 ± 0,4 c
	Venc	11,9 ± 6,2 a	22,6 ± 18,4 a	5,3 ± 3,3 a	1,6 ± 0,7 ab
	Perd	8,6 ± 3,5 a	8,6 ± 7,3 b	1,5 ± 1,3 b	19,2 ± 18,5 b
	Isol	8,8 ± 6,9 a	18,1 ± 14,4 ab	8,7 ± 3,8 ab	4,1 ± 3,8 b

ANEXO 3: Tempo de locomoção e tempo longe do espelho (média ± E.P) no tempo basal e após as adições 1 (aos 13 min), 2 (aos 26 min) e 3 (aos 39 min). Foram analisados treze minutos antes da primeira adição e, após, treze minutos para cada adição (1, 2 e 3). *One-way* Anova para medidas repetidas. O teste de Tukey foi utilizado como pós-teste. Letras diferentes mostram diferenças entre as adições ($P < 0,001$). AP = água pura; EC = extrato controle; Mac = machucado; Venc = vencedor; Perd = perdedor; Isol = isolado.