

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” INSTITUTO
DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos crônicos dos necromônios no crescimento da tilápia-do-
Nilo**

Alexandre Luiz Arvigo

Botucatu – SP

2019

ALEXANDRE LUIZ ARVIGO

Efeitos crônicos dos necromônios no crescimento da tilápia-do-Nilo

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

Orientadora: Tânia Marcia Costa

Co-orientador: Rodrigo Egydio Barreto

Botucatu – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Arvigo, Alexandre Luiz.

Efeitos crônicos dos necromônios no crescimento da
tilápia-do-Nilo / Alexandre Luiz Arvigo. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Tânia Marcia Costa

Coorientador: Rodrigo Egydio Barreto

Capes: 20404000

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Peixe - Comportamento. 3.
Comunicação. 4. Tilápia (Peixe) - Crescimento 5. Morte. 6.
Odorantes.

Palavras-chave: comunicação química; crescimento ;
necrômônio; pistas químicas.

"Maturidade não é quando você começa a falar grandes coisas. É quando você começa entender pequenas coisas."

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Esta dissertação é fruto de um trabalho desenvolvido por diversos envolvidos e espero desta maneira, dar um pequeno gesto de gratidão aos que me auxiliaram durante todo o processo.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal (LABECOM), pela ajuda técnica e intelectual, não apenas por esses dois anos de mestrado, mas por todo o tempo em que trabalhamos juntos. Em especial ao Caio Akira Miyai que sempre foi uma das pessoas que mais trabalhou comigo para desenvolvermos uma pesquisa de qualidade e com verdadeira contribuição para o mundo científico. Agradeço também a Rafaela Torres Pereira que me auxiliou durante o ano em que desenvolvemos parte da experimentação laboratorial na Unesp de Botucatu, no departamento de fisiologia do IB.

Agradeço a todos os amigos que acumulei ao longo dos anos (Alexandre Alves, Gustavo Barros, Fernando de Grande, Juan Pardo, Nicoli Zacharczuk, Priscila Granado e Renato Viotto) e que de alguma forma sempre me incentivaram a continuar trilhando o meu caminho dentro daquilo que escolhi à revelia de qualquer dificuldade. Faço um adendo especial, aos novos amigos de Botucatu (Isabela Moraes, Mariana Antunes e Nadayca Mateussi) que fizeram com que a mudança de cidade e rotina fosse menos penosa, tornando a minha adaptação mais tranquila.

Agradeço também, ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da Unesp de Botucatu e ao Campus de São Vicente, pela forma e estrutura.

Agradeço aos meus orientadores Tânia Marcia Costa e Rodrigo Egydio Barreto que me acompanham desde a minha iniciação científica, caminhando ao meu lado durante esse tempo e com paciência e expertise me mostraram as melhores maneiras de superar os muitos obstáculos nesses anos.

Por fim, mas não menos importante. Agradeço a minha família (Neusa Rodrigues Arvigo, Ayrton Luiz Arvigo, Maria Claudia Arvigo e André Luiz Arvigo) por todo o suporte e

apoio nos mais distintos momentos. Eles são e sempre foram o alicerce necessário para o meu crescimento intelectual e pessoal.

Agradeço também, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Sumário

APRESENTAÇÃO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EFEITOS CRÔNICOS DOS NECROMÔNIOS NO CRESCIMENTO DA TILÁPIA-DO-NILO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. MATERIAL E MÉTODO.....	4
2.1. ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ESTOQUE.....	4
2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	4
2.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	7
2.3.1. APARATO EXPERIMENTAL.....	7
2.3.2. PREPARAÇÃO DO NECROMÔNIO.....	8
2.3.3. ANÁLISE DE VARIÁVEIS.....	8
2.4. ANÁLISE DE DADOS.....	10
3. RESULTADOS.....	10
4. DISCUSSÃO.....	16
5. REFERÊNCIAS.....	18

Apresentação

A comunicação entre os animais ocorre através do uso de sinais, sendo, portanto, uma transferência de informações por meio de um canal entre um emissor, que transmite as informações, e um receptor, que as recebe e interpreta (Cronin, 2005; Hailman, 1977). Essa transferência de informações exerce importante papel para a sobrevivência das espécies. Para evitar a predação, as presas apresentam estratégias de defesa antipredatória, denominados sinais, indicando a presença de um predador. Os sinais podem ser classificados como mecânicos, visuais ou químicos (Diehl & Eköv, 1995; Persson & Eköv, 1995; Werner & Anholt, 1996).

Todo este complexo de interações ocorre em todos os ambientes, inclusive no meio aquático. Nesses ambientes, as presas avaliam o risco de predação utilizando-se de indicadores ambientais, os quais estão diretamente relacionados ao universo sensorial desses animais, sendo comumente estímulos visuais (Barreto et al., 2003; Carleton, 2009; Snowdon, 2007), elétricos (Snowdon, 2007), táteis (Snowdon, 2007), ou químicos (Barcellos & Marqueze., 2010; Mirza & Chivers, 2003; Snowdon, 2007).

Os sinais químicos são fontes de informações importantes. Nos ambientes aquáticos, a comunicação química ocupa um posto de extrema relevância, afinal, os fatores podem se dissolver facilmente e dispersar-se de maneira muito eficaz (Hara, 1994). Este estilo de comunicação se mostra ainda mais importante em situações nas quais a visão está prejudicada em função da turbidez ou baixa luminosidade, além de se tornar essencial para organismos que apresentam uma visão pouco desenvolvida (Wisenden, 2000). Entretanto, o ambiente aquático pode oferecer algumas limitações para este tipo de comunicação, especialmente em áreas com grande turbulência ou alto fluxo de água (Mirza & Smith, 2001).

Existe uma gama de possíveis origens para as pistas químicas que indicam situações de risco. Estas pistas podem ser emitidas diretamente através do odor do próprio predador (Kats &

Dill, 1998; Wisenden, 2000; Miyai et al., 2016) ou de forma indireta, alertado por coespecífico ou espécie simpátrica (Mathis & Smith, 1993; Chivers & Smith, 1998). A forma indireta de sinalização pode estar relacionada a uma presa ameaçada, caracterizando a substância de distúrbio (Jordão & Volpato, 2000; Barcellos et al., 2011), ferida, devido a liberação de substância de alarme (Chivers & Smith, 1998; Wisenden, 2000), pelo sangue (Barreto et al., 2013) ou morta e em decomposição, conhecidos como necromônios (Oliveira et al., 2014). Cadáveres são importantes fontes de informação para outros animais vivos, sejam eles coespecíficos ou não. Em peixes, essa pista química pode induzir respostas defensivas (Oliveira et al., 2014) e desta forma gerar ações de rejeição (Wagner et al., 2011).

Sabe-se que esses estímulos estressores podem alterar processos importantes para o animal e o ambiente, podendo influenciar processos ecológicos (Lima, 1998), como a migração vertical (Tjossem, 1990), e também diversos aspectos do comportamento reprodutivo (Lima, 1998) e alimentar (Giaquinto & Volpato, 2001). Alterações no apetite podem levar o organismo a passar um longo período sem se alimentar e ter seu crescimento prejudicado (Duggan et al., 2016; Harris & Carr, 2016). Além disso, o crescimento pode diminuir, mesmo que o apetite e a ingestão alimentar não sejam alterados. Nesses casos alterações metabólicas mobilizam a energia captada para lidar com um estressor, em vez de promover o desenvolvimento (Volpato & Fernandes, 1994; Bernier et al., 2004; Volpato et al., 2013).

Neste estudo avaliamos o efeito crônico dos necrômônios no crescimento da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Uma vez que os animais poder estar suscetíveis a um contato diário com essa pista química, aventamos que esses animais podem apresentar uma modificação no padrão de crescimento ao longo do tempo. Nós observamos efeitos significativos em variáveis relevantes de crescimento/desenvolvimento como os decréscimos na taxa de crescimento específico, na taxa de crescimento em função da temperatura e na variação de massa. Esses resultados são indicativos de uma perda no potencial de crescimento dos peixes expostos ao estressor ao longo do tempo.

Referências Bibliográficas

- Barcellos LJG, Marqueze A, Trapp M, Quevedo RM, Ferreira D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundia *Rhamdia quelen*. Aquacult Res. 2010. 300,231-236.
- Barcellos LJG, Volpato GL, Barreto RE, Coldebella I, Ferreira D. Chemical communication of handling stress in fish. Physiol Behav; 2011. 103, 372-375.
- Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL. Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. Behav Processes. 2003. 60, 235-239.
- Barreto RE, Miyai CA, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL. Blood cues induce antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics. PLoS One. 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054642>.
- Bernier NJ, Bedard N, Peter RE. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. Gen Comp Endocrinol; 2004. 135, 230-240.
- Carleton KL. Cichlid fish visual systems: mechanisms of spectral tuning. Integr Zool. 2009. 4, 75-86.
- Chivers DP, Smith RJF. Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. Ecoscience; 1998. 5, 338-352.
- Cronin TW. The role of vision in predator-prey interactions. In: Barbosa P & Castellanos I. Ecology of predator-prey interactions. New York, Oxford University Press. 2005. pp. 105-138.
- Diehl S & Eköv P. Effects of piscivore-mediated habitat use on resources, diet and growth of perch. Ecology. 1995. 76, 1712-1726.
- Duggan PE, Prater C, Carr JA, Harris BN. Predator presence decreases food consumption in juvenile *Xenopus laevis*. Behav Ecol Sociobiol; 2016. 70, 2005-2015.

Giaquinto PC, Volpato GL. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behaviour*; 2001. 138, 1205-1214.

Hailman JP. Optical signals: Animal communication and light. Oxford, England, Indiana University Press. 1977. pp. 362.

Hara TJ. The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gestation. *Rev Fish Biol Fisher.* 1994. 4, 1-35.

Harris BN, Carr JA. The role of the hypothalamus-pituitary-adrenal/interrenal axis in mediating predator-avoidance trade-offs. *Gen Comp Endocrinol*; 2016. 230-231, 110-142.

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

Jordão LC, Volpato GL. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour*; 2000. 137, 681-690.

Kats LB, Dill LM. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*; 1998. 5, 361-394.

Lima SL. Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Adv Stud Behav.* 1998. 27, 215-290.

Mathis A, Smith RJF. Intraspecific and cross-species responses to chemical alarm signals by brook stickleback. *Ecology*; 1993. 74, 2395-2404.

Mirza RS & Chivers DP. Chemical alarm signals enhance survival of brook charr (*Salvelinus alpinus*) during encounters with predatory chain pickerel (*Esox niger*). *Ethol.* 2001. 107, 989-1005.

Mirza RS & Chivers DP. Predator diet cues and the assessment of predation risk by juvenile brook charr: do diet cues enhance survival? *Can J Zool.* 2003. 81, 126-132.

Miyai CA, Sanches FHC, Pinho-Neto CF, Barreto RE. Effects of predator odour on antipredatory responses of Nile tilapia. *Physiol Behav*; 2016. 165, 22-27.

Oliveira TA, Koakoski G, Motta AC, Piatto AL, Barreto RE, Volpato GL, Barcellos LJG. Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Horm Behav*; 2014. 65, 340-344.

- Persson L & Eköv P. Prey refuges affecting interactions between piscivorous perch and juvenile perch and roach. *Ecology*. 1995. 76, 70-81.
- Snowdon CT. Comunicação. In: Yamamoto ME & Volpato GL. *Comportamento Animal*. Natal, EDUFRN. 2007. 7, 115-140.
- Tjossem SF. Effects of fish chemical cues on vertical migration behavior of *Chaoborus*. *Limnol Oceanogr*. 1990. 35(7), 1456-1468.
- Volpato GL, Fernandes MO. Social control growth in fish. *Braz J Med Biol Res*; 1994. 27, 797-810.
- Volpato GL , Bovi TS, de Freitas RHA, da Silva DF, Delicio HC, Giaquinto PC, Barreto RE. Red light stimulates feeding motivation in fish but does not improve growth. *PloS One*; 2013. 8(3), e59134. doi:10.1371/journal.pone.0059134.
- Wagner CM, Stroud EM, Meckley TD. A deathly odor suggests a new sustainable tool for controlling a costly invasive species. *Can J Fish Aquat Sci*; 2011. 68, 1157-1160.
- Werner EE & Anholt BR. Predator-induced behavioral indirect effects: Consequences to competitive interactions in anuran larvae. *Ecology*. 1996. 77,157-169.
- Wisenden BD. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 2000. 355, 1205-1208.

Efeitos crônicos dos necromônios no crescimento da tilápia-do-Nilo

^{1,2}Alexandre Luiz Arvigo*, ³Caio Akira Miyai, ²Tânia Marcia Costa e ¹Rodrigo Egydio Barreto

¹Biosciences Institute, Department of Physiology, São Paulo State University – UNESP, Rubião Jr., s/nº, Botucatu, SP, Brazil, P. O Box 510 – Zip Code 18618-970

²Biosciences Institute, São Paulo State University – UNESP, Coastal Campus, Praça Infante Dom Henrique, s/nº, Parque Bitaru, São Vicente, SP. Brazil. P. O, Box 73601 – Zip Code 11.380-972

³Department of Physiology, Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), CAUNESP, Botucatu, SP, Brazil

*autor correspondente: AL Arvigo

Email: alexandrearvigo@gmail.com

Resumo

A comunicação química importante para que os animais consigam identificar e responder a situações de risco, especialmente nos ambientes aquáticos, nos quais as pistas químicas são mais facilmente dispersadas. Dentre as diversas pistas químicas que podem estar disponíveis no ambiente, encontramos os necromônios, pista química vinda de um organismo morto e que pode representar um estímulo estressor, podendo alterar processos importantes para o animal, como alimentação e reprodução. Avaliamos se a exposição diária a necromônios afeta variáveis morfofuncionais na tilápia-do-Nilo. Para isso utilizamos um conjunto de variáveis comportamentais (ingestão alimentar e latência alimentar), morfométricas (medidas lineares), além da análise de massa e comprimento, percentual de variação de massa e comprimento, taxa de crescimento específico, fator de condição e modelo matemático de Ricker. Os animais foram expostos diariamente aos necromônios ou controle (água destilada) por um período de 30 dias, sendo todos os dias contabilizadas a latência alimentar e a taxa de ingestão, além de medições quinzenais de massa e comprimento padrão. No trigésimo dia foi feita a coleta de sangue para a análise da concentração de cortisol. Nosso estudo mostrou que essa exposição crônica afeta algumas dessas variáveis morfofuncionais da tilápia-do-Nilo. Encontramos um decréscimo na variação percentual de massa, na taxa de crescimento específico e na taxa de crescimento em função da temperatura para os animais expostos ao necromônio.

Palavras chave: comunicação química, morfometria, comportamento defensivo, pistas químicas

1. Introdução

A capacidade de identificar e interpretar informações disponíveis no ambiente é importante para a sobrevivência, possibilitando que o animal encontre alimento, parceiros reprodutivos ou até mesmo evite situações de risco. Neste contexto, a comunicação química é extremamente relevante, especialmente nos ambientes aquáticos, nos quais as pistas químicas são mais facilmente dispersadas por conta da dissolução eficiente ocorrida na água (Hara, 1994). Estas pistas são ainda mais relevantes quando a visão está prejudicada por conta da turbidez ou baixa luminosidade, ou ainda em organismos que possuem a visão pouco desenvolvida (Wisenden, 2000).

Existe uma gama de possíveis origens para as pistas químicas que indicam situações de risco (muitas vezes relacionadas à predação). Estas pistas podem ser emitidas diretamente através do odor do próprio predador (Kats & Dill, 1998; Wisenden, 2000; Miyai et al., 2016) ou de forma indireta, alertado por coespecífico ou espécie simpátrica (Mathis & Smith, 1993; Chivers & Smith, 1998). A forma indireta de sinalização pode estar relacionada a uma presa ameaçada, caracterizando a substância de distúrbio (Jordão & Volpato, 2000; Barcellos et al., 2011), ferida, devido a liberação de substância de alarme (Chivers & Smith, 1998; Wisenden, 2000), pelo sangue (Barreto et al., 2013) ou morta e em decomposição (Oliveira et al., 2014).

Cadáveres são importantes fontes de informação para outros animais vivos, sejam eles coespecíficos ou não. Em peixes, essa fonte de informação pode induzir respostas defensivas (Oliveira et al., 2014) e desta forma gerar ações de rejeição (Wagner et al., 2011). Isso se dá devido a presença de pistas químicas específicas, como os necromônios, diaminas (putrescina e cadaverina) vindas do animal em estado de putrefação que são dispensadas com a passagem do tempo, e a consequente liberação de substâncias de alarme oriundas da pele, uma vez que as células ‘club’ se rompem devido o avanço da decomposição e acabam por liberar estas pistas químicas na água (a partir de 8h *post mortem* - Oliveira et al., 2014). Sabe-se que esses estímulos estressores podem alterar processos importantes para o animal e o ambiente, podendo

influenciar processos ecológicos (Lima, 1998), como a migração vertical (Tjossem, 1990), e também diversos aspectos do comportamento reprodutivo (Lima, 1998) e alimentar (Giaquinto & Volpato, 2001). Alterações no apetite podem levar o organismo a passar um longo período sem se alimentar e ter seu crescimento prejudicado (Duggan et al., 2016; Harris & Carr, 2016). Além disso, o crescimento pode diminuir, mesmo que o apetite e a ingestão alimentar não sejam alterados. Nesses casos alterações metabólicas mobilizam a energia captada para lidar com um estressor, em vez de promover o desenvolvimento (Volpato & Fernandes, 1994; Bernier et al., 2004; Volpato et al., 2013).

Uma vez que os animais aquáticos estão expostos a diversos estressores químicos diariamente, dentre eles os necromônios, e tendo em vista a ação desses na ingestão alimentar e, potencial efeito no balanço energético, é esperado um possível prejuízo no crescimento do animal. Assim, neste estudo, avaliamos se a exposição crônica a necromônios afeta variáveis morfofuncionais na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Como hipótese, aventamos que peixes expostos ao necromônio de maneira crônica terão modificações no padrão de seu crescimento. A tilápia-do-Nilo foi escolhida como modelo experimental, pois é um peixe reativo a pistas químicas que indicam risco (Barreto et al., 2010; Sanches et al., 2015; Miyai et al., 2016) com literatura ampla relacionada as suas respostas comportamentais a diferentes estressores (Fernandes & Volpato, 1993; Alvarenga & Volpato, 1995; Barcellos et al., 1999; Volpato & Barreto, 2001; Barreto & Volpato, 2004). É um animal que está amplamente distribuído pelo território brasileiro, sendo que na piscicultura é a espécie mais cultivada no Brasil e a terceira do mundo (Hossain et al., 2007; FAO, 2016), além de apresentar fácil manejo em condições laboratoriais.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e condições de estoque

Os animais da população de estoque foram obtidos em piscicultura, e mantidos em tanques *indoor*, aclimatados por no mínimo 15 dias antes do início dos experimentos. A água foi mantida em aproximadamente 26°C com a utilização de termostatos e provida com oxigênio por meio de um sistema de aeração constante. Os níveis de amônia (< 0,5 ppm) e nitrito (< 0,05) foram mantidos em baixas quantidades através de filtragem biológica e um sistema constante de renovação de água por gotejamento. Removedores químicos de amônio foram também aplicados periodicamente na água para garantir sua qualidade. O fotoperíodo foi controlado por timer com 12 horas claro/12 escuro.

2.2. Delineamento experimental

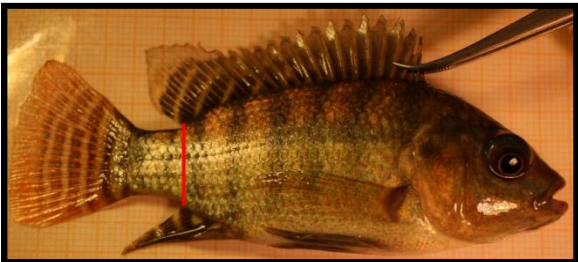
Neste estudo foram avaliados os efeitos da exposição crônica a necromônios no crescimento da tilápia-do-Nilo. Para tal, os animais provenientes da população estoque foram retirados dos tanques estoques e alojados individualmente em cada tanque experimental independente (1 peixe/ tanque de 28 L) por um período de aclimação de 7 dias. Os animais foram escolhidos sem discriminação de sexo, dentro de um espectro de tamanho (5,48 cm $\pm$ 0,34) e peso (5,55 g $\pm$ 0,98) para que iniciassem com medidas corporais similares.

Após o período de aclimação, o comprimento padrão e a massa corporal das tilápias foram medidas, além de serem fotografadas, e então submetidas às condições de exposição ao necromônio ou ao controle por 30 dias. Diariamente eram acrescentados 100 mL de pista química ou veículo (água desclorificada - controle). Tais pistas químicas eram diluídas lenta e gradualmente ao longo do dia por um sistema constante de gotejamento (a água de cada tanque experimental era inteiramente renovada em um período de 24 h), de modo a não acumular necromônio nos tanques ao longo do período de experimentação. Os peixes de cada condição (n = 14 – necromônio; n = 13 – controle) foram expostos cronicamente às pistas químicas conforme os procedimentos descritos em Volpato & Fernandes (1994). Durante esse período as variáveis relacionadas à alimentação (latência alimentar e ingestão alimentar) foram medidas

diariamente, enquanto as fotografias e os dados de comprimento e massa foram coletados quinzenalmente (15° e 30° dias).

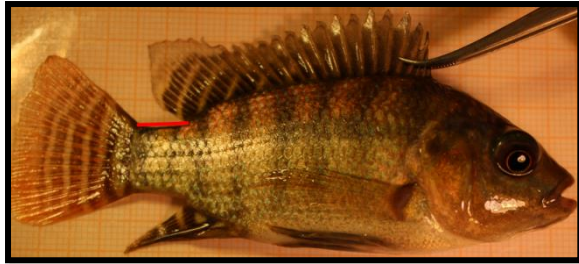
Para avaliar os efeitos das pistas químicas no crescimento dos animais foram utilizadas variáveis comportamentais como latência alimentar (tempo para a primeira investida no alimento) e ingestão alimentar (quantidade de ração ingerida em um período de 15 minutos) (Normandes et al., 2006; Volpato et al., 2013), além de análises 1) da massa e comprimento, e o percentual de variação de massa e comprimento, 2) da taxa de crescimento específico (SGR), 3) do fator de condição (K), 4) do coeficiente de crescimento em função da temperatura (“thermal growth coefficient” – TGC) e 5) um conjunto de variáveis morfométricas lineares quanto a diversos eixos corporais (tabela 1), avaliadas a partir das fotografias quinzenais. Além disso, 6) aplicamos o modelo matemático de Ricker (Wootton, 1992) com o intuito de avaliar se a pista química muda o perfil de crescimento.

Tabela 1. Eixos morfométricos avaliados na tilápia-do-Nilo em função da exposição a necromônio de coespecífico.

Eixos	Descrição	Indicação visual
1	Do ponto extremo anterior da nadadeira dorsal até a região anterior da nadadeira pélvica	
2	Do extremo posterior da nadadeira dorsal até a região posterior à nadadeira anal	
3	Do ponto superior de conexão entre a nadadeira e o pedúnculo caudais até o ponto inferior de conexão entre a nadadeira e o pedúnculo caudais	

4

Do Extremo posterior da nadadeira dorsal até o ponto de conexão superior entre a nadadeira e o pedúnculo caudais



5

Do extremo superior ao extremo inferior da nadadeira caudal



6

Do ponto de conexão superior entre a nadadeira e o pedúnculo caudais até o extremo superior da nadadeira caudal



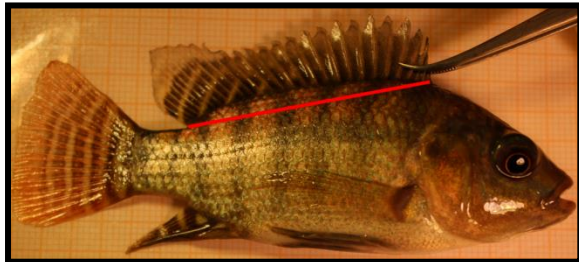
7

Do ponto de conexão inferior entre a nadadeira e o pedúnculo caudais até o extremo inferior da nadadeira caudal



8

Do ponto anterior de inserção até o ponto posterior de inserção da nadadeira dorsal



9

Do ponto médio do pedúnculo caudal até o ponto mais distal da nadadeira caudal



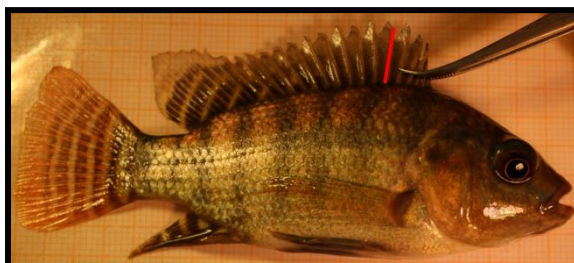
10

Medida feita partindo perpendicularmente do ponto central da medida 7 até o ponto médio do pedúnculo caudal



11

Medida do 5º espinho da nadadeira dorsal partindo da base



2.3. Procedimentos experimentais

2.3.1. Aparato experimental

O aparato experimental é formado por um sistema aberto de fluxo d'água, sem recirculação, mas constantemente abastecido por fluxo padronizado (0,32 mL/s) d'água desclorificada por meio de um sistema de gotejamento, permitindo assim a renovação constante d'água. O sistema completo é constituído por 28 recipientes independentes de 28 L cada. Cada recipiente possui uma saída de água na porção central para manter o nível de água constante, renovando paulatinamente a água e eliminando as excretas e as pistas químicas, evitando assim, que essas se acumulem. Para manter a coluna d'água constante, o escape de água foi composto por canos de PVC de 20 mm de diâmetro posicionados na direção vertical com 16,5 cm de altura. Esse cano foi inserido no centro de um maior de 40 mm de diâmetro, onde entre seus espaços estão posicionadas pedras porosas (1/tanque) conectadas a compressores de ar via mangueiras de silicone atóxico, para constante oxigenação d'água. O abastecimento de água fresca, sem odores biológicos, foi propiciado pelo bombeamento de água a partir de tanques de estoque (310 L) de água nos mesmos padrões físico/químicos encontrados no estoque para o sistema de gotejamento dos recipientes.

2.3.2. Preparação do necromônio

Para obtenção dos necromônios, seguimos a metodologia utilizada em Oliveira et al. (2014). Peixes oriundos da população de estoque foram coletados aleatoriamente e sacrificados por hipotermia, e então colocados em aquários de 20 l por 12 horas. Após este período a água do aquário foi coletada e armazenada em garrafas (500 mL) e congeladas (aproximadamente -20°C), até o início do experimento. Todos os procedimentos adotados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brasil (Protocolo No. 948/2017).

2.3.3. Análise de variáveis

A massa e o comprimento foram avaliados de forma bruta e também em uma relação porcentual de variação ao longo do tempo. Com comparações feitas de duas maneiras: nas 3 avaliações quinzenais de amostragem de massa e comprimento padrão; e nos períodos de 0-15 dias e de 15-30 dias.

Os cálculos relacionados a taxa de crescimento específico (SGR) foram aplicados segundo a fórmula (Cui & Wootton, 1988):

$$SGR_w = 100(\ln W_t - \ln W_0)/t,$$

onde W é o peso final e W₀ o inicial do peixe, enquanto t é o número de dias (= 30). A equação usada para calcular o SGR assume que o peso do peixe aumenta exponencialmente e isso é válido para a maioria dos peixes jovens cultivados por um curto período (Hopkins, 1992).

Já o fator de condição (K) foi calculado pela equação de Hile (1936):

$$K = \frac{100W}{L^3}$$

onde W é o peso (g) e L o comprimento (cm). O fator de condição indica uma variação individual da relação de peso-comprimento, nos permitindo compreender as circunstâncias nas quais o peixe vem se desenvolvendo (Le Cren, 1951), apontado se há ou não boa condição de bem estar (Araneda et al., 2008). Valores acima de 1 são considerados para peixes que

apresentam boa condição de bem estar (Froese, 2006), o que implica na ausência ou baixa ocorrência de um estado de estresse (Barton, 2002).

O coeficiente de crescimento em função da temperatura (“thermal growth coefficient” – TGC) foi calculado a partir da fórmula base:

$$\sqrt[3]{W_t} = \sqrt[3]{W_0} + \left[\left(\frac{T}{1000} \right) \times t \right]$$

onde W_t é a massa final, W_0 a massa inicial, T a temperatura em °C e t o tempo em dias. O TGC pode ser um importante preditor de crescimento em relação a temperatura, uma vez que peixes são animais ectotérmicos e seu metabolismo está suscetível as variações de temperatura do ambiente (Jobling, 2003).

Por fim, aplicamos o modelo matemático de Ricker:

$$(\log W = \log a + b \log L),$$

em que W é a massa média final, a é o coeficiente de regressão, b é o coeficiente de relação entre massa e comprimento e L é o comprimento. O modelo indica o perfil de crescimento do animal. Sendo considerados três padrões: os animais podem apresentar crescimento isométrico quando o aumento de comprimento e massa é linear; alométrico positivo, quando a massa aumenta mais intensamente que o comprimento; ou alométrico negativo, quando o aumento no crescimento superar o da massa (Wootton, 1992). Quando o índice de Ricker é menor do que 3, consideramos que perfil de crescimento é alométrico negativo, se maior que 3 o perfil é alométrico positivo e quando igual a 3 é considerado isométrico.

2.4. Análise de dados

Os dados de massa, comprimento e ingestão foram usados para estimar a taxa de crescimento específico, a taxa de crescimento em função da temperatura, a variação de massa e comprimento bruto, a variação percentual de massa e comprimento, o fator de condição e o

modelo matemático de ricker. Inicialmente os dados foram testados quanto a normalidade e homocedacidade. Nos casos onde essas premissas foram violadas (SGR e TGC), os dados foram transformados (log) para aumentar a distribuição normal e a homogeneidade. Além disso, nessas análises os valores outliers foram retirados da amostra. Por fim, a análise de dados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) mista, tendo como fator independente a pista química e como medida repetida os pontos temporais (1°, 15° e 30° dias) ou períodos (1° - 15° e 15° - 30° dias). Quando necessário, a ANOVA foi complementada pelo teste de Newman-Keuls. Consideramos diferenças estatísticas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Identificamos que os animais apresentaram um perfil de crescimento alométrico negativo. Ao aplicarmos o modelo de Ricker, constatamos ao longo do período completo de observação (30 dias) um coeficiente de relação entre massa-comprimento 'b' de 2,135 para o tratamento de necromônio e 2,177 para o controle (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de crescimento da tilápia-do-Nilo exposta ao necromônio de coespecífico

Condição	Equação de Ricker decomposta ($\log W = \log a + b \log L$)	Valor 'b'
Controle	$\log 9,74 = \log 0,150 + 2,177 \log 6,79$	2.177
Necromônio	$\log 10,01 = \log 0,165 + 2,135 \log 6,84$	2.135

W = massa final média, a = coeficiente de regressão, b = coeficiente de relação entre massa e comprimento, L = comprimento final médio

Tanto a massa, quanto o comprimento (Fig. 1) aumentaram ao longo do tempo. A massa e o comprimento apresentaram efeito significativo do tempo (massa: $F_{(2;50)} = 194,9$; $P < 0,0001$; comprimento: $F_{(2;50)} = 232,6$; $P < 0,0001$), mas sem efeito da pista química (massa: $F_{(1;25)} = 0,25$; $P = 0,74$; comprimento: $F_{(1;25)} = 0,42$; $P < 0,52$), que também não interagiu significativamente com o tempo (massa: $F_{(2;50)} = 0,38$; $P = 0,68$; comprimento: $F_{(2;50)} = 0,26$; $P = 0,77$).

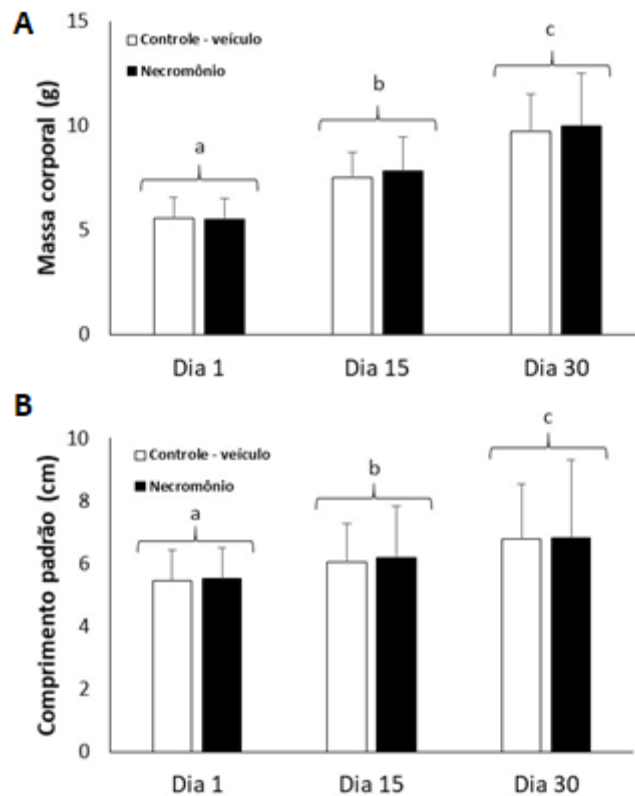


Figura 1. Efeitos do necromônio na massa corporal (A) e crescimento padrão (B) da tilápia-do-Nilo. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA mista, fator independente = pista química, medida repetida = tempo).

Em relação à variação percentual de massa (Fig. 2) observamos uma diminuição para os animais expostos ao necromônio comparando a primeira quinzena de experimentação com a segunda quinzena. Houve interação entre a pista química e o tempo (interação: $F_{(1;24)} = 4,9$; $P = 0,037$; efeitos isolados – necromônio: $F_{(1;24)} = 1,22$; $P = 0,28$; tempo: $F_{(1;24)} = 17,4$; $P < 0,001$). Já, em relação ao comprimento (Fig. 2), não houve alteração significativa nesta variável ao longo do tempo (necromônio: $F_{(1;24)} = 0,076$; $P = 0,79$; tempo: $F_{(1;24)} = 0,14$; $P = 0,71$; interação: $F_{(1;24)} = 0,65$; $P = 0,43$; Fig.)

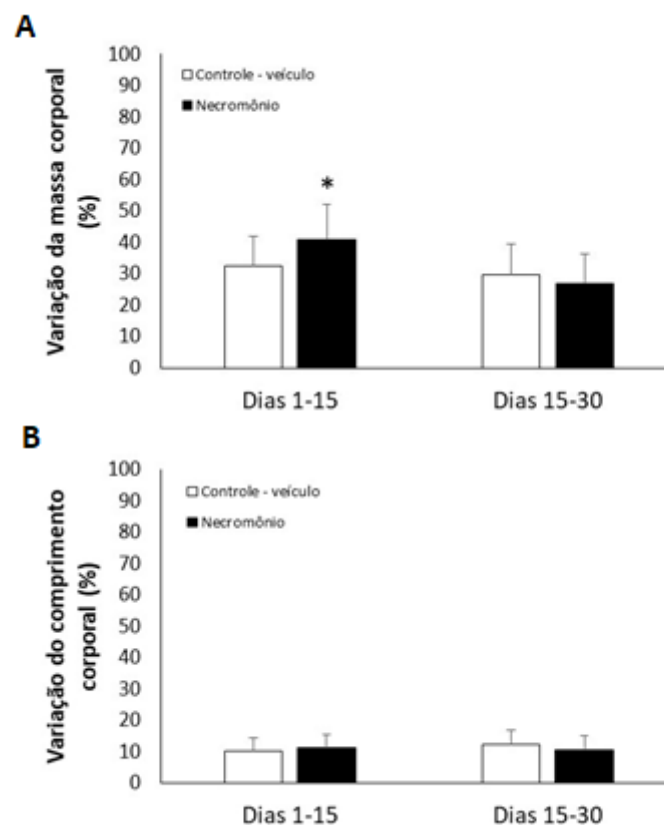


Figura 2. Efeitos do necromônio na variação percentual de massa corporal (A) e de crescimento (B) na tilápia-do-Nilo. *indica diferença significativa (ANOVA mista, fator independente = pista química, medida repetida = tempo) dentro de um mesmo tratamento.

A taxa de crescimento específico (SGR) (Fig. 3) reduziu ao longo do tempo em animais expostos ao necromônio, indicando uma perda no potencial de crescimento. Houve uma interação significativa entre a pista química e o tempo (interação: $F_{(1;23)} = 4,7$; $P = 0,041$; efeito isolados – necromônio: $F_{(1;23)} = 0,08$; $P = 0,78$; tempo: $F_{(1;23)} = 14,3$; $P < 0,001$).

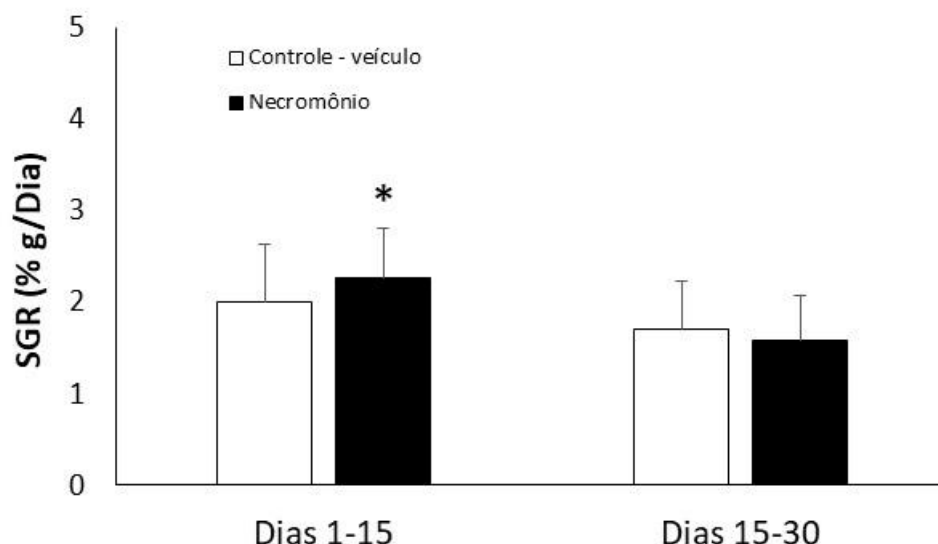


Figura 3. Efeitos do necromônio na taxa de crescimento específico (Specific Growth Rate – SGR) na tilápia-do-Nilo. *indica diferença significativa (ANOVA mista, fator independente = pista química, medida repetida = tempo) dentro do mesmo tratamento.

Quando analisamos o fator de condição (K), vimos que para esta variável através da ANOVA houve uma redução significativa com o tempo ($F_{(1;22)} = 4,9$; $P = 0,012$). Portanto, existe uma diminuição do fator de condição ao longo do tempo (Fig. 4), independente da pista química ($F_{(1;22)} = 1,8$; $P = 0,20$). Para esses fatores também não houve interação ($F_{(1;22)} = 0,04$; $P = 0,96$). Os fatores de condição médios obtidos aqui indicam que os animais estão em bom estado geral ($K > 1$; [Froese, 2006]) independentemente das pistas químicas a que foram expostos.

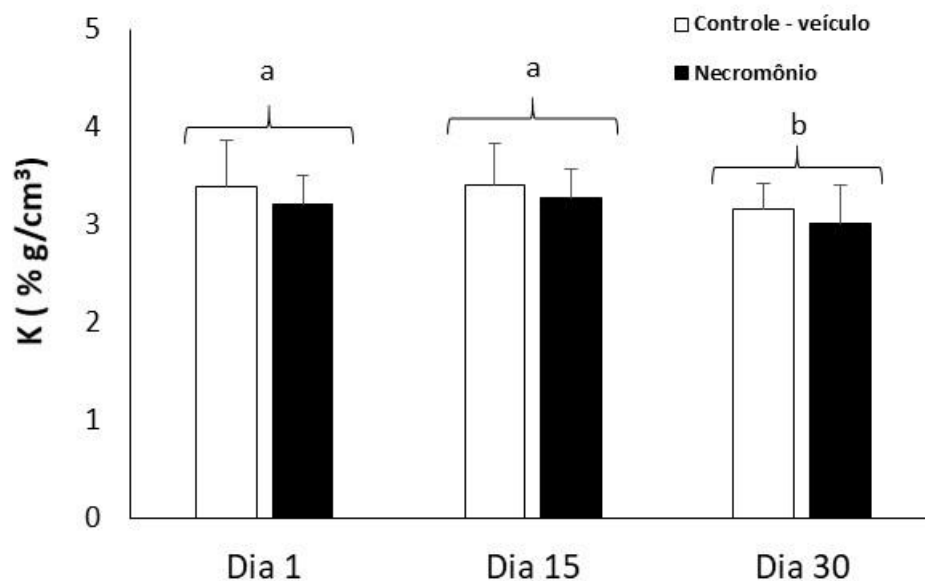


Figura 4. Efeitos do necromônio no fator de condição (K) na tilápia-do-Nilo. Letras diferente denotam diferença estatisticamente significativa (ANOVA mista, fator independente = pista química, medida repetida = tempo) ao longo do tempo.

Não houve diferença significativa (Teste t; $t = 1,8$; $P = 0,083$) para a temperatura ao compará-la entre a primeira ($26,83\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,5$) e a segunda quinzena ($26,02\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,9$) do experimento. Com a ANOVA vimos uma interação significativa entre as pistas químicas e o tempo (interação: $F_{(1;23)} = 4,7$; $P = 0,04$; efeitos isolados – necromônio: $F_{(1;23)} = 0,05$; $P = 0,56$; tempo: $F_{(1;23)} = 8,1$; $P = 0,009$), mostrando que o TGC diminuiu para os animais expostos ao necromônio em relação a sua condição inicial dentro da média de temperatura encontrada no período de experimentação (Fig. 5).

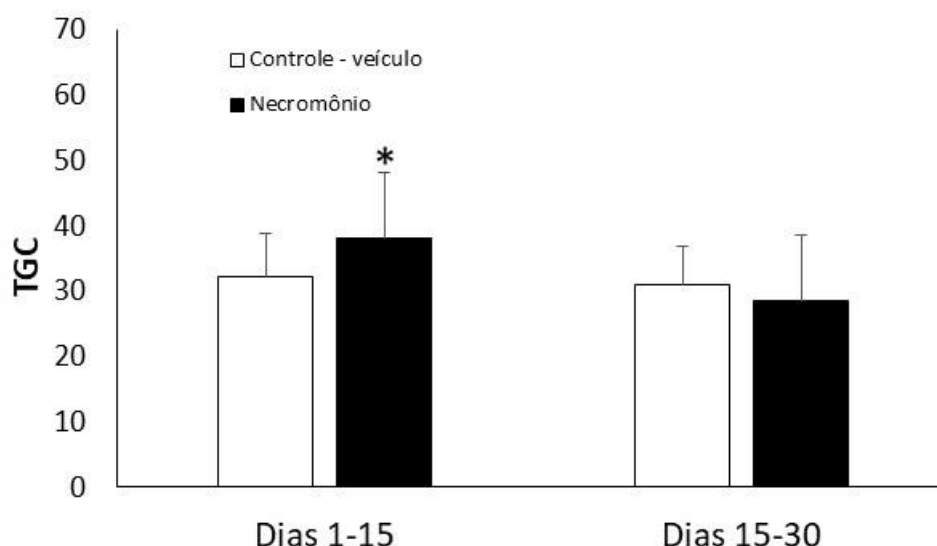


Figura 5. Efeitos do necromônio no coeficiente de crescimento em função da temperatura (TGC) na tilápia-do-Nilo. *indica diferença estatisticamente significativa (ANOVA mista, fator independente = pista química, medida repetida = tempo) no mesmo tratamento

A latência média para abocanhar o alimento (Fig. 6) também não apresentou efeito da pista química ($F_{(1;25)} = 0,37$; $P = 0,55$), do tempo ($F_{(1;25)} = 0,12$; $P = 0,73$) e nem houve interação entre esses fatores ($F_{(1;25)} = 0,005$; $P = 0,94$).

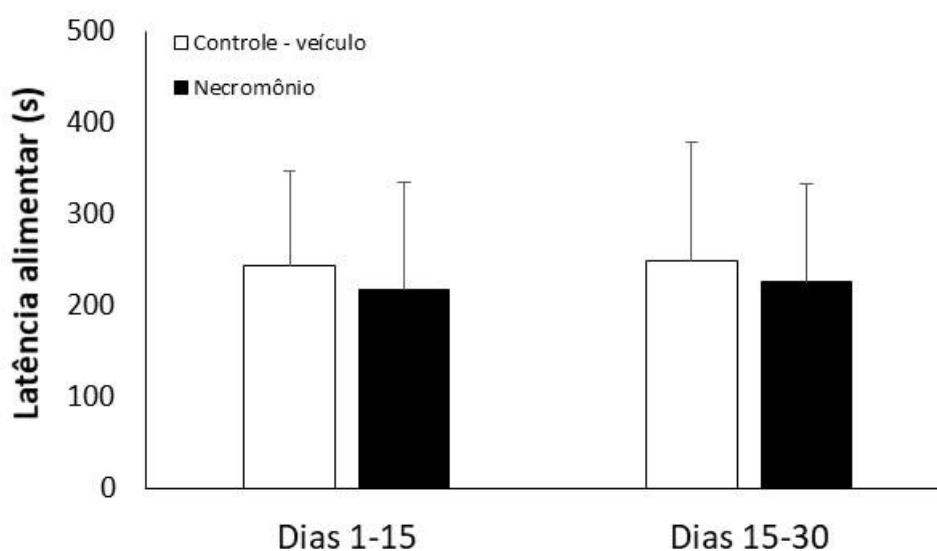


Figura 6. Efeitos do necromônio na latência alimentar média na tilápia-do-Nilo. Não observamos efeitos significativos da pista química, do tempo ou interação entre esses fatores (ANOVA mista, fator independente = pista química, medida repetida = tempo).

Também foi avaliado um conjunto de eixos morfométricos lineares, conforme descrito e ilustrado na tabela 1. Todos apresentaram um aumento significativo ao longo do tempo, mas

raras vezes a interação entre o tempo e o necromônio foi observada. Entretanto, para o eixo 2, identificamos um efeito significativo do necromônio ($F_{(1;25)} = 5,24$; $P = 0,031$), no qual os animais expostos a pista química tiveram uma diminuição deste eixo em relação ao controle.

4. Discussão

Neste estudo mostramos que a exposição crônica ao necromônio de coespecífico interfere no perfil de crescimento da tilápia-do-Nilo, assim como havíamos hipotetizado. Diversas variáveis nos conduzem para isso, como o decréscimo na variação de massa, na taxa de crescimento específico e na taxa de crescimento em função da temperatura.

Apesar de algumas variáveis quantificadas não terem sido afetadas pela pista química, estas foram importantes no entendimento de como o modelo reage quando estimulado por necromônios de coespecíficos. Um exemplo claro é a latência alimentar, uma variável comportamental que não foi alterada pelo estímulo. Esta é uma variável relevante relacionada a comportamentos antipredatórios, já que pode indicar um comportamento defensivo quando a ação de se alimentar é adiada temporalmente. Embora se alimentar seja adaptativo, se manter vivo mesmo em prol do sacrifício calórico imediato pode se tornar mais relevante (Alcock, 2009). Então, quando não observamos efeito nessa variável, mas encontramos uma perda significativa no percentual de massa ao longo do tempo e ainda decréscimos na taxa de crescimento específico e na taxa de crescimento em função da temperatura, notamos que existe alguma resposta ao estímulo estressor que não está diretamente relacionada ao comportamento. De acordo com a literatura (Giaquinto & Volpato, 2001; Duggan et al., 2016; Harris & Carr, 2016) não é sempre que o apetite é alterado por consequência da exposição de um estímulo estressor e existem circunstâncias em que mesmo sem alterações no comportamento alimentar, ajustes no metabolismo mobilizam a energia captada para lidar com esse estressor, no lugar de promover o crescimento, por exemplo (Volpato & Fernandes, 1994; Bernier et al., 2004; Volpato et al., 2013).

A variação percentual no comprimento não indicou nenhum efeito aparente dos necromônios, já o comprimento bruto aumentou ao longo do tempo. É natural que peixes em desenvolvimento e em uma condição favorável aumentem essa variável (Wootton, 1992). Ainda mais quando observamos que o fator de condição só diminuiu no trigésimo dia em relação às medidas anteriores, entretanto é natural essa queda com o passar dos dias, afinal há certo limite no aumento de comprimento, ainda que o animal possa variar em relação à massa, pois pode acumular reservas (Wootton, 1992). Vimos ainda um decréscimo na taxa de crescimento específico e na taxa de crescimento em função da temperatura e isso indica uma perda de potencial crônico de crescimento, já que são variáveis preditivas relacionadas ao ganho de massa diário (Wootton, 1992; Cho & Bureau, 1998) e mesmo que em um primeiro momento observa-se um aumento bruto em comprimento e massa, esperasse que ao longo do tempo exista uma desaceleração do grupo exposto ao necromônio em relação a eles mesmos, uma vez que encontramos esse decréscimo na taxa de crescimento específico.

O perfil de crescimento foi descrito no presente estudo como alométrico negativo, ou seja, houve um aumento maior no comprimento do que na massa. Estudos relacionados à produção de peixes, em especial de tilápias, indicam que o perfil de crescimento pode variar devido a diversos fatores e condições relacionados ao ambiente, como as condições físico-químicas da água (Berg & Butterfield, 1966; Santos, 1999). Portanto, podemos afirmar que para a nossa condição experimental a tilápia-do-Nilo apresentou perfil alométrico negativo e essa condição não foi alterada pela pista química disponibilizada. Outro ponto interessante e intrigante está relacionado aos eixos morfométricos lineares, nos quais apenas um deles apresentou alteração. Observamos uma diminuição do eixo que representa o início do pedúnculo caudal e isso indica menos musculatura na região caudal o que poderia indicar limitações para nado em ‘explosão’ (‘swimming burst’), potencialmente usados em manobras de escape. Essa modificação é um efeito diferente do esperado, uma vez que esperávamos observar adaptações que indicassem melhor capacidade de uma potencial fuga, mas definitivamente ainda é uma questão que

necessita de maiores esclarecimentos morfológicos e, possivelmente, histológicos para compreendermos melhor o que essas alterações significam.

Existem efeitos no crescimento da tilápia-do-Nilo quando exposta aos necromônios. Mostramos uma diminuição significativa em variáveis importantes no desenvolvimento de juvenis de tilápia, como a taxa de crescimento específico, a taxa de crescimento em relação à temperatura e a variação percentual de massa. Entretanto outras respostas encontradas ainda precisam de mais esclarecimentos, como a diminuição encontrada no eixo morfofuncional do início do pedúnculo caudal. De toda maneira, nosso estudo evidencia a complexidade dos eventos relacionados à comunicação química e respostas defensivas, tanto comportamentais, quanto fisiológicas ou morfológicas. Diversos trabalhos (Chivers et al., 2008; Barcellos et al., 2011; Oliveira et al., 2014; Sanches et al., 2015, Duggan et al., 2016; Miyai et al., 2016) apontam para essa complexidade utilizando outros estímulos estressores e aqui corroboramos, agora com os necromônios.

5. Referências

- Alcock J. Animal Behavior: An Evolutionary Approach. 9th Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 2009
- Alvarenga CMD & Volpato GL. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiol Behav.* 1995. 57(1), 75-80.
- Araneda M, Pérez EP, Gasca-Leyva E. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state base on length and weight. *Aquaculture*; 2008. 283(1-4), 13-18.
- Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhier F. The effects of stocking density and social interaction on acute stress response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquacult Res.* 1999. 30,887-892.
- Barcellos LJG, Volpato GL, Barreto RE, Coldebella I, Ferreira D. Chemical communication of handling stress in fish. *Physiol Behav*; 2011. 103, 372-375.

Barreto RE & Volpato GL. Caution for using ventilatory frequency as an indicator of stress in fish. Behav Process. 2004. 66,43-51.

Barreto RE, Barbosa A, Giassi ACC, Hoffmann A. The 'club' cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. Mar. Freshwater Behav Physiol; 2010. 43, 75-81.

Barreto RE, Miyai CA, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL. Blood cues induce antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics. PLoS One. 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054642>.

Barton BA. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol; 2002. 42(3), 517-525.

Bernier NJ, Bedard N, Peter RE. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. Gen Comp Endocrinol; 2004. 135, 230-240.

Chivers DP, Smith RJF. Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: A review and prospectus. Ecoscience; 1998. 5, 338-352.

Chivers DP, Zhao X, Brown GE, Marchant TA, Ferrari COM. Predator-induced changes in morphology of a prey fish: The effects of food level and temporal frequency of predation risk. Evol Ecol; 2008. 22, 561-574.

Cho CY, Bureau DP. Development of bioenergetics models and the Fish-PrFEQ software to estimate production, feeding ration and waste output I aquaculture. Aquat Living Resour; 1998. 11, 199-210

Cui Y & Wootton RJ. Bioenergetics of growth of a cyprinid, *Phoxinus phoxinus* (L.): the effect of ration and temperature on growth rate and efficiency. J Fish Biol. 1988. 33,763-773.

Duggan PE, Prater C, Carr JA, Harris BN. Predator presence decreases food consumption in juvenile *Xenopus laevis*. Behav Ecol Sociobiol; 2016. 70, 2005-2015.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to Food Security and Nutrition for All. Rome; 2016. 200 pp.

Fernandes MO & Volpato GL. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiol Behav.* 1993. 54(2), 319-323.

Froese R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J Appl Ichthyol*; 2006. 22, 241-253.

Giaquinto PC, Volpato GL. Hunger suppresses the onset and the freezing component of the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behaviour*; 2001. 138, 1205-1214.

Hara TJ. The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Fish Biol Fisher.* 1994. 4,1-35.

Harris BN, Carr JA. The role of the hypothalamus-pituitary-adrenal/interrenal axis in mediating predator-avoidance trade-offs. *Gen Comp Endocrinol*; 2016. 230-231, 110-142.

Hopkins KD. Reporting fish growth: A review of the basics. *J World Aquacult Soc.* 1992. 23, 173-179.

Hossain MS, Chowdhury SR, Das NG, Rahaman MM. Multi-criteria evaluation approach to GIS-based land-suitability classification for tilapia farming in Bangladesh. *Aquac Int*; 2007. 15, 425-443.

Jobling M. The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquacult Res.* 2003. 34, 581-584.

Jordão LC, Volpato GL. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour*; 2000. 137, 681-690.

Kats LB, Dill LM. The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience*; 1998. 5,361-394.

Le Cren ED. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). J Anim Ecol; 1951. 20(2), 201-219.

Lima SL. Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. Adv Stud Behav. 1998. 27, 215-290.

Mathis A, Smith RJF. Intraspecific and cross-superorder responses to chemical alarm signals by brook stickleback. Ecology; 1993. 74, 2395-2404.

Miyai CA, Sanches FHC, Pinho-Neto CF, Barreto RE. Effects of predator odour on antipredatory responses of Nile tilapia. Physiol Behav; 2016. 165, 22-27.

Normandes EB, Barreto RE, Carvalho RF, Delicio HC. Effects of betaine on the growth of the fish piaçu, *Leporinus macrocephalus*. Braz Arch Biol Technol; 2006. 49, 757-762.

Oliveira TA, Koakoski G, Motta AC, Piatto AL, Barreto RE, Volpato GL, Barcellos LJG. Death-associated odors induce stress in zebrafish. Horm Behav; 2014. 65, 340-344.

Sanches FHC, Miyai CA, Pinho-Neto CF, Barreto RE. Stress responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. Physiol Behav; 2015. 149, 8-13.

Tjossem SF. Effects of fish chemical cues on vertical migration behavior of *Chaoborus*. Limnol Oceanogr. 1990. 35(7), 1456-1468.

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

Volpato GL & Barreto RE. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. Braz J Med Biol Res. 2001. 34(8), 1041-1045.

Volpato GL, Bovi TS, de Freitas RHA, da Silva DF, Delicio HC, Giaquinto PC, Barreto RE. Red light stimulates feeding motivation in fish but does not improve growth. PloS One; 2013. 8(3), e59134. doi:10.1371/journal.pone.0059134.

Wagner CM, Stroud EM, Meckley TD. A deathly odor suggests a new sustainable tool for controlling a costly invasive species. Can J Fish Aquat Sci; 2011. 68, 1157-1160.

Wisenden BD. Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 2000. 355, 1205-1208.

Wootton RJ. Constraints in the evolution of fish life histories. *Netherlands Journal of Eur Zool J*; 1992. 42(2-3), 291-303.