

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia

Tese de doutorado

MUDANÇAS DO CLIMA E COMUNICAÇÃO QUÍMICA: EFEITOS E IMPLICAÇÕES
NAS RESPOSTAS ANTIPREDATÓRIAS

Alexandre Luiz Arvigo

Orientadora: Tânia Marcia Costa

São Vicente – SP

2024

Alexandre Luiz Arvigo

MUDANÇAS DO CLIMA E COMUNICAÇÃO QUÍMICA: EFEITOS E IMPLICAÇÕES
NAS RESPOSTAS ANTIPREDATÓRIAS

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

Orientadora: Tânia Marcia Costa

São Vicente – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Arvigo, Alexandre Luiz.

Mudanças do clima e comunicação química : efeitos e implicações nas respostas antipredatórias / Alexandre Luiz Arvigo. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Tânia Marcia Costa

Capes: 20404000

1. Acidificação. 2. Aquecimento Global. 3. Compostos de Nitrogênio. 4. Predação (Biologia). 5. Defesas animais.

Palavras-chave: Acidificação; Aquecimento global; Compostos nitrogenados; Respostas defensivas; Substância de alarme.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Mudanças do clima e comunicação química: Efeitos e implicações nas respostas antipredatórias.

AUTOR: ALEXANDRE LUIZ ARVIGO

ORIENTADORA: TÂNIA MARCIA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TÂNIA MARCIA COSTA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências – Câmpus do Litoral Paulista – UNESP

Profa. Dra. ANA CAROLINA LUCHIARI (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia e Comportamento / UFRN (Campus Universitário Lagoa Nova) – Natal (RN)

Prof. Dr. FÁBIO HENRIQUE CARRETERO SANCHES (Participação Presencial)
Departamento Instituto de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Profa. Dra. PERCILIA CARDOSO GIAQUINTO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / IBB / UNESP - Botucatu

Prof. Dr. FERNANDO RAFAEL DE GRANDE (Participação Presencial)
Departamento Instituto de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - SP

Botucatu, 27 de fevereiro de 2024

Amanda Regina Sanches
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-graduação
do Instituto de Biociências

Agradecimentos

Esta tese 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.

Gostaria de começar agradecendo a minha família (Neusa Rodrigues Arvigo, Ayrton Luiz Arvigo, Maria Claudia Arvigo) que me deram o suporte para alcançar este momento desde a graduação até o doutorado. Agradeço a todos os amigos que acumulei ao longo dos anos (Alexandre Alves, Gustavo Barros, Fernando de Grande, Isabela Beverari, João Pedro Mukai, Juan Pardo, Márcio Camargo Araújo João, Maria Clara Habib, 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.

Agradeço também a equipe do Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal (Labecom) que foram essenciais para a elaboração e execução deste e de tantos outros trabalhos nesses mais de 10 anos. 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, e também a Ana Paula Ferreira e Leonardo Cirilo que foram muito importantes no resultado final deste trabalho. Agradeço ao Prof. Dr. Wagner Vilegas que abriu as portas do seu laboratório (Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais – LBPN) para essa ideia e ao Renan Canute Kamikawachi que foi essencial na elaboração e execução do Capítulo I.

Não posso deixar de agradecer aos meus orientadores durante toda a minha formação Profa. Tânia Marcia Costa e Rodrigo Egydio Barreto, que me auxiliaram durante todos esses anos, em especial durante o desenvolvimento deste trabalho, talvez o mais ambicioso e desafiador de toda minha carreira.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da Unesp de Botucatu e ao Campus de São Vicente, pela formação e estrutura. Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto intitulado, "Impacto das mudanças do clima e da perda da biodiversidade na força das interações tróficas em ecossistemas costeiros" (Número de processo: 2020/03171-4), ao qual o presente trabalho está inserido.

A todos esses e outros tantos, deixo o meu mais sincero "muito obrigado", afinal essa trajetória só foi possível graças ao apoio de cada um.

Sumário

Agradecimentos	
Resumo	
Abstract	
Considerações Iniciais	4
Referências	9
Capítulo I: Análise descritiva da composição química da substância de alarme em <i>zebrafish</i>	14
Resumo	15
1. Introdução.....	16
2. Materiais e método	17
2.1. Animais e condições de estoque	17
2.2. Delineamento experimental	18
2.3. Procedimentos.....	19
2.3.1. Procedimentos específicos	19
a. Preparação da pista química de alarme	19
b. Preparação dos extratos	19
2.3.2. Identificação das substâncias presentes nas frações bioativas	19
a. Cromatografia líquida e espectrometria de massas	19
2.4. Procedimentos experimentais	20
2.4.1. Estudo bio guiado	20
a. Condições dos aquários.....	20
b. Variáveis resposta.....	21
c. Análise estatística	21
3. Resultados.....	21
4. Discussão.....	24
5. Certificado e autorizações	27
6. Referências.....	28
Capítulo II: Aquecimento global e acidificação oceânica: Efeitos de estressores climáticos no comportamento do amboré	32
Resumo	33
1. Introdução.....	34
2. Materiais e Método	36
2.1. Animais e condições de estoque	36
2.2. Delineamento experimental	36

2.3. Procedimentos.....	38
2.3.1. Procedimentos específicos	38
a. Preparação da pista de alarme	38
b. Controle das variáveis ambientais (temperatura e pH).....	38
2.4. Procedimentos Experimentais	39
a. Condições dos Aquários	39
b. Variáveis comportamentais.....	40
c. Análise dos dados	40
3. Resultados.....	40
4. Discussão.....	43
5. Certificado e autorizações	47
6. Referências.....	48
Considerações Finais.....	52
Referências	54

Resumo

As mudanças do clima começaram a ser observadas em meados do século XX e desde então têm alterado diversas relações ecológicas ao redor do globo. Essas mudanças não poupam nem mesmo as interações presa-predador, nas quais os estressores climáticos podem afetar drasticamente os mecanismos de comunicação química, amplamente utilizados para a detecção de predadores. Tanto o aquecimento global quanto a acidificação oceânica podem prejudicar os processos envolvidos na comunicação química, afetando as etapas de produção, transmissão e recepção do sinal. O estudo dos efeitos desses estressores na interação presa-predador, especialmente na comunicação química, torna-se cada vez mais relevante. Assim, o presente trabalho buscou compreender mais a fundo os mecanismos da comunicação química mediada pela substância de alarme, e os possíveis efeitos do aquecimento e acidificação na recepção do sinal. Inicialmente, investigamos a composição química para elucidar as moléculas responsáveis pela sinalização de risco. Identificamos substâncias nitrogenadas, como esfingolipídeos, aminoácidos e derivados de purina, como principais componentes. Nossos resultados foram corroborados por estudos bioguiados, que demonstraram que a fração polar ainda mantinha as respostas de alarme. Em uma segunda etapa do estudo, avaliamos os comportamentos antipredatórios do amoré quando exposto a substância de alarme em condições de temperatura e pH alterados. Os resultados indicam que tanto o aquecimento quanto a acidificação tiveram um impacto significativo no comportamento dos animais em resposta à substância de alarme. Observamos alterações no tempo de permanência em abrigos e no número de investidas dos peixes expostos as condições de aquecimento e acidificação, em comparação com os peixes em condições controle. Dessa forma evidenciamos que a substância de alarme é uma pista polar, provavelmente com os derivados de purina como seus principais componentes bioativos, e demonstramos efeitos evidentes dos estressores climáticos nas respostas comportamentais, algo que pode representar um desafio significativo para a sobrevivência.

Palavras chave - Substância de alarme, compostos nitrogenados, acidificação, aquecimento global, respostas defensivas.

Abstract

The climate changes began to be observed in the mid-20th century and have since altered various ecological relationships around the world. These changes spare not even predator-prey interactions, where climatic stressors can dramatically affect chemical communication mechanisms, widely used for predator detection. Both global warming and ocean acidification can impair the processes involved in chemical communication, affecting the stages of production, transmission, and reception of the signal. Studying the effects of these stressors on predator-prey interaction, especially in chemical communication, becomes increasingly relevant. Thus, the present work sought to understand more deeply the mechanisms of alarm substance-mediated chemical communication, and the possible effects of warming and acidification on signal reception. Initially, we investigated the chemical composition to elucidate the molecules responsible for risk signaling. We identified nitrogenous substances, such as sphingolipids, amino acids, and purine derivatives, as the main components. Our results were corroborated by bioguided studies, which demonstrated that the polar fraction still maintained alarm responses. In the second stage of the study, we evaluated the anti-predatory behaviors of the Frillfin goby when exposed to alarm substance under altered temperature and pH conditions. The results indicate that both warming and acidification had a significant impact on the Frillfin goby behavior in response to the alarm substance. We observed changes in the time inside shelters and the number of bites by fish exposed to warming and acidification conditions, compared to fish under control conditions. Thus, we demonstrated that the alarm substance is a polar cue, likely with purine derivatives as its main bioactive components, and showed the effects of climatic stressors on behavioral responses, which may represent a significant challenge for survival.

Key words - Alarm substance, nitrogenous substances, acidification, global warming, defensive responses.

1 **Considerações Iniciais**

2 Comunidades ecológicas possuem fatores, como densidade e distribuição dos
3 organismos, naturalmente regulados por interações intra/interespecíficas (por exemplo,
4 predação, competição e mutualismo) sendo estas passíveis de alterações por meio de
5 informações bióticas e abióticas (Dusenbury & Freeman, 1993). Dentre essas interações, a
6 relação presa-predador exerce um papel fundamental na dinâmica das comunidades (Schmitz,
7 2008; Ripple et al., 2001). A percepção da presa em relação ao predador e vice-versa se dá pela
8 interpretação de sinais sensoriais disponíveis no ambiente (Werner & Anholt, 1996; Diehl &
9 Eklov, 1995; Persson & Eklov, 1995), formando uma relevante ponte de transferência de
10 informações, na qual um emissor transmite as informações e um receptor as recebe e as
11 interpreta (Cronin, 2005; Hailman, 1977). Desta forma, todos os processos que direcionam a
12 produção, transmissão, detecção e processamento de sinais sensoriais de outros organismos
13 afetam a dinâmica presa-predador (Draper & Weissburg, 2019). São mecanismos ecológicos
14 como o *arms race* que governam a evolução dessa interação, selecionando predadores que se
15 mostram mais eficientes na capacidade de detectar e capturar uma presa, da mesma forma,
16 apenas presas mais capacitadas para reconhecer e escapar dos predadores sobreviverão (Ferrari
17 et al., 2010). Do ponto de vista da presa, a habilidade de identificar rapidamente uma ameaça
18 pode ser considerada como o primeiro passo para uma resposta antipredatória eficaz (Endler,
19 1986).

20 Essas interações presa-predador quando ocorrem em ambientes aquáticos tem na
21 comunicação química um fator de grande relevância. Afinal, pistas químicas podem se dissolver
22 facilmente e dispersar-se de maneira muito eficaz (Hara, 1994), com potencial para persistir por
23 grandes distâncias e longos períodos (Weissburg et al., 2014). Ela é ainda mais relevante em
24 situações nas quais a visão está prejudicada em função da turbidez ou baixa luminosidade, além
25 de se tornar essencial para organismos que apresentam a visão pouco desenvolvida (Wisenden,
26 2000). Entretanto, o ambiente aquático pode oferecer algumas limitações para este tipo de
27 comunicação, especialmente em áreas com grande turbulência ou alto fluxo de água (Mirza &
28 Chivers, 2001). Todas as interações ecológicas são extremamente complexas e as características
29 do emissor e receptor afetam essa troca de informações. Contudo, o contexto ambiental também
30 apresenta um papel importante para essa dinâmica (Draper & Weissburg, 2019). Por exemplo,
31 locais com características de turbulência e alto fluxo de água podem prejudicar a ação dos
32 predadores por interferir na capacidade de encontrarem presas através do uso de sinais
33 químicos, reduzindo o consumo (Weissburg & Zimmerfaust, 1994). Além disso, essas mesmas
34 condições ambientais podem aprimorar a capacidade de presas detectarem remotamente os

35 predadores por meio dessa sinalização química, deflagrando respostas antipredatórias (Pruett &
36 Weissburg, 2018; Smee et al., 2010; Shears et al., 2008; Leonard et al., 1998).

37 Impactos antropogênicos podem afetar processos sensoriais importantes para a interação
38 presa-predador modulando o contexto ambiental. Os efeitos das mudanças do clima começaram
39 a ser observados em meados do século XX e alteram diversas relações ecológicas ao redor do
40 globo (Kowalewska et al., 2020; Chen et al., 2011; Hickling et al., 2006; Perry et al., 2005;
41 Parmesan & Yohe, 2003). A intensificação das emissões de dióxido de carbono (CO₂)
42 provenientes das atividades humanas modificou muitas condições ambientais. Os aumentos
43 médios de temperatura, por exemplo, devem exceder os 2°C até 2100, segundo o IPCC (2021).
44 Impactos relacionados ao aquecimento estão cada vez mais presentes na literatura e evidenciam
45 o seu forte efeito sobre a interação presa-predador. Estudos mostram que o aumento da
46 temperatura pode afetar o equilíbrio metabólico de predadores, elevando a atividade destes
47 organismos e aumentando a demanda de forrageamento. Esse fenômeno aumentaria a pressão
48 sobre as presas e poderia afetar o equilíbrio de sua densidade, como já foi demonstrado em
49 grupos como peixes e crustáceos (Goldenberg et al., 2018; Wu et al., 2017; Pistevos et al.,
50 2015). Em contrapartida, outros trabalhos evidenciam alterações relacionadas à temperatura em
51 espécies de presas. Nesses casos, o aquecimento pode levar à redução da atividade dos animais
52 (Kidawa et al., 2010) e até mesmo, à supressão do metabolismo, reduzindo a eficiência das
53 respostas antipredatórias (Paganini et al., 2014). Ainda do ponto de vista metabólico da presa, o
54 aquecimento pode afetar o equilíbrio no gasto energético do animal, refletindo em uma
55 modificação na resposta defensiva (Briceño et al., 2020).

56 Outro exemplo, além da temperatura, está relacionado a composição química da água. O
57 acréscimo de CO₂ vem causando um fenômeno conhecido como acidificação (Doney et al.,
58 2009), que implica, entre outros fatores, em uma redução do pH da água numa estimativa de
59 0.3-0.4 unidades até 2100 em relação ao valor atual de aproximadamente 8.1 (IPCC, 2021). A
60 acidificação pode afetar todas as etapas da comunicação química, conhecidas como via de
61 transdução sensorial, e modificar a capacidade dos animais em detectar e processar os sinais
62 químicos (Draper & Weissburg, 2019; Briffa et al., 2012). Em sua pesquisa, Boullis et al.
63 (2017) demonstraram que, em condições de CO₂ aumentado, pulgões produzem menos
64 feromônio de alarme e apresentam respostas menos evidentes. É possível que isso também
65 ocorra no ambiente aquático em um cenário de acidificação. Na outra ponta desta cadeia,
66 existem relatos de que a acidificação reduz a sensibilidade olfativa, seja em modificações no
67 aparato olfativo (robalo - Porteus et al., 2018) ou em alterações na própria pista química
68 (caranguejo verde - Roggatz et al., 2016) ou ainda podendo interferir no processamento

69 sensorial promovido pelo sistema nervoso central (peixe palhaço - Dixson et al., 2010; peixe
70 palhaço e donzela - Munday et al., 2010).

71 Tanto para o aquecimento quanto para a acidificação, a falta de capacidade de
72 identificar, distinguir e evitar o risco de predação vem sendo descrito em diversas espécies de
73 animais, como peixes donzela (Chivers et al., 2014), truta (Munday et al., 2013), salmão (Ou et
74 al., 2015), e até mesmo gastrópodes (Froehlich & Lord, 2020; Abboud et al., 2019; Marínquez
75 et al., 2014). É importante ressaltar que não apenas a completa abolição de um sinal de risco
76 pode ser prejudicial à presa. A intensidade da sinalização de risco é um fator avaliado pelas
77 presas no momento de deflagrar respostas defensivas (Supekar & Gramapurohit, 2020), portanto
78 mascarar ou diminuir a intensidade original do sinal pode configurar um prejuízo na eficácia da
79 comunicação, mesmo que supostamente a plasticidade comportamental possa aliviar alguns dos
80 impactos gerados pelas mudanças do clima (Beever et al., 2017).

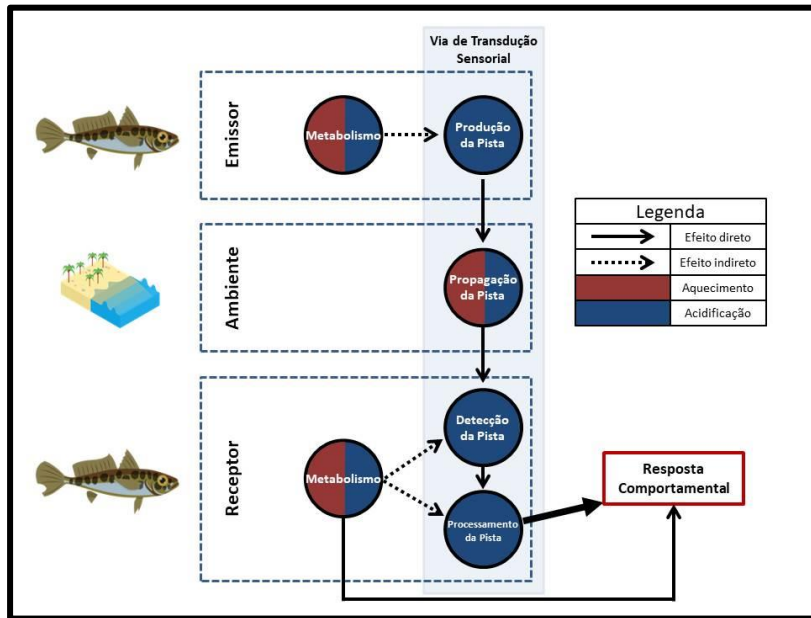
81 A comunicação química tem sido colocada como um dos mecanismos a serem
82 diretamente afetados pelas mudanças do clima no futuro (Draper & Weissburg, 2019), uma vez
83 que podem ocorrer impactos nos processos de geração, propagação e recepção (via de
84 transdução sensorial) das pistas químicas. Citamos modificações na emissão e recepção, mas
85 durante a propagação podemos encontrar essas alterações em âmbito molecular. Estudos já
86 avaliaram a desnaturação de proteínas sob os efeitos de variações de pH e temperatura, mas
87 observando soluções proteicas (Pelegrine & Gasparetto, 2005; Tanford, 1968; Neurath et al.,
88 1944) em um contexto diferente. Tendo em vista os conhecimentos físico/químicos de estruturas
89 moleculares, Porteus et al. (2018) e Leduc et al. (2010) sugeriram a possibilidade da ocorrência
90 de fenômenos como a desnaturação em um contexto de mudanças do clima, embora não tenham
91 testado. Já Lecchini et al. (2017) e Roggatz et al. (2016) conseguiram mostrar alterações
92 estruturais em peptídeos decorrentes da acidificação. Com base nesse arcabouço teórico, Draper
93 & Weissburg (2019) em sua revisão de literatura, alertam que as proteínas e peptídeos seriam
94 provavelmente os mais afetados pelos efeitos no ambiente em condições similares as impostas
95 pelas mudanças do clima. Proteínas e aminoácidos desempenham papéis cruciais tanto na
96 atividade do predador em busca da presa quanto na composição de risco percebida pela presa e
97 liberada pelo predador (odor do predador) (Poulin et al., 2018; Hay, 2009). Carr et al. (1996) e
98 Rittschof (1990) evidenciaram que esses compostos são os mais comuns nas interações presa-
99 predador devido à sua solubilidade em água e rápida degradação. No entanto, permanece
100 desconhecida a composição de outras pistas químicas envolvidas nas respostas antipredatórias,
101 como a pista química de alarme (Sanches et al., 2015; Ferrari et al., 2010; Wisenden, 2000;
102 Chivers & Smith, 1998; Pfeiffer, 1977) a qual pode ser uma sinalização mais especializada
103 (metabólito secundário) e menos suscetível à degradação ambiental, conforme sugerido por

104 Ferrari et al. (2010) e Chivers & Smith (1998). Em peixes, quando presentes, a pista de alarme
105 está em células epidérmicas específicas, denominadas célula “club” (Smith, 2000; Pfeiffer,
106 1977) e sua liberação está condicionada a uma lesão na epiderme fazendo com que os animais
107 que a detecte no ambiente deflagrem respostas antipredatória (Arvigo et al., 2019; Sanches et
108 al., 2015; Barreto et al., 2010; Wisenden 2000; Chivers & Smith, 1998; Pfeifer, 1977).

109 Conforme a argumentação teórica exposta até o momento, as mudanças do clima e as
110 variáveis associadas com a acidificação e o aquecimento podem afetar os processos da
111 transdução sensorial promovidos pela comunicação química na interação presa-predador,
112 impactando o emissor e a geração do sinal, a propagação e duração desse sinal no ambiente,
113 além do receptor e a sua capacidade de captar e interpretar essa sinalização. Draper &
114 Weissburg (2019) distinguem os efeitos das mudanças do clima de duas maneiras: indireta,
115 onde as interferências dependem de processos metabólicos; e direta, na qual as mudanças
116 alteram a produção, transmissão e recepção das pistas sensoriais (figura 1 – adaptada de Draper
117 & Weissburg, 2019). Portanto, compreender como a relação presa-predador mediada pela
118 comunicação química se comportará em um contexto de mudanças do clima, é de extrema
119 importância para entendermos possíveis alterações na dinâmica de comunidades e ecossistemas,
120 uma vez que é clara a existência de um efeito cascata vinda das interações mais estritas para as
121 mais abrangentes. Além disso, resultados relacionados a esta temática podem contribuir na
122 elaboração de futuras estratégias de mitigação e conservação.

123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138

139
140
141
142
143
144
145
146
147



148 **Figura 1** – Efeito do aquecimento e da acidificação na via de transdução sensorial da comunicação química. O
149 emissor controla a produção e o envio do sinal para o ambiente, que modula propagação da mensagem. Já o receptor
150 controla a detecção e o processamento deste sinal para determinar a resposta comportamental. O aquecimento pode
151 afetar indiretamente a emissão e a recepção do sinal, através de mudanças na atividade fisiológica e taxas
152 metabólicas, além de ter potencial de afetar diretamente a transmissão do sinal. A acidificação pode afetar
153 diretamente o comportamento sensorial por meio de mudanças na produção do sinal pelo emissor, na transmissão
154 através do ambiente e na detecção e processamento do receptor. A imagem apresenta um esquema das etapas da via
155 de transdução sensorial em uma comunicação entre animais coespecíficos, porém esta mesma ideia se aplica para
156 outras interações, como mensagens de presas heteroespecíficas e de predador para presa ou vice-versa. Esquema
157 adaptado do trabalho de Draper & Weissburg (2019).

158

159 Com a presente pesquisa, nosso objetivo foi compreender os efeitos das mudanças do
160 clima na via de transdução sensorial da comunicação química na interação presa-predador,
161 mediada pela pista de alarme. Isso foi realizado através da avaliação química da pista e das
162 respostas antipredatórias desencadeadas. Para alcançar esse objetivo, realizamos dois estudos
163 distintos. O primeiro visou avaliar a composição química da pista de alarme. Uma vez que,
164 compreender as moléculas responsáveis pela sinalização de alarme é fundamental não apenas
165 para avançar na discussão das interações presa-predador, mas também para inferir as
166 consequências na comunicação durante a etapa de propagação em cenários de mudanças do
167 clima. Isso é especialmente relevante, uma vez que os sinais químicos de alarme naturalmente
168 se degradam ao longo do dia (Bytheway et al., 2013; Chivers et al., 2013; Ferrari et al., 2007;
169 Ferner et al., 2005), e as alterações climáticas podem acelerar esse processo de degradação,
170 reduzindo a eficácia do sinal, como sugerido por Porteus et al. (2018) e Leduc et al. (2010). O
171 segundo estudo corresponde a uma análise comportamental, na qual buscamos observar uma
172 possível interferência do aquecimento e da acidificação na recepção do sinal. Nossa hipótese
173 sugere que o aquecimento e acidificação impactam negativamente a habilidade do receptor em
174 captar e interpretar a informação de risco mediada pela substância de alarme, alterando o
175 equilíbrio da interação entre presa e predador.

176

177 **Referências**

- 178 Abboud JC, Bartolome EA, Blanco M, Kress AC, Ellis IY, Yazzolino PK, et al. (2019) Carbon
179 dioxide enrichment alters predators avoidance and sex determination but only sex is mediated by
180 GABAA receptors. *Hydrobiologia*. 829, 307-322.
- 181 Arvigo AL, Miyai CA, Sanches FHC, Barreto RE, Costa TM (2019) Combined effects of
182 predator odor and alarm substance on behavioral and physiological responses of the pearl
183 cichlid. *Physiol Behav*. 206, 259-263.
- 184 Barreto RE, Barbosa-Junior A, Giassi ACC, Hoffmann A (2010) The „club“ cell and
185 behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in Nile tilapia. *Mar Freshw
186 Behav Physiol*. 43, 75-81.
- 187 Beever EA, Hall LE, Varner J, Loosen AE, Dunham JB, Gahl MK, et al. (2017) Behavioral
188 flexibility as a mechanism for coping with climate change. *Front Ecol Environ*. 15(6), 299-308.
- 189 Boullis A, Frassotte B, Sarles L, Lognay G, Heuskin S, Vanderplanck M, et al. (2017) Elevated
190 carbon dioxide concentration reduces alarm signaling in aphids. *J Chem Ecol*. 43, 164-171.
- 191 Briffa M, de la Haye K, Munday PL (2012) High CO₂ and marine animal behaviour: potential
192 mechanisms and ecological consequences. *Mar Pollut Bull*. 64, 1519-1528.
- 193 Briceño FA, Fitzgibbon QP, Polymeropoulos ET, Hinojosa IA, Pecl GT (2020) Temperature
194 alters the physiological response of spiny lobsters under predation risk. *Conserv Physiol*. 8,
195 2020.
- 196 Bytheway JP, Carthey AJR, Banks PB (2013) Risk vs. reward: how predators and prey respond
197 to aging olfactory cues. *Behav Ecol Sociobiol*. 67, 715-735.
- 198 Carr WES, Netherton III, Gleeson RA, Derby CD (1996) Stimulants of feeding behavior in fish:
199 analyses of tissues of diverse marine organisms. *Biol Bull*. 190, 149-160.
- 200 Chen I, Hill JK, Ohlemuller R, Roy DB, Thomas CD (2011) Rapid range shifts of species of
201 climate warming. *Science*. 333, 1024-1026.
- 202 Chivers DP, McCormick MI, Nilsson GE, Munday PL, Watson SA, Meekan MG, et al. (2014)
203 Impaired learning of predators and lower prey survival under elevated CO₂: a consequence of
204 neurotransmitter interference. *Glob Change Biol*. 20, 515-522.
- 205 Chivers DP, Dixson DL, White JR, McCormick MI, Ferrari MCO (2013) Degradation of
206 chemical alarm cues and assessment of risk throughout the day. *Ecol Evol*. 3, 3925-3934.
- 207 Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a
208 review and prospectus. *Écoscience*. 5(3), 338-352
- 209 Cronin TW (2005) The role of vision in predator-prey interactions. In: Barbosa P & Castellanos
210 I. *Ecology of predator-prey interactions*. New York, Oxford University Press. Pp. 105-138.

- 211 Diehl S, Eköv P (1995) Effects of piscivore-mediated habitat use on resources, diet and growth
212 of perch. *Ecology*. 76, 1712-1726.
- 213 Dixson DL, Munday PL, Jones GP (2010) Ocean acidification disrupts the innate ability of fish
214 to detect predator olfactory cues. *Ecol Lett*. 12, 68-75.
- 215 Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009) Ocean acidification the other CO₂ problem.
216 *Annu Rev Mar Sci*. 1, 169-192.
- 217 Draper AM, Weissburg MJ (2019) Impacts of global warming and elevated CO₂ on sensory
218 behavior in predator-prey interactions: a review and synthesis. *Ecol Evol*. 7(71), 1-19.
- 219 Dusenbury D, Freeman WH (1993) Sensory ecology: how organisms acquire and respond to
220 information. In Wiens JA (ed.). *Stimulation and information*. Colorado State University Dept. of
221 Biology. Vol. 8, no 7, Pp. 262-263.
- 222 Endler JA (1986) Defense against predators. In Feder ME & Lauder GV (ed.). *Predator-prey*
223 *relationships: perspectives and approaches from the study of lower vertebrates*. Chicago,
224 University of Chicago. Pp. 109-134.
- 225 Ferner MC, Smee DL, Chang YP (2005) Cannibalistic crabs respond to the scent of injured
226 conspecifics: danger or dinner? *Mar Ecol Prog Ser*. 300, 193-200.
- 227 Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP (2010) Chemical ecology of predator-prey interactions
228 in aquatic ecosystems: a review and prospectus. *Can J Zool*. 88, 698-724.
- 229 Ferrari MCO, Messier F, Chivers DP (2007) Degradation of chemical alarm cues under natural
230 conditions: risk assessment by larval woodfrogs. *Chemoecology*. 17, 263-266
- 231 Froehlich KR, Lord JP (2020) Can ocean acidification interfere with the ability of mud snails
232 (*Tritia obsoleta*) to sense predators? *J Exp Mar Biol Ecol*. 526, 151355.
- 233 Goldenberg SU, Nagelkerken L, Marangon E, Bonnet A, Ferreira CM, Connell SD (2018)
234 Ecological complexity buffers the impacts of future climate on marine consumers. *Nat Clim*
235 *Change*. 8, 229-233.
- 236 Hailman JP (1977) *Optical signals: animal communication and light*. Oxford, England, Indiana
237 University Press, pp. 362.
- 238 Hara TJ (1994) The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Rev Fish*
239 *Biol Fisher*. 4, 1-35.
- 240 Hay ME (2009) Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine
241 populations, communities, and ecosystems. *Ann Rev Mar Sci*. 1, 193-212.
- 242 Hickling R, Roy DB, Hill JK, Fox R, Thomas CD (2006) The distributions of a wide range of
243 taxonomic groups are expanding polewards. *Glob Chang Biol*. 12, 450-455.
- 244 IPCC (2021) "Climate change 2021: The physical science basis in contribution of working
245 group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. eds
246 Masson-Delmotte V, Zhai A, Pirani SL Connors C, Péan S, Berger N, Caud Y, Chen L,

- 247 Goldfarb MI, Gomis M, Huang K, Leitzell E, Lonnoy JBR, Matthews TK, Maycock T,
248 Waterfield O, Yelekçi R, Yu R, Zhou B (2021) Cambridge University Press.
- 249 Kidawa A, Potocka M, Janecki T (2010) The effects of temperature on the behaviour of the
250 Antarctic sea star *Odontaster validus*. Pol Polar Res. 31, 273-284.
- 251 Kowalewska AA, Krebs N, Tollrian R, Weiss LC (2020) Elevated pCO₂ affects behavioural
252 patterns and mechano-sensation in predatory phantom midge larvae *Chaoborus obscuripes*. Sci
253 Rep. 10, 1800.
- 254 Lecchini D, Dixson DL, Lecellier G, Roux N, Frédérick B, Besson M et al. (2017) Habitat
255 selection by marine larvae in changing chemical environments. Mar Pollut Bull. 114, 210-217.
- 256 Leduc AOHC, Roh E, Macnaughton CJ, Benz F, Rosenfeld J, Brown GE (2010) Ambient pH
257 and the response to chemical alarm cues in juvenile Atlantic salmon: mechanisms of reduced
258 behavioral responses. Trans Am Fish Soc. 139, 117-128.
- 259 Leonard GH, Levine JM, Schmidt PR, Bertness MD (1998) Flow-driven variation in intertidal
260 community structure in a Maine estuary. Ecol. 79, 1385-1411.
- 261 Marinquez P, Elisa Jara M, Mardones M, Torres R, Navarro J, Lardies M, et al. (2014) Ocean
262 acidification affects predator avoidance behaviour but not prey detection in the early ontogeny
263 of a keystone species. Mar Ecol Prog Ser. 502, 157-167.
- 264 Mirza RS, Chivers DP (2001) Chemical alarm signals enhance survival of brook charr
265 (*Salvelinus alpinus*) during encounters with predatory chain pickerel (*Esox niger*). Ethol. 107,
266 989-1005.
- 267 Munday PL, Pratchett MS, Dixson DL, Donelson JM, Endo GGK, Reynolds AD, et al. (2013)
268 Elevated CO₂ affects the behavior of an ecologically and economically important coral reef fish.
269 Mar Biol. 160, 2137-2144.
- 270 Munday PL, Dixson DL, McCormick MI, Meekan M, Ferrari MCO, Chivers DP (2010)
271 Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. Proc Natl Acad Sci
272 USA. 107, 12930-12934.
- 273 Neurath H, Greenstein JP, Putnam FW, Erickson JO (1944) The chemistry of protein
274 denaturation. Chem Rev. 34(2), 157-265.
- 275 Ou M, Hamilton TJ, Eom J, Lyall EM, Gallup J, Jiang A, et al. (2015) Responses of pink
276 salmon to CO₂ induced aquatic acidification. Nat Clim Change. 5, 950.
- 277 Paganini AW, Miller NA, Stillman JH (2014) Temperature and acidification variability reduce
278 physiological performance in the intertidal zone porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*. J Exp
279 Biol. 217, 3974-3980.
- 280 Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across
281 natural systems. Nature. 421, 37-42.
- 282 Pelegrine DHG, Gasparetto CA (2005) Whey proteins solubility as function of temperature and
283 pH. LWT – Food Sci Technol. 38, 77-80.

- 284 Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD (2005) Climate change and distribution shifts in
285 marine fishs. *Science*. 308, 1912-1915.
- 286 Persson L, Eköv P (1995) Prey refuges affecting interactions between piscivorous perch and
287 juvenile perch and roach. *Ecol*. 76, 70-81.
- 288 Pfeiffer W (1977) The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*.
289 4, 653-665.
- 290 Pistevos JC, Nagelkerken I, Rossi T, Olmos M, Connell SD (2015) Ocean acidification and
291 global warming impair shark hunting behaviour and growth. *Sci Rep*. 5, 16293.
- 292 Porteus CS, Hubbard PC, Webster TMU, Aerle R, Canário AVM, Santos EM, et al. (2018)
293 Near-future CO2 levels impair the olfactory system of a marine fish. *Nat Climate Change*. 8,
294 737-743.
- 295 Poulin RX, Lavoie S, Siegel K, Gaul DA, Weissburg MJ, Kubanek J (2018) Chemical encoding
296 of risk perception and predator detection among estuarine invertebrates. *Proc Natl Acad Sci*
297 *USA*. 115, 662-667.
- 298 Pruettt JL, Weissburg MJ (2018) Hydrodynamics affect predator controls through physical and
299 sensory stressors. *Oecologia*. 186, 1079-1089.
- 300 Rittschof D (1990) Peptide-mediated behaviors in marine organisms evidence for a common
301 theme. *J Chem Ecol*. 16, 261-272.
- 302 Ripple WJ, Larsen EJ, Renkin RA, Smith DW (2001) Trophic cascades among wolves, elk and
303 aspen on Yellowstone National Park's northern range. *Biol Conserv*. 102, 227-234.
- 304 Roggatz CC, Lorch M, Hardege JD, Benoit DM (2016) Ocean acidification affects marine
305 chemical communication by changing structure and function of peptide signaling molecules.
306 *Glob Change Biol*. 22, 3914-3926.
- 307 Sanches FHC, Miyai CA, Pinho-Neto CF, Barreto RE (2015) Stress responses to chemical alarm
308 cues in Nile tilapia. *Physiol Behav*. 149, 8-13.
- 309 Schmitz OJ (2008) Effects of predator hunting mode on grassland ecosystem function. *Sci*. 319,
310 952-954.
- 311 Shears NT, Babcock RC, Salomon AK (2008) Context-dependent effects of fishing: variation in
312 trophic cascades across environmental gradients. *Ecol Appl*. 18, 1860-1873.
- 313 Smee DL, Ferner MC, Weissburg MJ (2010) Hydrodynamic sensory stressors produce
314 nonlinear predation patterns. *Ecol*. 91, 1391-1400.
- 315 Smith ME (2000) Alarm response of *Arius felis* to chemical stimuli from injured conspecifics. *J*.
316 *Chem. Ecol*. 26, 1635-1647.
- 317 Supekar SC, Gramapurohit NP (2020) Do antipredator responses of *Euphlyctis cyanophlyctis*
318 tadpoles depend on the intensity of predator risk? *Aquat Ecol*. 54, 823-837.

319 Tanford C (1968) Protein denaturation. Adv. Protein Chem. 23, 121-282.

320 Weissburg M, Smee DL, Ferner MC (2014) The sensory ecology of nonconsumptive predator
321 effects. Am Nat. 184, 141-157.

322 Weissburg MJ, Zimmerfaust RK (1994) Odor plumes and how blue crabs use them in finding
323 prey. J Exp Biol. 197, 349-375.

324 Werner EE, Anholt BR (1996) Predator-induced behavioral indirect effects: consequences to
325 competitive interactions in anuran larvae. Ecol. 77, 157-169.

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

328 Wu F, Wang T, Cui S, Xie Z, Dupont S, Zeng J, et al. (2017) Effects of seawater pH and
329 temperature on foraging behavior of the Japanese stone crab *Charubdis japonica*. Mar Pollut
330 Bull. 120, 99-108.

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
359 Campus de Botucatu
360 INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
361 Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia

362

363

364

365

366

367

368 **Capítulo I:** Análise descritiva da composição química da substância de alarme em *zebrafish*

369

370

371 Arvigo AL^{1,2}, Kamikawachi RC¹, Miyai CA¹, Costa TM^{1,2}

372

373

374

375

376

377 ¹*Postgraduate Program in Biological Sciences (Zoology), Botucatu Biosciences Institute, São Paulo State*
378 *University (UNESP), 18618-000, Botucatu, SP, Brazil*

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

381

382

383

384

385 **Resumo**

386 A percepção precoce de um predador é fundamental para a sobrevivência das presas no
387 ambiente aquático, onde a comunicação química desempenha um papel primordial nesse
388 processo. A substância de alarme, um dos principais sinalizadores de risco de predação,
389 permanece mais conhecida por seus efeitos no comportamento dos animais do que por sua
390 composição química. Vários estudos sugerem que essa substância seja um complexo de
391 moléculas, incluindo a hipoxantina, que foi sintetizada e testada, desencadeando respostas de
392 alarme em várias espécies de peixes. Neste estudo, buscamos descrever quimicamente a
393 substância de alarme e também compreender as moléculas responsáveis por sua sinalização.
394 Este aprofundamento no conhecimento é crucial para entender não só a interação presa-
395 predador, mas também as características específicas das respostas antipredatórias. Por meio de
396 cromatografia líquida e espectrometria de massas, identificamos que as moléculas
397 potencialmente responsáveis por desencadear as respostas de alarme estão presentes na porção
398 polar da pista química, composta por substâncias nitrogenadas, como esfingolipídeos,
399 aminoácidos e derivados de purina. Nossos resultados foram corroborados por estudos
400 bioguiados, que demonstraram que a fração polar ainda mantinha as respostas de alarme,
401 evidenciadas pelo aumento na frequência de *dashes*, prolongamento do tempo de latência
402 alimentar e redução na taxa de ingestão. Assim apresentamos um refinamento significativo dos
403 grupos moleculares potencialmente envolvidos na sinalização de alarme, derivados de uma pista
404 natural e não sintetizada. Estudos futuros são necessários para isolar as moléculas e testá-las
405 individualmente, para se compreender qual(s) molécula(s) carregam a informação da sinalização
406 de alarme. Embora tenhamos delineado um caminho metodológico eficaz, é importante salientar
407 os desafios futuros, especialmente devido à natureza hidrossolúvel da pista que deve representar
408 obstáculos significativos durante os processos de isolamento das moléculas.

409

410

411

412

413

414

415 **Palavras chave** - Compostos nitrogenados, purinas, hipoxantina, respostas de alarme, respostas
416 defensivas.

417 1. Introdução

418 A comunicação química é muito importante para a dinâmica das interações ecológicas
419 em todos os ambientes, sendo particularmente relevante nos ambientes aquáticos. O potencial
420 das pistas químicas de se dissolverem facilmente e a eficácia na dispersão são bem
421 documentados (Hara, 1994), com capacidade para persistir por grandes distâncias e longos
422 períodos (Weissburg et al., 2014). Este mecanismo torna-se ainda mais crucial em condições de
423 visibilidade reduzida devido à turbidez ou baixa luminosidade, sendo essencial para organismos
424 com visão pouco desenvolvida (Wisenden, 2000). A sinalização química transmite uma ampla
425 gama de informações, desencadeando respostas defensivas em várias espécies de peixes quando
426 expostas a sinais que indicam risco de predação (Chivers & Smith, 1998). Tais sinais podem
427 originar-se diretamente do predador, de coespecíficos ou até mesmo de espécies simpátricas
428 (Chivers & Smith, 1998; Mathis & Smith, 1993).

429 Sabe-se que proteínas e aminoácidos são os compostos mais comumente encontrados
430 nas interações presa-predador, pois são liberados como metabólitos solúveis em água e que
431 rapidamente se espalham e degradam (Carr et al., 1996; Rittschof, 1990). Hay (2009) mostrou
432 que tanto proteínas quanto aminoácidos estão relacionados à atividade do predador em busca da
433 presa, enquanto Poulin et al. (2018) demonstraram que elas também fazem parte da composição
434 da sinalização de risco captada pela presa e liberada pelo predador (*i.e.*, odor do predador).
435 Entretanto, se conhece mais dos efeitos das pistas do que propriamente da composição delas, e
436 algumas das mais relevantes pistas químicas usadas nas respostas antipredatórias são ainda
437 desconhecidas do ponto de vista molecular (Ferrari et al., 2010; Chivers & Smith, 1998). Por
438 exemplo, a pista química de alarme (*i.e.*, substância de alarme), a qual é liberada por presas
439 coespecíficas, supostamente disponibilizada através de lesões cutâneas causadas por um
440 predador (Sanches et al., 2015; Barreto et al., 2010; Ferrari et al., 2010; Wisenden, 2000;
441 Chivers & Smith, 1998; Pfeiffer, 1997 e 1977). Resposta de alarme é o nome dado as respostas
442 defensivas induzidas pela substância de alarme e inclui mudanças comportamentais como a
443 diminuição da atividade de forrageamento (Arvigo et al., 2019; Sanches et al., 2015; Foam et
444 al., 2005), diminuição da atividade de natação (Barreto et al., 2014; Barbosa Júnior et al., 2010),
445 aumento do nado desordenado (*dashes*) (Giaquinto et al., 2001), entre outros (Barreto et al.,
446 2014; Brown & Brennan, 2000).

447 Desde muitas décadas se discute a origem da pista química de alarme. Hüttel (1941)
448 sugeriu que essa pista fosse composta por hipoxantina, algo reiterado por Pfeiffer et al. (1985)
449 que sintetizaram 3(N)-óxido de hipoxantina (H3NO) e identificaram respostas de alarme em
450 animais expostos a essa substância. Ainda debatendo o assunto, Doving & Lastein (2009)
451 indicaram que a substância de alarme seria um complexo de moléculas, enquanto Ferrari et al.

452 (2010) sugeriram em sua revisão que a pista se trata de um metabólito secundário considerando
453 o tempo de degradação e as diferentes respostas entre co/heteroespecíficos. A identificação da
454 pista química de alarme apresenta desafios significativos devido à sua natureza e à escassez de
455 informações disponíveis. Além disso, há um desafio técnico a ser considerado: Berlinck et al.
456 (2022) destacaram que a extração e o isolamento de metabólitos hidrossolúveis têm recebido
457 pouca atenção nas últimas décadas. Essa falta de interesse pode ser atribuída a demandas do
458 mercado, bem como à tendência de que muitos metabólitos marinhos não sejam solúveis em
459 água (Berlinck et al., 2022; Blunt et al., 2011). Esta característica dos metabólitos marinhos
460 direcionou a maioria das pesquisas e desenvolvimento de técnicas e métodos para os
461 componentes hidrofóbicos (Berlinck et al., 2022) não apenas devido à sua maior prevalência,
462 mas também pelas facilidades no processo de isolamento. A evaporação dos solventes orgânicos
463 é significativamente mais rápida e não requer equipamentos específicos com sistema a vácuo, o
464 que torna o processo mais ágil e menos custoso (Berlinck et al., 2022).

465 Tendo em vista o arcabouço teórico apresentado, buscamos descrever a substância de
466 alarme a partir da avaliação química dos componentes responsáveis pela sinalização de risco
467 oriundos desta pista. É de extrema relevância aprimorar o conhecimento teórico nesta temática,
468 pois possibilitaria uma melhor compreensão da interação presa-predador e as características
469 específicas das respostas antipredatórias. Para isso, foram utilizados *zebrafish* (*Danio rerio*)
470 como modelo para a extração da pista química. A escolha deste modelo se justifica pelo fato de
471 ser um animal que apresenta a pista de alarme e tem seus efeitos no comportamento
472 antipredatório já descritos na literatura (Canzian et al., 2017; Maximino et al., 2014; Mourabit et
473 al., 2010; Parra et al., 2009; Speedie & Gerlai, 2008). Existe também um grande crescimento no
474 número de estudos utilizando este modelo em experimentos de comunicação química e
475 comportamento antipredatório, por ser um animal de fácil manejo laboratorial e um ótimo
476 modelo para estudos de neurociência em vertebrados (Canzian et al., 2017; Maximino et al.,
477 2014; Gerlai, 2010). Além disso, o *zebrafish* é produzido em larga escala em pisciculturas
478 brasileiras e, dessa forma, evitamos uma pressão de coleta demasiada sobre populações
479 selvagens de outras espécies de peixe.

480 **2. Materiais e método**

481 **2.1. Animais e condições de estoque**

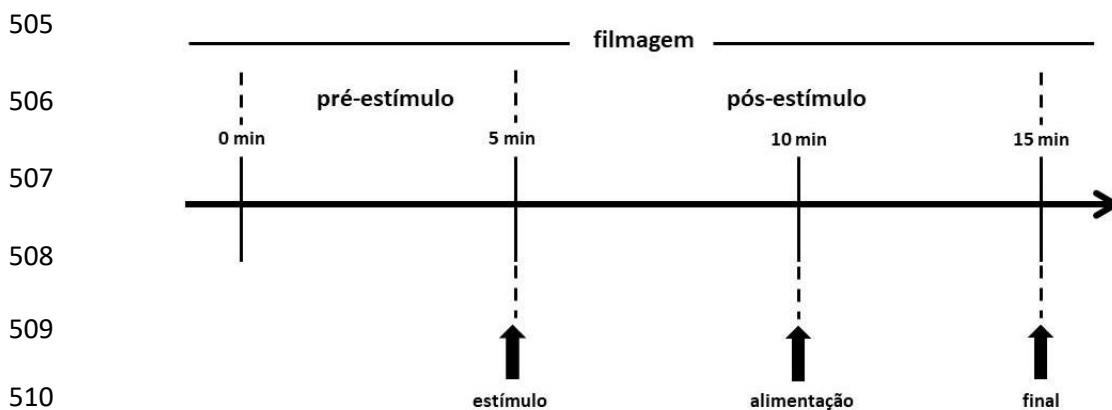
482 Os *zebrafish* foram obtidos em pisciculturas locais, com a população de estoque
483 mantida em caixas d'água de 150 litros e aclimatada por, no mínimo, 15 dias antes da coleta do
484 estímulo. A água foi mantida em ~26°C e saturada de oxigênio por meio de um sistema de
485 aeração constante. Níveis de amônia (<0,5 ppm) e nitrito (<0,5) foram mantidos em baixas
486 quantidades através de filtragem biológica e constantes trocas parciais de água. Foi também

487 controlado o fotoperíodo, com 12 horas claro/12 horas escuro e a alimentação feita com ração
488 comercial para peixes (32% proteína), oferecida duas vezes ao dia até a saciedade.

489 2.2. Delineamento experimental

490 O objetivo deste estudo foi descrever quimicamente a substância de alarme. Para
491 alcançá-lo, conduzimos estudos bioguiados, nos quais avaliamos o comportamento defensivo do
492 *zebrafish* como ensaio biológico para identificar as frações da substância de alarme que contêm
493 a informação responsável pelo sinal de risco. Inicialmente, concentramos nossa atenção nas
494 frações polares para confirmar a característica hidrossolúvel da substância. Para isso,
495 observamos o comportamento do animal quando exposto a substância de alarme completa
496 (SAC) e, em seguida, à pista fracionada (SAF) contendo apenas a porção polar. Portanto, foram
497 elaborados 3 tratamentos: Substância de Alarme Completa – SAC (n = 7), a pista sem
498 alterações; Substância de Alarme Fracionada – SAF (n = 10), sendo utilizada apenas a porção
499 polar da pista; Água destilada como controle – C (n = 10).

500 O estudo bioguiado foi delineado baseado em metodologia utilizada em estudos de
501 comportamento antipredatório mediante a presença da pista química de alarme (Arvigo et al.,
502 2019; Sanches et al., 2015; Barreto et al., 2010). Os animais foram filmados em períodos de 15
503 min (figura 1), sendo divididos da seguinte maneira: Período pré-estímulo (5 minutos); Período
504 pós-estímulo (5 minutos); Período de alimentação (5 minutos).



511 **Figura 1:** Avaliação da resposta antipredatória do *zebrafish* (*Danio rerio*). Períodos da experimentação: Pré-estímulo
512 ou período basal, ainda sem a presença da pista química (0-5 min); estímulo, momento da entrada da pista química (5
513 min); pós-estímulo, período subsequente à entrada da pista química: primeiro momento – observação do
514 comportamento pós-estímulo para comparação com o comportamento do período pré-estímulo (5-10 min); segundo
515 momento – alimentação para a observação do comportamento alimentar dos animais pós-exposição ao estímulo (10-
516 15 min).

517

518 Após a análise bioguiada e a identificação da fração da substância de alarme (polar ou
519 apolar) que continha o principal componente ativo responsável por desencadear a resposta de

520 alarme no *zebrafish*, avançamos para a descrição dos compostos presentes na porção
521 identificada anteriormente. Nesta etapa, nosso objetivo foi compreender as moléculas
522 provavelmente responsáveis por esse sinal de alerta.

523 **2.3. Procedimentos**

524 **2.3.1. Procedimentos específicos**

525 **a. Preparação da pista química de alarme**

526 Os extratos de pele foram obtidos de indivíduos doadores de *zebrafish*. Os indivíduos
527 foram sacrificados através de queda gradual de temperatura, sem uso de anestésicos para evitar
528 interferência na pista química. A pele foi retirada dos dois lados do corpo com pinças e bisturi,
529 evitando ao máximo a extração de musculatura agregada e a contaminação por sangue. A pele
530 retirada foi imediatamente colocada em um béquer com água deionizada e, na sequência,
531 homogeneizada com um homogeneizador. A solução foi filtrada com lã de vidro e algodão
532 passando por um funil para retirada de fragmentos remanescentes. O volume final foi ajustado
533 com água deionizada, fazendo com que a concentração final seguisse a proporção de 2,602mm²
534 de pele por ml, assim como descrito por Barreto et al. (2010). Os extratos foram armazenados
535 em béqueres (600 ml) e congelados (aproximadamente -20°C), até o início do experimento. A
536 pista química direcionada para o fracionamento foi coletada da mesma maneira. Esta
537 metodologia de coleta dos extratos foi baseada em Sanches et al. (2015) e Barreto et al. (2014,
538 2010).

539 **b. Preparação dos extratos**

540 O extrato bruto de pele de *zebrafish* foi particionado em funil de separação na proporção
541 H₂O/Hexano 7:3 por três vezes. A parte orgânica foi coletada e secada para cálculo de
542 rendimento. Esse procedimento foi repetido, subsequentemente, com os solventes:
543 diclorometano e acetato de etila. Ao final a fase aquosa foi congelada e liofilizada. Todas as
544 frações foram pesadas, entretanto, as fases orgânicas obtiveram rendimentos insignificantes
545 (<1mg). Apenas a fase aquosa foi utilizada nas etapas posteriores.

546

547 **2.3.2. Identificação das substâncias presentes nas frações bioativas**

548 **a. Cromatografia líquida e espectrometria de massas**

549 Após o processo de coleta da pista, a solução foi congelada e liofilizada novamente. O
550 pó resultante foi solubilizado em metanol (MeOH) e submetido a *clean-up* em cartucho Sep-Pak
551 C18 500 mg, tamanho de partícula 45µm e diâmetro do poro 60 Å. O cartucho foi previamente
552 ativado com 450 µL de H₂O e 450µL de MeOH, em seguida a amostra foi injetada e eluída com
553 1 mL de MeOH para obtenção da solução estoque. Uma alíquota (0.5 mg/mL) da solução
554 estoque foi injetada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro

555 de massas (HPLC-MS) com fonte de ionização *electro spray* e analisador de Ion Trap (HPLC-
556 ESI-IT-MSⁿ) utilizando a ferramenta *ion-tree* em modo positivo presente no próprio
557 espectrômetro de massas, sob as seguintes condições: coluna Phenomenex[®] Luna C18 (250 x
558 4.6mm 5 µm) e gradiente: 0-60 min (5-100% ACN) sob fluxo de 0,350 mL/min e temperatura
559 do capilar 350 °C. Os solventes utilizados foram água ultrapura acidificada (0,1% ácido
560 fórmico) e ACN grau MS acidificada (0.1% ácido fórmico). Os gases utilizados foram
561 nitrogênio (fluxo de 50 unidades arbitrárias) e hélio (fluxo de 10 unidades arbitrárias).

562 O processamento dos dados (deconvolução e alinhamento dos picos) foi feito no
563 mzMine 3.33. A detecção de massa foi feita no modo centróide, considerando o ruído de todos
564 os íons com intensidade abaixo de 10.000 no nível MS1 e abaixo de 1.000 no nível MS2. A
565 deconvolução foi realizada usando o corte da linha de base com uma faixa m/z de 0,5 Da e uma
566 faixa de tempo de retenção de 0,5 min. Possíveis isótopos foram agrupados conforme tolerância
567 m/z de 0,5 e tempo de retenção de 0,5 min, com carga máxima de 2. O alinhamento de
568 características entre as duas amostras analisadas utilizou tolerância m/z de 0,5, com um peso de
569 25% para m/z e 75% para retenção e uma tolerância de 0,5 min. Os resultados obtidos com
570 mzMine 3.33 foram submetidos a etapas de desreplicação usando Feature Based Molecular
571 Networking (FBMS) no banco de dados Global Natural Product Social Molecular Network
572 (GNPS) (<http://gnps.uscd.edu>). Os dados foram agrupados de acordo com seu MS2,
573 considerando uma massa parental de tolerância e um fragmento de MS2 de tolerância para criar
574 um espectro de consenso. As buscas na biblioteca e na rede molecular foram conduzidas e
575 construídas usando uma pontuação de cosseno acima de 0,70 para ser considerada a partir de um
576 espectro de fragmentação de massa semelhante. Isso foi realizado para observar a rede de
577 moléculas presentes no extrato com estruturas semelhantes que podem compor o conjunto de
578 moléculas de alarme.

579 O método de extração e análise dos bioativos foi baseado e adaptado a partir do trabalho
580 de Stewart et al. (2013).

581 **2.4. Procedimentos experimentais**

582 **2.4.1. Estudo bioguiado**

583 **a. Condições dos aquários**

584 Os animais foram individualizados em aquários de 7 litros (25,7 cm x 15 cm x 13 cm)
585 separados por placas opacas para evitar qualquer tipo de contato visual. A água foi mantida em
586 uma temperatura controlada de 26°C e com aeração constante até o momento da filmagem.
587 Níveis de amônia (<0,5 ppm) e nitrito (<0,5) foram mantidos em baixas quantidades através de
588 trocas parciais periódicas de água. Foi controlado também o fotoperíodo, com 12 horas claro/12
589 horas escuro.

590 **b. Variáveis resposta**

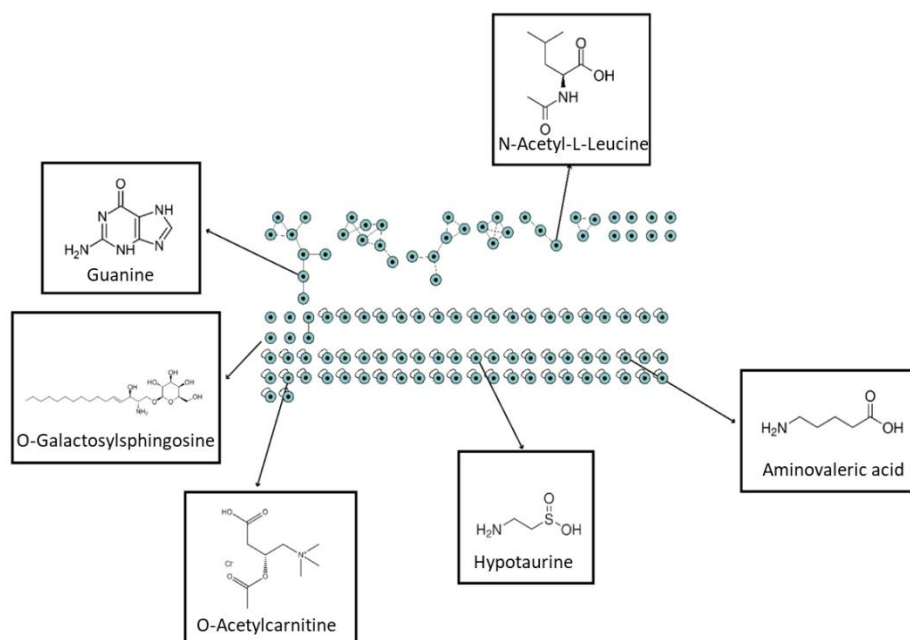
591 A análise das variáveis comportamentais aconteceu através dos vídeos obtidos durante a
592 experimentação. A atividade natatória (variável de movimentação) foi considerada através do
593 nado aleatório e desordenado, *dashes* (Giaquinto & Volpato, 2001). Para a avaliação desta
594 variável resposta foi comparado o padrão de respostas pré-estímulo e pós-estímulo como forma
595 de controle do indivíduo, além da comparação entre controle e tratamentos. Variáveis de
596 alimentação também foram avaliadas, considerando o tempo do animal sem se alimentar, ou a
597 diminuição do comportamento alimentar, uma vez que a inibição da atividade de forrageamento
598 indica uma alteração na forma de responder a estímulos ambientais (Foam et al., 2005). Desta
599 forma foi contabilizado o tempo que o animal demorou em iniciar a alimentação (latência
600 alimentar) e a quantidade de alimento ingerido (Barreto et al., 2013; Freitas & Volpato, 2008;
601 Ide et al., 2003; Barreto et al., 2003; Giaquinto & Volpato, 2001; Chivers & Smith, 1998;
602 Alvarenga & Volpato, 1995), medido de duas maneiras: 1. A ingestão bruta – levando em conta
603 a quantidade de pellets ingeridos no período de alimentação; 2. A porcentagem ingerida –
604 considerando o peso da ração consumida em relação ao peso do animal. Para as variáveis de
605 alimentação avaliamos apenas a comparação entre o controle e os tratamentos, uma vez que a
606 alimentação era sempre a terceira etapa do experimento e, portanto, posterior ao estímulo
607 químico.

608 **c. Análise estatística**

609 Utilizamos a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (a posteriori)
610 para avaliar o efeito da pista química de alarme fracionada e determinar se as respostas de
611 alarme persistiam. As análises foram desenvolvidas no ambiente R (R Core Team, 2021),
612 utilizando o pacote “Companion to Applied Regression” (CAR) (Fox & Weisberg, 2019). Os
613 dados foram avaliados segundo a normalidade e a homocedasticidade, utilizando-se os testes de
614 Shapiro-Wilks e de Levene, respectivamente. Sendo consideradas diferenças significativas, em
615 todos os casos, quando $p < 0,05$.

616 **3. Resultados**

617 Através da análise descritiva da substância de alarme encontramos que a pista química é
618 composta por substâncias nitrogenadas como esfingolipídeos, aminoácidos e derivados de
619 purina (figura 2).



621 **Figura 2** - Rede molecular dos metabólitos encontrados no extrato de pele do *zebrafish* (*Danio rerio*). A rede foi
 622 construída através da plataforma de banco de dados GNPS.

623

624 Para todas as variáveis analisadas observamos que os tratamentos substância de alarme
 625 completa (SAC) e substância de alarme fracionada (SAF) apresentaram respostas semelhantes,
 626 sempre diferindo do controle (C). A atividade natatória, representada pelo nado aleatório e
 627 desordenado (*dash*) apresentou diferença significativa entre os tratamentos (one-way ANOVA;
 628 $F_{(2;24)} = 7,019$; $p < 0,001$), o grupo controle (C) (SAC – C: $p = 0,0052$; SAF – C: $p = 0,0256$)
 629 exibiu um menor número de *dashes* do que os tratamentos de substância de alarme completa
 630 (SAC) e substância de alarme fracionada (SAF) (SAC – SAF: $p = 0,6195$) que não diferiram
 631 entre si (figura 3).

632

633

634

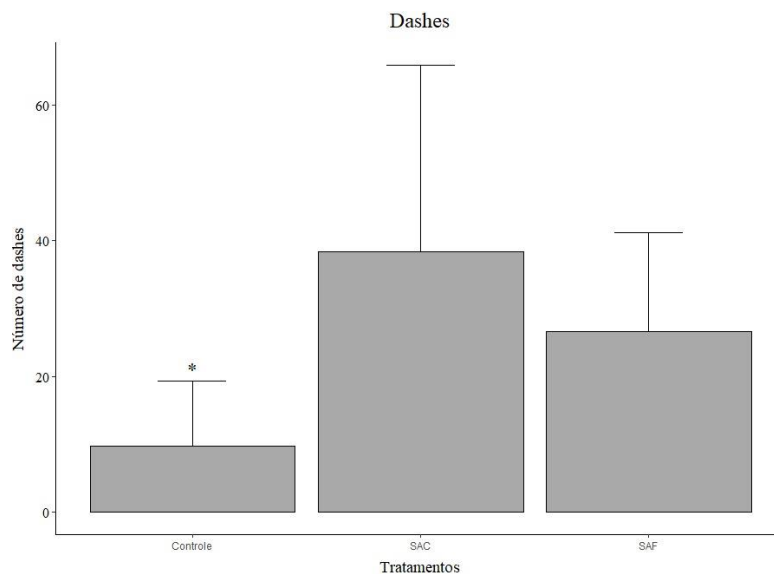
635

636

637

638

639
640
641
642
643
644
645
646
647



648 **Figura 3:** *Dashes* – Média \pm DP do comportamento de *Dashes*. Delta (Δ = período pós estímulo - pré estímulo) do
649 número de vezes que *zebrafish* exposto à pista química de alarme exibiu o comportamento de nado aleatório e
650 desordenado (*dash*). No eixo X estão dispostos os tratamentos sendo o controle com água destilada (C; n = 10), a
651 substância de alarme completa (SAC; n = 7) e substância de alarme fracionada (SAF; n = 10). Linhas pretas e
652 verticais representam o desvio padrão e diferenças estatísticas entre os tratamentos destacadas pelo asterisco (one-
653 way ANOVA; $F_{(2;24)} = 7,019$; $p < 0,001$).

654

655 Para as variáveis de alimentação encontramos diferença significativa para a latência
656 alimentar (one-way ANOVA; $F_{(2;24)} = 13,15$; $p < 0,001$; figura 4A), ingestão bruta ($F_{(2;24)} =$
657 $15,84$; $p < 0,001$; figura 4B) e porcentagem de ingestão ($F_{(2;24)} = 10,9$; $p < 0,001$; figura 4C). Em
658 todas as variáveis o controle (C) diferiu dos outros dois tratamentos, sendo que na latência
659 alimentar os animais demoraram um menor tempo para se alimentar no controle (C) (SAC – C:
660 $p = 0,0121$; SAF – C: $p = 0,0001$; SAC – SAF: $p = 0,3359$), enquanto na ingestão bruta (SAC –
661 C: $p = 0,0002$; SAF – C: $p = 0,0001$; SAC – SAF: $p = 0,9200$) e porcentagem de ingestão os
662 animais do grupo controle (C) apresentaram uma taxa de alimentação maior (SAC – C: $p =$
663 $0,0068$; SAF – C: $p = 0,0005$; SAC – SAF: $p = 0,8073$).

664

665

666

667

668

669

670

Comportamento Alimentar

671

672

673

674

675

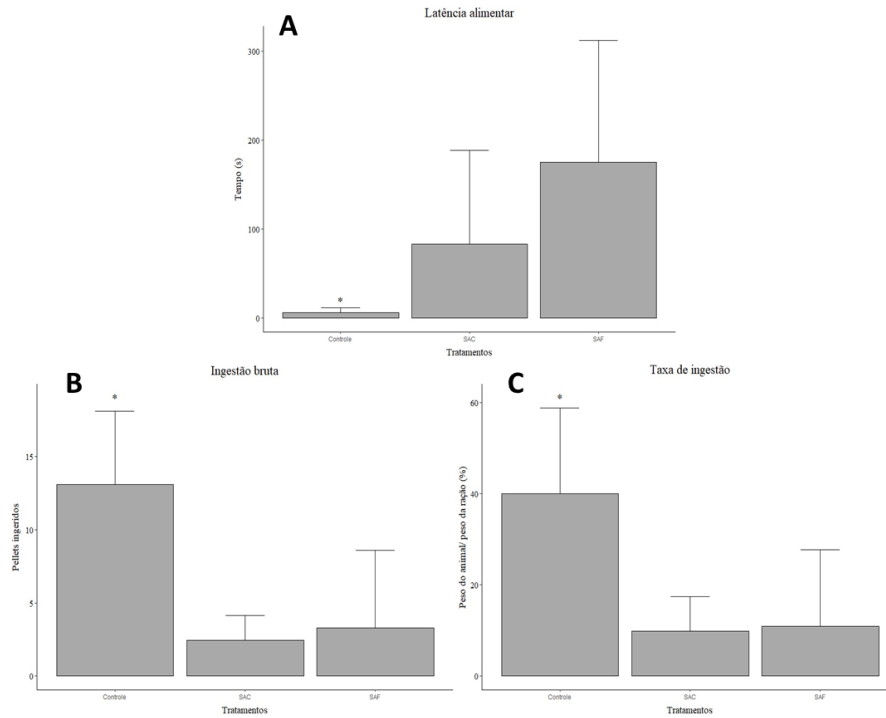
676

677

678

679

680



681

682 **Figura 4:** Comportamento alimentar – Média ± DP do comportamento alimentar. No eixo X estão dispostos os

683 tratamentos sendo o controle com água destilada (C; n = 10), a substância de alarme completa (SAC; n = 7) e

684 substância de alarme fracionada (SAF; n = 10). A - Latência alimentar (one-way ANOVA; $F_{(2,24)} = 13,15$; $p < 0,001$),

685 tempo (s) para o *zebrafish* exposto a pista química de alarme começar a se alimentar durante a etapa de alimentação;

686 B - Ingestão bruta (one-way ANOVA; $F_{(2,24)} = 15,84$; $p < 0,001$), quantidade de pellets ingeridos pelo o *zebrafish*

687 exposto a pista química de alarme durante a etapa de alimentação; B - Porcentagem de ingestão (one-way ANOVA;

688 $F_{(2,24)} = 10,9$; $p < 0,001$), quantidade em porcentagem de ração que o *zebrafish* exposto a pista química de alarme

689 consumiu, considerando o peso do pellet em relação ao peso do animal. Desvio padrão representado pelas linhas

689 pretas e verticais. O asterisco representa a diferença estatística entre os tratamentos.

690

691 4. Discussão

692 Neste estudo identificamos que as moléculas responsáveis por desencadear as respostas

693 de alarme nas presas fazem parte da fração polar da pista química fornecida e, é composta por

694 substâncias nitrogenadas, como esfingolipídeos, aminoácidos e derivados de purina. Através do

695 estudo bioguiado, averiguamos que os animais apresentaram uma resposta defensiva semelhante

696 a pista fracionada (SAF) daquela encontrada na pista de alarme completa (SAC), como o

697 aumento na exibição de *dashes* e no tempo de latência alimentar, além de uma queda na

698 quantidade do alimento ingerido. Essas variáveis resposta indicam que a pista fracionada (SAF)

699 continuou sendo uma importante fonte de informação de risco, fazendo com o que os animais

700 deflagrassem uma resposta de alarme.

701 A análise molecular nos mostra que a pista química de alarme é composta por
702 esfingolipídios, aminoácidos e derivados de purina. Esfingolipídios são moléculas da classe dos
703 lipídeos com uma grande diversidade estrutural. São comumente encontrados nas membranas
704 biológicas de diversos tecidos e de vários organismos (Bartke & Hannun, 2009). Já, os
705 aminoácidos são a unidade básica das proteínas, contendo um grupo amino e um grupo
706 carboxílico (Akram et al., 2011). Além de serem utilizados na formação de proteínas e de
707 desempenharem um papel importante na regulação de inúmeros processos ligados a expressão
708 gênica (Akram et al., 2011), os aminoácidos podem fazer parte da composição química de
709 estimulantes alimentares liberados por presas feridas e carniça (Carr, 1988). Estes estimulantes
710 são metabólitos comuns de baixo peso molecular, como os aminoácidos, nucleosídeos,
711 nucleotídeos e ácidos orgânicos (Bronmark & Hansson, 2000). Essas substâncias acabam se
712 dispersando pelo ambiente devido ao resultado de vazamentos e excreções decorrentes da
713 decomposição e danos nos tecidos (Bronmark & Hansson, 2000), assim como é o caso da pista
714 química de alarme. Portanto, é plausível pensar que a presença de aminoácidos na pista química
715 de alarme seja realmente viável, algo que é corroborado com o conhecimento presente na
716 literatura (Poulin et al., 2018; Hay, 2009; Carr et al., 1996; Rittschof, 1990). Além disso, apesar
717 dos estimulantes alimentares citados serem um sinalizador para predadores em busca de sua
718 presa, essas mesmas pistas são também potenciais sinalizadores de risco para outras presas
719 próximas. Feromônios em geral são uma importante ferramenta para que os organismos se
720 comuniquem e coordenem seus comportamentos, entretanto, também representam uma
721 relevante oportunidade para outros organismos interceptarem e explorarem esses sinais
722 (Verheggen et al., 2010). Existem inúmeros exemplos de predadores naturais que aprenderam
723 ou evoluíram para usar os feromônios de suas presas como um sinal de forrageamento (Vet &
724 Dicke, 1998).

725 O último grupo que compõe a pista química de alarme são os derivados de purina, algo
726 que já era vislumbrado em trabalhos clássicos que os apontavam como os principais
727 responsáveis por essa sinalização, especialmente, purinas com grupo de óxido nítrico (3(N)-
728 óxido de hipoxantina; N-óxido de piridina) (Brown et al., 2000; Pfeiffer et al., 1985; Hüttel,
729 1941). Pfeiffer et al. (1985) apontaram que a 3(N)-óxido de hipoxantina (H3NO), caracterizada
730 por um esqueleto de purina e um grupo funcional de óxido de nitrogênio na posição três, é o
731 componente ativo da pista química de alarme de peixes da superordem Ostariophysi. Alguns
732 anos depois Brown et al. (2000) demonstraram que o grupo funcional óxido de nitrogênio atua
733 como um gatilho molecular e propôs que outras moléculas estruturalmente diversas com um
734 grupo funcional de óxido de nitrogênio também podem atuar como um sinal de alarme. Estudos
735 com peixes como *Pimephales promelas* (Fathead Minnow) e *Chrosomus neogaeus* (Finescale
736 dace) mostraram que animais expostos a H3NO apresentaram respostas antipredatórias em

737 intensidade semelhante a substância de alarme de coespecíficos naturais, além disso,
738 identificaram também respostas significativas ao N-óxido de piridina, porém com menos
739 intensidade (Brown et al., 2000). Testes com *Hemigrammus erythrozonus* (*Glowlight tetra*) e
740 *Paracheirodon innesi* (*Neon tetra*) também trouxeram resultados semelhantes (Brown et al.
741 2001). O próprio *Danio rerio* (*Zebrafish*) já foi estudado e apresentou resposta de alarme para
742 3(N)-óxido de hipoxantina sintético (Parra et al., 2009).

743 Como evidência da possível presença dessas moléculas na resposta de alarme,
744 observamos o comportamento defensivo dos animais expostos a substância de alarme completa
745 (SAC) e fracionada (SAF). Um critério relevante na análise de comportamentos defensivos é a
746 movimentação, em que a fuga é a principal resposta descrita em peixes (Domenici, 2010;
747 Domenici & Kapoor, 2010). Entretanto, em condições laboratoriais de experimentação,
748 raramente é possível avaliar e considerar a fuga, pois as observações são feitas em espaços que
749 não permitem que este comportamento aconteça, mas o nado aleatório e desordenado (*dash*)
750 pode ocorrer e é considerado um comportamento defensivo (Giaquinto & Volpato, 2001). Este
751 comportamento, caracterizado por uma natação veloz e imprevisível, se tornou em condições
752 laboratoriais uma das principais ferramentas de avaliação do comportamento defensivo e uma
753 variável resposta eficaz e recorrente na literatura (Arvigo et al., 2019; Sanches et al., 2015;
754 Giaquinto & Volpato, 2001). Nós observamos uma alta frequência de *dashes* tanto para o
755 tratamento substância de alarme completa (SAC) quanto para a substância de alarme fracionada
756 (SAF) e ambos sendo igualmente superiores em frequência ao tratamento controle (C). Isso nos
757 mostra que a pista fracionada ainda continha informação capaz de deflagrar resposta de alarme.
758 Outro critério abordado e extremamente importante foi a alimentação, que é adaptativa e,
759 portanto, mudar a prioridade para lidar com estímulos ambientais relevantes é considerado
760 defensivo no contexto de pistas sensoriais de risco de predação (Foam et al., 2005). Aqui, a
761 latência para obter comida aumentou em resposta a pista química de alarme, tanto para o
762 tratamento substância de alarme completa (SAC) quanto para o tratamento substância de alarme
763 fracionada (SAF). Este aumento já foi mostrado anteriormente para vários sinais químicos de
764 risco de predação (Arvigo et al., 2019; Sanches et al., 2015; Barreto et al., 2013; Giaquinto &
765 Hoffmann, 2010; Foam et al., 2005). Além da latência, a quantidade de alimento ingerido
766 também foi diferente entre os tratamentos. Os animais exibiram uma menor taxa de alimentação
767 tanto em porcentagem quanto em números absolutos quando expostos a substância de alarme
768 completa (SAC) e substância de alarme fracionada (SAF) do que quando expostos ao controle
769 (C) com água destilada. A modificação no apetite ou no ímpeto de se alimentar também já foi
770 evidenciada em diversos estudos com pistas químicas (Sanches et al., 2015; Foam et al., 2005;
771 Dwyer et al., 2002; Carrieri & Volpato, 1991).

772 Nossas descobertas representam um refinamento dos grupos moleculares
773 potencialmente envolvidos na sinalização de alarme, em concordância com as investigações
774 existentes na literatura até o momento. Conforme sugerido por Pfeiffer et al. (1985), é provável
775 que a pista química de alarme contenha purinas com óxido nítrico como seu principal
776 componente ativo, possivelmente constituindo um complexo de substâncias responsáveis pela
777 completa sinalização de risco, assim como aventado por Doving & Lastein (2009). É essencial
778 ressaltar a necessidade de avançar nessas descobertas para identificar a funcionalidade completa
779 da composição da substância de alarme. No entanto, observamos indícios de que essas
780 moléculas sejam recorrentes em diversos grupos animais. Por exemplo, Xiong et al. (2017)
781 identificaram compostos semelhantes aos encontrados neste estudo em tecidos de pulmão de
782 ratos lesionados, incluindo esfingolipídeos e hipoxantina. Futuras pesquisas devem visar a
783 separação e comparação dos grupos identificados (esfingolipídeos, aminoácidos e derivados de
784 purina) para compreender a composição da substância de alarme. Apesar da necessidade de
785 aprofundamento na descrição química da pista de alarme, os resultados obtidos até o momento
786 indicam um método eficiente e coerente, mas também revelam desafios iminentes. Neste estudo
787 confirmamos que a substância de alarme é um composto hidrossolúvel, contudo, a extração de
788 compostos hidrossolúveis de matrizes biológicas é um processo complexo. Esses compostos
789 apresentam uma variedade de outras substâncias também solúveis em água, como taninos,
790 pigmentos polares, sais, metabólitos primários e constituintes do meio microbiano, que podem
791 interferir na análise e separação dos metabólitos, dificultando a purificação e identificação
792 desses compostos (Berlinck et al., 2022). Em resumo, nossas descobertas representam um
793 avanço significativo no entendimento da composição e funcionamento da substância de alarme.
794 Embora tenhamos identificado indícios promissores para análise desses compostos, é inegável
795 que ainda existirão desafios importantes para uma compreensão completa.

796 **5. Certificado e autorizações**

797 Este trabalho está em conformidade com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal
798 adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal — Brasil (CONCEA)
799 de acordo com as recomendações para pesquisa envolvendo vertebrados e foi aprovado pela
800 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências do Câmpus do
801 Litoral Paulista (Protocolo n° 10/2023-CEUA). Todas as atividades de coleta e manutenção de
802 animais seguiram rigorosamente as diretrizes estabelecidas pelo SISBIO Sistema Brasileiro de
803 Autorização e Informação em Biodiversidade (Protocolo n° 72194-4). Todas as diretrizes
804 internacionais, nacionais e institucionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram
805 seguidas.

806

807 **6. Referências**

- 808 Akram M, Asif HM, Uzair M, Akhtar N, Madni A, Shah SA, et al. (2011) Amino acids: A
809 review article. *J Med Plant Res.* 5(17), 3997-4000.
- 810 Alvarenga CMD, Volpato GL (1995) Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile
811 tilapia. *Physiol Behav.* 57, 75-80.
- 812 Arvigo AL, Miyai CA, Sanches FHC, Barreto RE, Costa TM (2019) Combined effects of
813 predator odor and alarm substance on behavioral and physiological responses of the pearl
814 cichlid. *Physiol Behav.* 206, 259-263.
- 815 Barbosa Júnior A, Magalhães EJ, Hoffmann A, Ide LM (2010) Conspecific and heterospecific
816 alarm substance induces behavioral responses in piau fish *Leporinus piau*, *Acta Ethol.* 13, 119–
817 126.
- 818 Barreto RE, Barbosa-Junior A, Urbinati EC, Hofmann A (2014) Cortisol influences the
819 antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the frillfin goby. *Horm Behav.* 65, 394-
820 400.
- 821 Barreto RE, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL (2013) Blood cues induce
822 antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics. *PLoSone.* 8(1), e54642.
- 823 Barreto RE, Barbosa-Junior A, Giassi ACC, Hoffmann A (2010) The “club” cell and
824 behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in Nile tilapia. *Mar Freshw
825 Behav Physiol.* 43, 75-81.
- 826 Barreto RE, Luchiaro AC, Marcondes AL (2003) Ventilatory frequency indicates visual
827 recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behav Process.* 60, 235-239.
- 828 Bartke N, Hannun Y (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 50,
829 S91-S96.
- 830 Berlinck RGS, Crnkovic CM, Gubiani JR, Bernardi DI, Ióca LP, Quintana-Bulla JI (2022) The
831 isolation of water-soluble natural products – challenges, strategies and perspectives. *Nat Prod
832 Rep.* 39, 596-669.
- 833 Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR (2011) Marine natural products.
834 *Nat Prod Rep.* 28(2), 196-268.
- 835 Brönmark C, Hansson LA (2000) Chemical communication in aquatic systems: an
836 introduction. *Oikos*, 88(1), 103-109.
- 837 Brown GE, Adrian JC, Kaufman IH, Erickson JL, Gershaneck D (2001) Responses to nitrogen-
838 oxides by Characiforme fishes suggest evolutionary conservation in Ostariophysan alarm
839 pheromones. In: Marchlewska-Koj A, Lepri JJ, Muller-Schwarze D. (eds), *Chemical signals in
840 vertebrates 9* Springer US, Boston, pp. 305-312.
- 841 Brown GE, Brennan S (2000) Chemical alarm signals in juvenile green sunfish (*Lepomis
842 cyanellus*, Centrarchidae). *Copeia.* 4, 1079-1082.

- 843 Canzian J, Fontana BD, Quadros VA, Rosemberg DB (2017) Conspecific alarm substance
844 differently alters group behavior of zebrafish: Putative involvement of cholinergic and
845 purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav Brain Res.* 320, 255-263.
- 846 Carr WES, Netherton III, Gleeson RA, Derby CD (1996) Stimulants of feeding behavior in fish:
847 analyses of tissues of diverse marine organisms. *Biol Bull.* 190, 149-160.
- 848 Carr WES (1988) The molecular nature of chemical stimuli in the aquatic environment. - In:
849 Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavalga WN. (eds), *Sensory biology of aquatic animals.*
850 Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-27.
- 851 Carrieri MP, Volpato GL (1991) Does snatching frequency really indicate food ingestion in the
852 Nile tilapia? *Physiol. Behav.* 50, 489–492.
- 853 Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a
854 review and prospectus. *Écoscience.* 5(3), 338-352.
- 855 Domenici, P (2010) Context-dependent variability in the components of fish escape response:
856 integrating locomotor performance and behavior. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 313(2), 59-
857 79.
- 858 Domenici P, Kapoor BG (2010) Escape responses in fish: kinematics, performance and
859 behavior. *Fish locomotion: An eco-ethological perspective*, 123-170.
- 860 Døving KB, Lastein S (2009) The alarm reaction in fishes – odorants, modulations of responses,
861 neural pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 1170:413-423.
- 862 Dwyer KS, Brown JA, Parrish C, Lall SP (2002) Feeding frequency affects food consumption,
863 feeding pattern and growth of juvenile yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). *Aquac.* 213,
864 279–292.
- 865 Ferrari MCO, Wisenden BD, Chivers DP (2010) Chemical ecology of predator-prey interactions
866 in aquatic ecosystems: a review and prospectus. *Can J Zool.* 88, 698-724.
- 867 Foam PE, Mirza RS, Chivers DP, Brown GE (2005) Juvenile convict cichlids (*Archocentrus*
868 *nigrofasciatus*) allocate foraging and antipredator behaviour in response to temporal variation in
869 predation risk. *Behav.* 142, 129-144.
- 870 Fox J, Weisberg S (2019) *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage
871 Thousand Oaks CA. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>.
- 872 Freitas RHA, Volpato GL (2008) Behavioral response of Nile tilapia to an allopatric predator.
873 *Mar Freshw Behav Phy.* 41, 267-272.
- 874 Gerlai R (2010) Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? *Behav*
875 *Brain Res.* 207, 223-231.
- 876 Giaquinto PC, Hoffmann A (2010) Role of olfaction and vision cues in feeding behavior and
877 alarm reaction in the catfish pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. *J Ethol.* 28, 21-27.
- 878 Giaquinto PC, Volpato GL (2001) Hunger suppresses the onset and the freezing component of
879 the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish. *Behav.* 138, 1205-1214.

- 880 Hara TJ (1994) The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. Rev Fish
881 Biol Fisher. 4, 1-35.
- 882 Hay ME (2009) Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine
883 populations, communities, and ecosystems. Ann Rev Mar Sci. 1, 193-212.
- 884 Hüttel R (1941) Die chemische untersuchung des schreckstoffes aus elritzenhaut.
885 Naturwissenschaften. 29, 333-334.
- 886 Ide LM, Urbinati EC, Hoffmann A (2003) The role of olfaction in the behavioural and
887 physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. J Fish Biol. 63, 332-343.
- 888 Mathis A, Smith RJF (1993) Intraspecific and cross-superorder responses to chemical alarm
889 signals by brook stickleback. Ecol. 74, 2395-2404.
- 890 Maximino C, Lima MG, Costa CC, Guedes IML, Herculano AM (2014) Fluoxetine and WAY
891 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by alarm substance in zebrafish
892 (*Danio rerio* Hamilton 1822). Pharmacol Biochem Behav. 124, 425-433.
- 893 Mourabit S, Rundle SD, Spicer JI, Sloman KA (2010) Alarm substance from adult zebrafish
894 alters early embryonic development in offspring. Biol Lett. 6, 525-528.
- 895 Parra KV, Adrian Jr. JC, Gerlai R (2009) The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide
896 elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). Behav Brain Res. 205, 336-341.
- 897 Pfeiffer W, Riegelbauer G, Meier G, Scheibler B (1985) Effect of hypoxanthine-3(N)-oxide and
898 hypoxanthine-1(N)-oxide on central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbus*
899 *ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. J Chem Ecol.
900 11:507-523.
- 901 Pfeiffer W (1977) The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. Copeia.
902 4,653-665.
- 903 Poulin RX, Lavoie S, Siegel K, Gaul DA, Weissburg MJ, Kubanek J (2018) Chemical encoding
904 of risk perception and predator detection among estuarine invertebrates. Proc Natl Acad Sci.
905 USA. 115, 662-667.
- 906 Rittschof D (1990) Peptide-mediated behaviors in marine organisms evidence for a common
907 theme. J Chem Ecol. 16, 261-272.
- 908 Sanches FHC, Miyai CA, Pinho-Neto CF, Barreto RE (2015) Stress responses to chemical alarm
909 cues in Nile tilapia. Physiol Behav. 149, 8-13.
- 910 Speedie N, Gerlai R (2008) Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio*
911 *rerio*). Behav Brain Res. 188, 168-177.
- 912 Stewart M, Baker CF, Sorensen PW (2013) Chemical analysis of aquatic pheromones in fish. –
913 In: Touhara K (ed), Pheromone signaling: methods and protocols. New York: Humana Press,
914 pp. 55-69.

915 Verheggen FJ, Haubruge E, Mescher MC (2010). Alarm pheromones – chemical signaling in
916 response to danger. – In: Liwack G (ed), Vitamins and hormones. Burlington: Academic Press,
917 vol. 83, pp. 215-240.

918 Vet LEM, Dicke M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic
919 context. *Annu Rev Entomol.* 37, 141–172.

920 Weissburg M, Smee DL, Ferner MC (2014) The sensory ecology of nonconsumptive predator
921 effects. *Am Nat.* 184, 141-157.

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

924 Xiong Z, Wang Y, Lang L, Ma S, Zhao L, Xiao W, Wang Y (2018) Tissue metabolomic
925 profiling to reveal the therapeutic mechanism of reduning injection on LPS-induced acute lung
926 injury rats. *RSC Adv.* 8(18), 10023-10031.

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
944 Campus de Botucatu
945 INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
946 Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia

947

948

949

950

951

952 **Capítulo II:** Aquecimento global e acidificação oceânica: Efeitos de estressores climáticos no
953 comportamento do amboré

954

955

956 Arvigo AL^{1,2}, Miyai CA¹, Cirilo L^{1,2}, Costa TM^{1,2}

957

958

959

960

961

962 ¹*Postgraduate Program in Biological Sciences (Zoology), Botucatu Biosciences Institute, São*
963 *Paulo State University (UNESP), 18618-000, Botucatu, SP, Brazil*

964 ²*Biosciences Institute, São Paulo State University – UNESP, Coastal Campus, Praça Infante*
965 *Dom Henrique, s/nº, Parque Bitaru, São Vicente, SP. Brazil. P. O, Box 73601 – Zip Code*
966 *11.380-972*

967

968

969

970

971

972 **Resumo**

973 No ambiente aquático, a comunicação química é a principal forma pela qual as presas detectam
974 o predador e desencadeiam respostas defensivas adequadas. Um dos sinais químicos mais
975 importantes é a substância de alarme, que é liberada por presas feridas. No entanto, o
976 aquecimento global e a acidificação dos oceanos podem ter um impacto significativo nesse
977 mecanismo. Eles podem interferir diretamente, afetando a via de transdução sensorial, e
978 indiretamente, influenciando o metabolismo dos animais e, assim, alterando a forma como
979 percebem o ambiente. O presente estudo teve como objetivo avaliar os impactos de um cenário
980 de mudanças do clima na comunicação química da interação presa-predador, mediada pela pista
981 química de alarme. Para isso, utilizamos o amboré (*Bathygobius soporator*) como modelo
982 experimental e estabelecemos quatro condições experimentais distintas: controle, cenário de
983 aquecimento, cenário de acidificação e cenário de aquecimento combinado com acidificação. Os
984 comportamentos de tempo no abrigo, investidas, ingestão bruta, peso ingerido e taxa de ingestão
985 foram monitorados em resposta à presença da substância de alarme em diferentes condições
986 ambientais. É importante ressaltar a complexidade das interações entre temperatura e pH.
987 Nossos resultados indicam que tanto o aquecimento quanto a acidificação tiveram um impacto
988 significativo no comportamento dos peixes amboré em resposta à substância de alarme.
989 Especificamente, observamos que os peixes expostos às condições de aquecimento e
990 acidificação apresentaram um menor tempo de permanência nos abrigos e um menor número de
991 investidas no alimento, em comparação com os peixes em condições de controle. Nosso
992 trabalho destaca importância de considerar não apenas os efeitos individuais, mas também as
993 interações entre diferentes estressores ambientais ao investigar os impactos das mudanças do
994 clima nas comunidades aquáticas. Em resumo, nosso estudo fornece *insights* significativos
995 sobre como as mudanças do clima podem afetar a comunicação química entre presas e
996 predadores em ambientes aquáticos, enfatizando a vulnerabilidade das presas em cenários
997 futuros.

998

999

1000

1001

1002

1003 **Palavras chave:** Comunicação química; mudanças do clima; comportamento antipredatório;
1004 pista de alarme.

1005 **1. Introdução**

1006 A sobrevivência das espécies muitas vezes depende da capacidade de reconhecer e
1007 reagir adequadamente às ameaças dos predadores em potencial. No ambiente aquático, a
1008 comunicação química desempenha um papel crucial nesse processo, devido à rápida dispersão e
1009 dissolução de seus componentes (Hara, 1994). Diversas espécies de peixes manifestam
1010 respostas defensivas quando expostas a sinais químicos que indicam risco de predação (Chivers
1011 & Smith, 1998).

1012 A percepção de um predador pode ocorrer de duas maneiras distintas: direta e indireta.
1013 No primeiro caso, o animal detecta o odor do predador (Kats & Dill, 1998), enquanto, no
1014 segundo, a presa é alertada da presença do predador por meio de sinais químicos de outras
1015 presas (Chivers & Smith, 1998). Entre os sinais químicos indiretos mais relevantes está a
1016 substância de alarme. Esta substância é liberada quando há lesões na epiderme causadas pela
1017 atividade predatória, alertando outras presas sobre o risco iminente de predação (Wisenden,
1018 2000). A substância de alarme é supostamente produzida e armazenada em células epidérmicas,
1019 denominadas células “club” (Smith, 2000; Pfeiffer, 1977). Sua liberação está condicionada à
1020 lesão na epiderme causada pelo ataque do predador, desencadeando respostas antipredatórias em
1021 outros animais que detectam sua presença no ambiente (Arvigo et al., 2019; Sanches et al.,
1022 2015; Barreto et al., 2010; Wisenden 2000; Chivers & Smith, 1998; Pfeifer, 1977).

1023 O complexo mecanismo da comunicação química está sob grande atenção, com estudos
1024 indicando que será uma das interações mais afetadas pelas mudanças do clima no futuro. De
1025 acordo com Draper & Weissburg (2019), essas mudanças podem impactar os processos de
1026 geração, propagação e recepção de pistas químicas (via de transdução sensorial). A
1027 comunicação é essencialmente a transferência de informações através de um canal entre um
1028 emissor, que transmite as informações, e um receptor, que as recebe e interpreta (Cronin, 2005;
1029 Hailman, 1977). Qualquer prejuízo nessa transferência é relevante, uma vez que desempenha
1030 um papel fundamental na sobrevivência das espécies. A complexidade das interações ecológicas
1031 tem destacada influência do contexto ambiental sobre essas trocas de informações entre emissor
1032 e receptor (Draper & Weissburg, 2019).

1033 As atividades humanas têm contribuído significativamente para as mudanças do clima,
1034 afetando os ecossistemas globais (Kowalewska et al., 2020; Chen et al., 2011; Hickling et al.,
1035 2006; Perry et al., 2005; Parmesan & Yohe, 2003). A intensificação das emissões de dióxido de
1036 carbono (CO₂) tem resultado em aumentos médios de temperatura, previstos para exceder 2°C
1037 até 2100, segundo o IPCC (2021), e essas mudanças têm impactado diretamente a interação
1038 presa-predador. Estudos indicam que o aumento da temperatura pode alterar o equilíbrio
1039 metabólico dos predadores, aumentando sua atividade e demanda por alimento, exercendo

1040 pressão sobre as presas (Goldenberg et al., 2018; Wu et al., 2017; Pistevos et al., 2015). Por
1041 outro lado, o aquecimento pode reduzir a atividade das presas e suprimir suas respostas
1042 defensivas (Briceño et al., 2020; Paganini et al., 2014; Kidawa et al., 2010). Além da
1043 temperatura, a composição química da água também está sob influência das mudanças do clima.
1044 O aumento do CO₂ dissolvido na água causa um fenômeno conhecido como acidificação
1045 (Doney et al., 2009). Este fenômeno prevê reduzir o pH da água em 0.3-0.4 unidades até 2100
1046 (IPCC, 2021) e pode afetar todas as etapas da comunicação química (Draper & Weissburg,
1047 2019; Briffa et al., 2012). Boullis et al. (2017) demonstraram que, em condições de CO₂
1048 aumentado, pulgões produzem menos feromônio de alarme e apresentam respostas menos
1049 evidentes. É possível esperar efeitos similares em ambientes aquáticos, uma vez que estudos
1050 apontam que a acidificação pode reduzir a sensibilidade olfativa, interferindo na recepção do
1051 sinal seja por modificações no aparato olfativo (robalo - Porteus et al., 2018), por alterações na
1052 própria pista química (caranguejo verde - Roggatz et al., 2016) ou ainda por interferir no
1053 processamento sensorial promovido pelo sistema nervoso central (peixe palhaço - Dixson et al.,
1054 2010; peixe palhaço e donzela - Munday et al., 2010).

1055 As mudanças do clima e suas variáveis associadas, como o aquecimento e a
1056 acidificação, podem afetar os processos da transdução sensorial promovida pela comunicação
1057 química na interação presa-predador impactando o emissor e a geração do sinal, a propagação e
1058 duração desse sinal no ambiente, além do receptor e a sua capacidade de captar e interpretar
1059 essa sinalização (Draper & Weissburg, 2019). Portanto, compreender como a relação presa-
1060 predador mediada pela comunicação química se comportará em um contexto de mudanças do
1061 clima, é de extrema importância para entendermos possíveis alterações na dinâmica de
1062 comunidades e ecossistemas, uma vez que é clara a existência de um efeito cascata vinda das
1063 interações mais específicas para as mais abrangentes. Além disso, resultados relacionados a esta
1064 temática podem contribuir na elaboração de futuras estratégias de mitigação e conservação.
1065 Assim, neste estudo buscamos entender os efeitos de um cenário de mudanças do clima na
1066 recepção de um sinal de risco de predação (substância de alarme). Como hipótese, aventamos
1067 que tanto o aquecimento quanto a acidificação tem potencial para interferir na capacidade de
1068 recepção, interpretação e reposta de um sinal, afetando desta maneira a eficácia da comunicação
1069 química. Escolhemos para isso o amboré (*Bathygobius soporator*), um predador importante de
1070 costões rochosos e estuários que tem em sua dieta pequenos peixes e crustáceos (Tomida et al.,
1071 2012; Lopes & Oliveira-Silva, 1998), mas que também é caçado por predadores maiores, como
1072 o peixe-gato (Chalom et al., 2008). O amboré é reativo a substância de alarme (Barreto et al.,
1073 2014), apresentando respostas antipredatória, como busca por abrigo e diminuição da atividade
1074 natatória (Pereira et al., 2017).

1075

1076 **2. Materiais e Método**

1077 **2.1. Animais e condições de estoque**

1078 Os amorés foram coletados em costões rochosos da Baixada Santista com uso de
1079 armadilhas para peixes (covos) e mantidos em 4 diferentes condições de estoque por pelo menos
1080 20 dias antes do início dos experimentos. O período de aclimatação foi escolhido para um maior
1081 tempo de influência das condições estressantes. Foram acondicionados em tanques de 70 litros
1082 (70 cm x 30 cm x 35 cm) com água saturada de oxigênio por meio de um sistema de aeração
1083 constante e com a temperatura e pH controles (T: ~27°C e pH: ~8.1) . Níveis de amônia (<0,5
1084 ppm) e nitrito (<0,5) foram mantidos em baixas quantidades através de filtragem biológica e
1085 constantes trocas parciais de água. O fotoperíodo foi controlado, com 12 horas claro/12 horas
1086 escuro. Para a alimentação, foi utilizada ração comercial para peixes carnívoros de fundo (50%
1087 proteína) de 4 mm de diâmetro, oferecida duas vezes ao dia até a saciedade. O pH e a
1088 temperatura variaram de acordo com os tratamentos experimentais, apresentando 4 condições:
1089 1- Condição controle (temperatura controle [TC: ~27°C] e pH controle [pHC: ~8.1]); 2-
1090 Condição de aquecimento [(TA: ~32°C) e (pHC: ~8.1)]; 3- Condição de acidificação [(TC:
1091 ~27°C) e (pHC: ~7.8)]; 4- Condição de aquecimento e acidificação [(TA: ~32°C) e (pHA:
1092 ~7.8)]. As condições dos tratamentos de aquecimento e acidificação foram sendo atingidas
1093 gradualmente, sendo 1°C por dia para a temperatura e 0.1 unidades por dia para o pH.

1094 **2.2. Delineamento experimental**

1095 Neste estudo foram avaliadas as respostas antipredatórias do amoré quando submetidos
1096 à pista de alarme em diferentes condições de temperatura e pH. Para isso foram elaborados 4
1097 tratamentos: Controle (Temperatura e pH controle – TCpHC; n = 9); Temperatura aquecida e
1098 pH controle (TApHC; n = 9); Temperatura controle e pH acidificado (TCpHA; n = 8);
1099 Temperatura aquecida e pH acidificado (TApHA; n = 8). Desta forma foi possível observar os
1100 efeitos desses estressores na fase de recepção da pista, evidenciados pelas respostas
1101 comportamentais.

1102 A temperatura considerada controle nesse estudo foi definida a partir de uma análise dos
1103 dados de satélite do NOAA dos últimos 5 verões (de 22 de dezembro de 2017 até 21 de março
1104 de 2023) com resolução de 0,25 de longitude e 0,25 latitude (adaptado de Marochi et al., 2022).
1105 Já o pH foi definido com base nos valores médios globais (IPCC, 2021). Assim, a temperatura
1106 da condição controle foi de ~27°C, enquanto a condição aquecida teve um aumento de ~4,8°C
1107 (~32°C) (IPCC, 2021). A condição de acidificação foi considerada ~0.32 unidades abaixo (~7.8)
1108 do pH controle de ~8.1 (IPCC, 2021).

1109 A sequência experimental (figura 1) foi sempre mantida da seguinte forma: observamos
1110 a linha basal das variáveis comportamentais (sem qualquer substância) por 5 min (pré-estímulo),
1111 depois introduzimos a substância de alarme e observamos o comportamento dos peixes por mais
1112 5 min (pós-estímulo). No final, ofertamos 10 pellets de ração (~0,72283g/pellet) para os animais
1113 e observamos o comportamento por mais 10 min (período de alimentação). A quantidade de
1114 ração oferecida tinha por objetivo extrapolar a quantidade de alimentação média dos animais
1115 durante o período de isolamento pré-experimental, desta maneira garantiríamos uma variedade
1116 na alimentação dos indivíduos. Utilizamos metodologia adaptada de estudos de comportamento
1117 antipredatório mediado pela pista química de alarme (Arvigo et al., 2019; Sanches et al., 2015;
1118 Barreto et al., 2010).

1119

1120

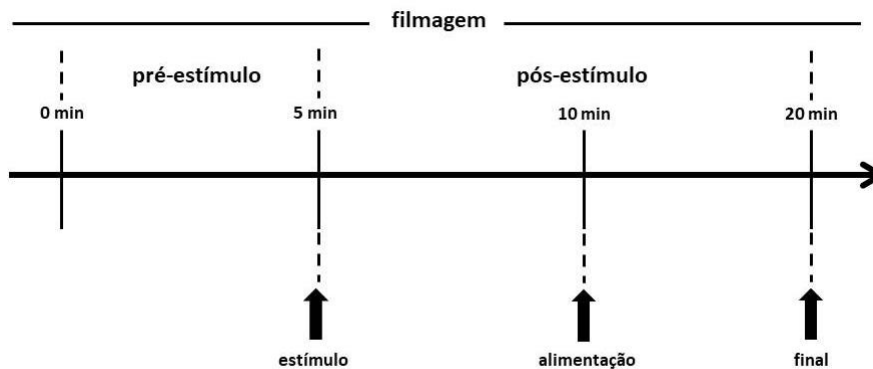
1121

1122

1123

1124

1125



1126

1127 **Figura 1:** Avaliação da resposta antipredatória do amboré (*Bathygobius soporator*). Períodos da experimentação:
1128 Pré-estímulo ou período basal, ainda sem a presença da pista química de alarme (0-5 min); estímulo, momento da
1129 entrada da pista química (5 min); pós-estímulo, período subsequente à entrada da pista química de alarme: primeiro
1130 momento – observação do comportamento pós-estímulo para comparação com o comportamento do período pré
1131 estímulo (5-10 min); segundo momento – alimentação para a observação do comportamento alimentar dos animais
pós exposição do estímulo (10-20 min).

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

Os peixes foram expostos a 5ml de pista de alarme, obtida a partir do extrato de pele do coespecífico. As variáveis avaliadas foram: 1) tempo no abrigo 2) comportamento alimentar, com a quantidade de alimento ingerido, considerando a ingestão bruta, peso ingerido e taxa de ingestão, além do número de investidas no alimento (Barreto et al., 2014; Barreto et al., 2013; Freitas & Volpato, 2008; Ide et al., 2003; Barreto et al., 2003; Giaquinto & Volpato, 2001; Chivers & Smith, 1998; Alvarenga & Volpato, 1995). As avaliações dos comportamentos antipredatórios (variáveis resposta), elencados aqui, foram feitas a partir de filmagens.

1141 **2.3. Procedimentos**

1142 **2.3.1. Procedimentos específicos**

1143 **a. Preparação da pista de alarme**

1144 Os extratos de pele foram obtidos de indivíduos doadores (n = 10) de amoré
1145 (*Bathygobius soporator*). Os animais foram sacrificados através da técnica de queda gradual de
1146 temperatura, sem uso de anestésicos para evitar interferência na pista química. A pele foi
1147 retirada dos dois lados do corpo com pinças e bisturi, evitando ao máximo a extração de
1148 musculatura agregada e a contaminação por sangue. Imediatamente após a retirada, a pele foi
1149 colocada em um béquer com água deionizada e, na sequência, homogeneizada com um
1150 homogeneizador. A solução passou por uma filtragem com lã de vidro e posteriormente algodão
1151 para a retirada de fragmentos remanescentes. O volume final foi ajustado com água deionizada,
1152 fazendo com que a concentração final tivesse a proporção de 2,602mm² de pele por ml, assim
1153 como descrito por Barreto et al. (2010). Os extratos foram armazenados em tubos Falcon (50
1154 ml) e congelados (aproximadamente -20°C), até o início do experimento. Esta metodologia de
1155 coleta dos extratos foi baseada em Barreto et al. (2010, 2014) e Sanches et al. (2015).

1156 **b. Controle das variáveis ambientais (temperatura e pH)**

1157 As condições foram monitoradas e controladas de acordo com cada tratamento (tabela
1158 1). Para a manutenção das temperaturas, o laboratório foi climatizado com auxílio de ar
1159 condicionado em 24°C para evitar a variação da temperatura do ar e possível interferência nos
1160 estoques e aquários de experimentação. Para o controle da temperatura da água, foram
1161 utilizados termostatos ajustados na temperatura de cada tratamento e foi realizado um
1162 monitoramento diário com termômetro digital (TM-946, Tipo k/J, Pt 100 ohm, Lutron®). O pH
1163 foi mantido com injeção de CO₂ e monitorado, por meio do “Equipamento para experimentação
1164 com organismos aquáticos” (APX-1 Central controle APEX ph/ORP e CO₂). Ainda houve um
1165 monitoramento secundário realizado diariamente com phmetro portátil (Apera PH60-Z –
1166 resolução 0.01 unidades). Adicionalmente utilizamos um tampão (Seachem Acid Buffer), a fim
1167 de evitar a flutuação do pH ao longo do tempo.

1168

1169

1170

1171

1172 **Tabela 1** – Valores de média e desvio padrão da temperatura e pH mantidos durante o período
 1173 de aclimação para todos os tratamentos (TCpHC; TApHC; TApHA; TCpHA). A temperatura
 1174 controle (TC) foi padronizada em ~27°C, enquanto a temperatura aquecida (TA) foi considerada
 1175 ~4.8°C acima da temperatura controle, ou seja, ~32°C. O pH controle (pHC) foi padronizado em
 1176 8.1, já o pH acidificado (pHA) foi considerado ~0.32 unidades abaixo do valor de pH controle,
 1177 ou seja, ~7.8.

Tratamento	TC (°C)	pHC	TA (°C)	pHC	TA (°C)	pHA	TC (°C)	pHA
Média	27.54	8.083	31.58	8.0855	31.565	7.7265	27.65	7.7035
Desvio Padrão	0.331504	0.094094	0.624584	0.088405	0.900453	0.149042	0.475173	0.065877

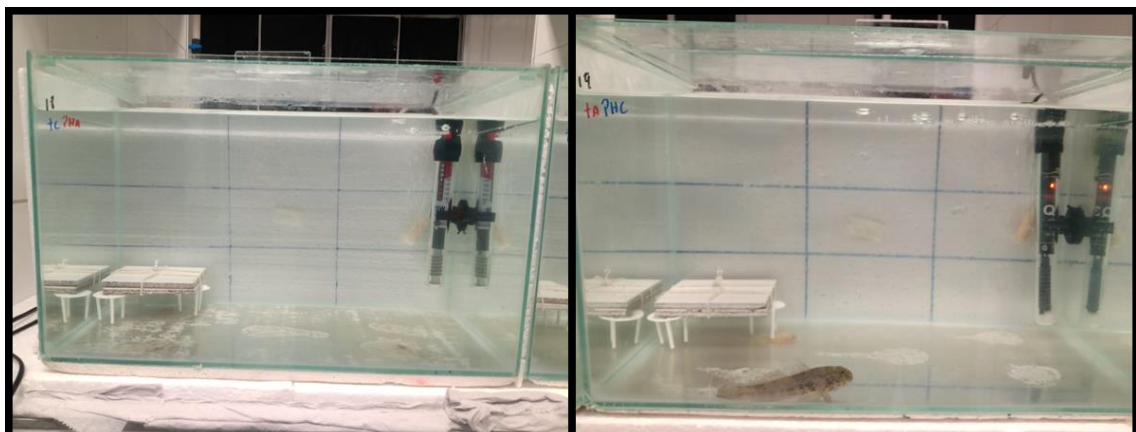
1178

1179 2.4. Procedimentos Experimentais

1180 a. Condições dos Aquários

1181 Os aquários (22 litros – 40 cm x 24 cm x 23 cm) foram dispostos em baias e separados
 1182 por placas opacas para evitar qualquer contato visual entre os animais durante a experimentação
 1183 (figura 2). Foi utilizada água do mar artificial com salinidade de ~ 33.5 ppt, assim como
 1184 utilizado em outros estudos com amboré (Pereira et al., 2017; Barreto et al., 2014), mantida com
 1185 temperatura e pH de acordo com as condições específicas de cada tratamento. Níveis de amônia
 1186 (<0,5 ppm) e nitrito (<0,5) foram mantidos em baixas quantidades através de trocas parciais de
 1187 água frequentes e saturada com oxigênio através de um sistema de aeração constante. A água
 1188 salgada artificial foi utilizada para evitar qualquer odor ambiental que possa estar presente na
 1189 água do mar. Foi controlado também o fotoperíodo, com 12 horas claro/12 horas escuro. O
 1190 experimento só teve início quando todos os animais mantidos nessas condições passaram a
 1191 comer sem restrições, um indicativo de baixo estresse (aproximadamente 5 dias).

1192



1193 **Figura 2:** Aquários de experimentação com amboré (*Bathygobius soporator*), evidenciando a disposição e
 1194 composição do aquário. Posição e estrutura do abrigo; posição de aeradores e termostato; placas opacas para evitar o
 1195 contato visual entre os animais durante o experimento.

1196

1197 **b. Variáveis comportamentais**

1198 Nós avaliamos o tempo no abrigo, contabilizando o tempo (s) que o animal permaneceu
1199 na toca durante o período pré-estímulo e pós-estímulo. Posteriormente foi calculado o delta (Δ =
1200 tempo pós-estímulo – tempo pré-estímulo) dos períodos. Cada aquário foi equipado com um
1201 abrigo (figura 2) de 10cm² sustentado por bases opacas (altura: 3.5cm; largura: 3.5cm;
1202 comprimento: 3.5cm), todos os abrigos foram posicionados no fundo do lado esquerdo do
1203 aquário (adaptado de Barreto et al., 2014). Foi também avaliado o comportamento alimentar,
1204 para tal contabilizamos a ingestão bruta, peso ingerido, taxa de ingestão, latência alimentar e
1205 investidas no alimento. A ingestão bruta foi considerada a quantidade de pellet ingerido. Já para
1206 o peso ingerido foi observado o peso de ração ingerida, sendo considerado um peso médio de
1207 0.07222g/pellet. A taxa de ingestão foi calculada através da razão peso do animal/peso ingerido.
1208 Foi contabilizada também a latência alimentar que consistia no tempo em que o animal
1209 demorava em buscar o alimento pela primeira vez. Nos casos em que o animal não buscou o
1210 alimento até o final do período de alimentação (10 min), a latência alimentar foi considerada o
1211 tempo máximo do período de alimentação (600s – 10min). Por fim, quantificamos o número de
1212 vezes em que o animal investiu no alimento. As variáveis de alimentação foram baseadas em
1213 Arvigo et al. (2019), Dwyer et al. (2002) e Carrieri & Volpato (1991).

1214 **c. Análise dos dados**

1215 Antes de realizar todas as análises, os outliers foram retirados através do teste de
1216 Chauvenet que consiste em retirar os dados acima da média + 2 * desvio padrão e os dados
1217 abaixo da média - 2 * desvio padrão. Para verificar se as variáveis comportamentais (tempo no
1218 abrigo; ingestão bruta; peso ingerido; taxa de ingestão; investidas) foram influenciadas pelas
1219 variáveis ambientais, foram realizadas *Generalized Linear Model* (GLM) com dois fatores:
1220 temperatura (fixo: controle e aquecido) e pH (fixo: controle e acidificado). A família de
1221 distribuição usada na análise de cada variável resposta foi feita a partir da natureza dos dados.
1222 Para “ingestão bruta”, “taxa de ingestão” e “investidas”, foi usada a família quasipoisson. Já
1223 para a variável “tempo no abrigo” foi utilizado a família de Poisson. Por fim, para “peso
1224 ingerido” foi usado a distribuição binomial negativo para ajustar a alta dispersão dos dados.
1225 Quando foram encontradas diferença entre os tratamentos, testes a posteriori de Tukey foram
1226 realizados para melhor compreender as diferenças entre os níveis do fator. Todas as análises
1227 foram realizadas utilizando o R 3.4.2 (R Core Team 2017).

1228 **3. Resultados**

1229 A temperatura e o pH não influenciaram as variáveis: ingestão bruta, peso ingerido, taxa
1230 de ingestão, latência alimentar (GLM, tabela 2). Com relação a variável “investidas”, a

1231 temperatura influenciou negativamente ($p = 0,0289$, GLM, tabela 2, figura 3). Nos cenários de
1232 aquecimento, o número de investidas foi cerca de 1,88 vezes menores que no cenário controle.
1233 Já com relação a variável “tempo no abrigo”, houve um efeito da interação entre a temperatura e
1234 o pH (GLM, $p < 0,001$, figura 4). Nos cenários de aquecimento, os peixes permaneceram mais
1235 tempo na toca com pH controle do que no pH acidificado (tukey test, $Z = 3,975$. $p < 0,001$,
1236 figura 4). Nos cenários de acidificação, a permanência também foi maior no cenário de
1237 temperatura controle, do que na temperatura aquecida (tukey test, $Z = 4,847$, $p < 0,001$, figura
1238 4). Não foram observadas diferenças (tukey test, $Z = 2,504$, $p = 0,0591$) no cenário com
1239 temperatura e pH controle do cenário com temperatura aquecida e pH acidificado (GLM, tabela
1240 2, figura 4).

1241

1242

1243

1244

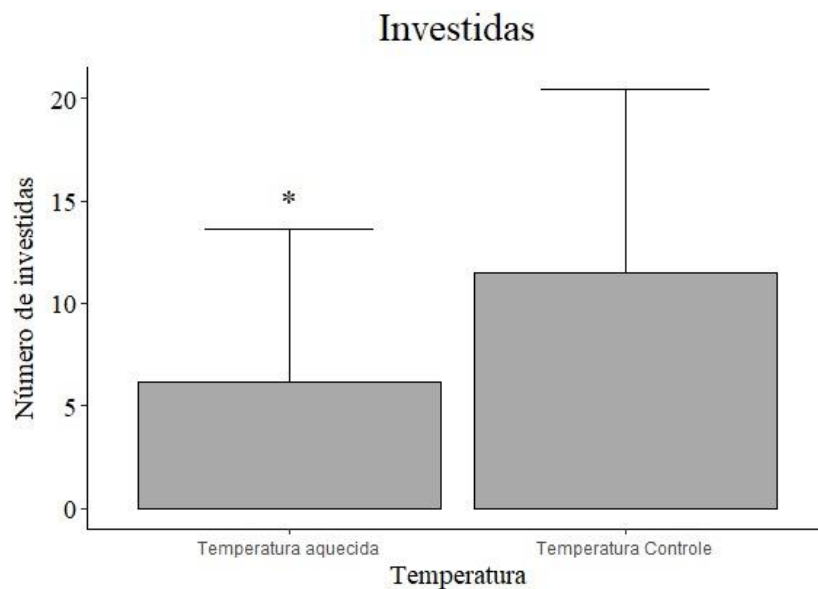
1245

1246

1247

1248

1249



1250

Figura 3: Investidas no alimento – Média \pm DP do número de vezes que o amboré exposto à pista química de alarme

1251 e em diferentes condições ambientais investiu no alimento. Desvio padrão representado pelas linhas pretas e verticais.

1252 No eixo X estão dispostos os tratamentos de temperatura sendo temperatura controle e temperatura aquecida. O

1253 asterisco representa a diferença estatística entre os tratamentos (GLM; distribuição quasipoisson; $p = 0,0289$).

1254

1255

1256

1257

1258

1259

1260

Tempo no abrigo

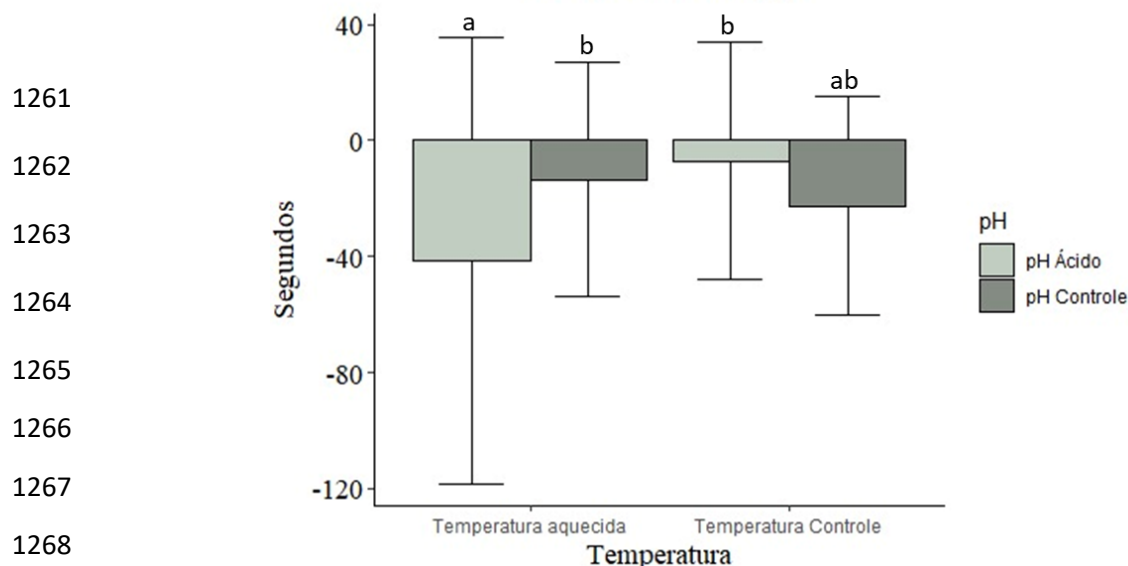


Figura 4: Tempo no abrigo – Média \pm DP do tempo (s) que o amboré permaneceu no abrigo quando exposto a pista química em diferentes condições ambientais. Valores representados pelo delta de tempo no abrigo (Δ = pós-estímulo – pré-estímulo) Desvio padrão representado pelas linhas pretas e verticais. No eixo X estão dispostos os tratamentos de temperatura sendo temperatura aquecida e temperatura controle e as cores das barras representam os tratamentos de pH, sendo pH ácido mais claro (acidificado) e pH controle mais escuro. As letras representam a diferença estatística entre os tratamentos (GLM; distribuição poisson; temperatura x pH: $p > 0,001$; temperatura: $p = 0,0089$).

1275

1276 Tabela 2 – Análises de desvios para GLM das respostas comportamentais do amboré
 1277 (*Bathygobius soporator*): variáveis resposta – tempo no abrigo, ingestão bruta, peso ingerido,
 1278 taxa de ingestão, número de investidas e latência alimentar com relação a temperatura e pH. A
 1279 distribuição utilizada na análise, para cada espécie, está indicada entre parênteses. Valores em
 1280 negrito indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte de Variação	gl	Desvio	gl Resíduo	Resíduos do desvio	p
Tempo no abrigo (Poisson)					
Null			29	574,38	
Temperatura	1	6,8521	28	567,52	0,0089
pH	1	2,2301	27	565,29	0,1353
Temperatura x pH	1	17,6024	26	547,69	<0,001
Ingestão bruta (quasipoisson)					
Null			32	77,31	
Temperatura	1	0,5795	31	76,73	0,6051
pH	1	1,2471	30	75,49	0,4482
Temperatura x pH	1	0,1988	29	75,28	0,7620
Peso ingerido (binomial negativo)					
Null			32	34,16	

Temperatura	1	0,2968	31	33,86	0,5859
pH	1	0,6462	30	33,22	0,4215
Temperatura x pH	1	0,0889	29	33,13	0,7655
<i>Taxa de ingestão (quasipoisson)</i>					
Null			32	233,18	
Temperatura	1	0,1121	31	233,07	0,8993
pH	1	0,9525	30	232,12	0,7122
Temperatura x pH	1	0,3260	29	231,79	0,8291
<i>Investidas (quasipoisson)</i>					
Null			31	44,01	
Temperatura	1	4,7722	30	36,23	0,0289
pH	1	2,7649	29	36,47	0,0964
<i>Latência alimentar (quasipoisson)</i>					
Null			30	40,48	
Temperatura	1	1,6487	29	38,83	0,1991
pH	1	0,5398	28	38,29	0,4625
Temperatura x pH	1	0,1787	27	38,11	0,6725

1281

1282 4. Discussão

1283 Neste estudo, observamos a influência dos estressores climáticos no comportamento do
1284 amoré. Os animais expostos a condições de aquecimento e acidificação apresentaram
1285 comportamentos distintos em relação ao tempo no abrigo e ao número de investidas para
1286 obtenção de alimento, em comparação com os animais mantidos em condições controle.
1287 Notavelmente, a temperatura elevada provocou um maior tempo de permanência na toca para
1288 animais em pH controle, em comparação aos animais em pH acidificado. Da mesma forma, o
1289 cenário acidificado resultou em um maior tempo de permanência no abrigo para os animais em
1290 temperatura controle, em comparação com os animais em temperatura aquecida. No entanto,
1291 para os cenários de temperatura e pH controle, não houveram diferenças no tempo de uso de
1292 abrigo em relação à temperatura aquecida e pH acidificado. Em relação ao número de investidas
1293 no alimento observou-se um efeito apenas na temperatura: os animais em temperatura controle
1294 realizaram um maior número de investidas do que os animais em um cenário de aquecimento.

1295 Nossos resultados sobre o tempo no abrigo são altamente intrigantes e levantam
1296 questões significativas para o debate. A diversidade de efeitos e respostas resultantes das
1297 interações entre o pH e a temperatura indica uma dinâmica complexa desses estressores, o que
1298 sugere a possibilidade de efeitos sinérgicos, um tema amplamente discutido na literatura.
1299 Nagelkerken & Munday (2016) ressaltam a importância de considerar a interação entre o
1300 aquecimento e a acidificação dos oceanos ao investigar os impactos das mudanças do clima nos
1301 organismos marinhos. Esse debate tem sido levantado em diversos estudos (Ferrari et al., 2015;
1302 Queirós et al., 2014; Schalkhauser et al., 2014; Rosa & Seibel, 2008), sugerindo que a
1303 abordagem desses fatores isoladamente limita a compreensão dos efeitos reais, devido a
1304 complexidade do assunto. Ferrari et al. (2015), por exemplo, destacam que o aquecimento e a
1305 acidificação podem ter efeitos tanto sinérgicos quanto antagônicos sobre a taxa geral de
1306 predação e a seletividade do predador. Isso sugere que a combinação desses estressores pode
1307 resultar em respostas não lineares e complexas em diversas interações ecológicas, incluindo a
1308 relação presa-predador, com efeitos que vão além do que poderia ser previsto com base nos
1309 efeitos isolados (Ferrari et al., 2015). Neste contexto, nosso estudo contribui de forma relevante
1310 para entender a complexa interação entre temperatura e pH e seu impacto no comportamento
1311 dos animais estudados. A interação observada no presente estudo pode ser descrita conforme o
1312 esquema (figura 3):

1313

1314

1315

1316

1317

1318

1319

1320

1321

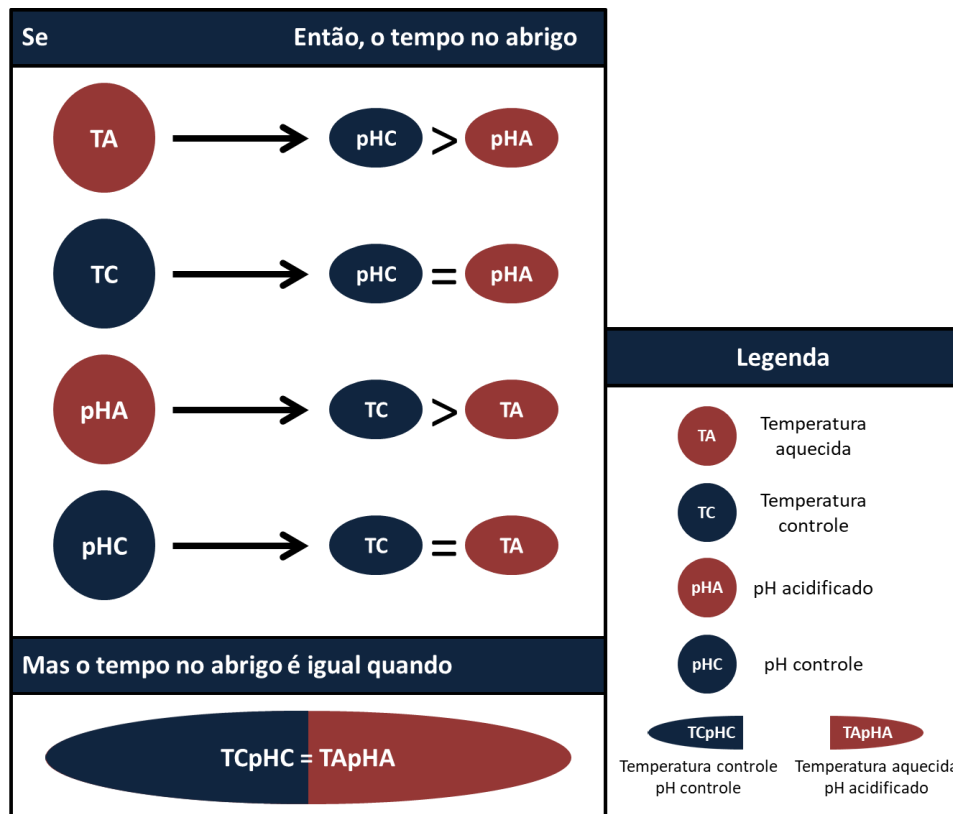
1322

1323

1324

1325

1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338



1339 **Figura 3:** Esquema representando as interações encontradas a partir das análises estatísticas da variável “tempo no
1340 abrigo”. Se a temperatura é aquecida (TA), o tempo de permanência no abrigo é maior para o pH controle (pHC) em
1341 relação ao pH acidificado (pHA); Se a temperatura é controle (TC), o tempo de permanência no abrigo é
1342 estatisticamente igual para o pH controle (pHC) e o pH acidificado (pHA); Se o pH é acidificado, o tempo de
1343 permanência no abrigo é maior para a temperatura controle (TC) em relação a temperatura aquecida (TA); Se o pH é
1344 controle, a permanência no abrigo é estatisticamente igual para a temperatura controle (TC) e a temperatura aquecida
1345 (TA). No entanto, quando temos o cenário de temperatura controle combinada com o pH controle (TCpHC), o tempo
1346 de permanência no abrigo é estatisticamente igual ao cenário de temperatura aquecida e pH acidificado (TApHA).

1347 Assim, observamos que as interações entre os estressores climáticos e o comportamento
1348 dos animais são complexas. Com base nas definições utilizadas por Tekin et al. (2020), a análise
1349 da temperatura aquecida (TA) em relação aos cenários pH controle (pHC) e pH acidificado
1350 (pHA) sugere um tipo de sinergia positiva. Do mesmo modo que a análise do pH acidificado
1351 (pHA) em relação aos cenários de temperatura aquecida (TA) e temperatura controle (TC)
1352 também sugerem uma sinergia positiva. Enquanto isso, o cenário de temperatura controle (TC)
1353 em relação aos cenários de pH acidificado (pHA) e de pH controle sugere uma sinergia neutra, o
1354 mesmo aparenta acontecer com o cenário de pH controle (pHC) em relação aos cenários de
1355 temperatura controle (TC) e temperatura aquecida (TA) que igualmente sugerem um cenário de
1356 sinergia neutra. Diante dessas observações, poderíamos argumentar que se trata de uma sinergia
1357 mista, uma vez que o tratamento controle (TCpHC) aparenta ter um comportamento
1358 intermediário. No entanto, devido à natureza complexa dessas interações e à falta de clareza
1359 sobre como esses fatores se combinam, é difícil categorizar definitivamente essa interação como
1360 uma sinergia mista ou de outro tipo. A complexidade dessas interações decorre do fato de que o
1361 aquecimento e a acidificação podem influenciar o mesmo comportamento, mas por meios
1362 distintos. Estudos anteriores apontam que o pH pode afetar diretamente aspectos neurológicos

1363 do animal (Nagelkerken & Munday, 2016), enquanto a temperatura tem um efeito mais direto
1364 no metabolismo do animal (Draper & Weissburg, 2019; Nagelkerken & Munday, 2016; Ferrari
1365 et al., 2015).

1366 Independentemente do tipo sinergia presente, fica evidente que o aquecimento e a
1367 acidificação têm um impacto significativo no comportamento de busca por abrigo, o que fica
1368 explícito na redução do tempo de permanência na toca. Essa interferência dos estressores
1369 climáticos no comportamento de uso de abrigos foi documentada em vários estudos (Draper &
1370 Weissburg, 2019; Nagelkerken & Munday, 2016; Ferrari et al, 2015; Milazzo et al., 2013;
1371 Walberg & Fisher, 2011). O aquecimento afeta o uso e a busca de abrigo de diversas formas,
1372 principalmente por meio de modificações fisiológicas e comportamentais. Milazzo et al. (2013)
1373 demonstraram que a temperatura influencia a preferência e a busca por abrigo em contextos de
1374 competição. Ferrari et al. (2015) indicam que o aquecimento pode afetar a atividade metabólica
1375 das presas, sua capacidade de resposta ao estresse e sua preferência por habitats específicos,
1376 aumentando a sua exposição ao risco.

1377 Os efeitos da acidificação no uso de abrigo também são significativos e podem
1378 modificar diversos fatores, desde aspectos fisiológicos e comportamentais (Draper &
1379 Weissburg, 2019; Nagelkerken & Munday, 2016; Ferrari et al, 2015). Um dos efeitos mais
1380 discutidos é o prejuízo na percepção de sinais químicos, o que torna as presas mais vulneráveis
1381 e menos capazes de tomarem decisões eficazes (Draper & Weissburg, 2019; Ferrari et al, 2015;
1382 Hamilton et al., 2014). Hamilton et al. (2014) destacam a acidificação como um importante fator
1383 para o aumento da ansiedade nos animais testados. Essa ansiedade, definida como um aumento
1384 na resposta de medo ou estresse pode ser extremamente prejudicial à sobrevivência dos animais,
1385 afetando negativamente a capacidade de reprodução, interação social e de adaptação às
1386 mudanças ambientais. Um menor tempo de permanência na toca pode ser um indicativo de
1387 ansiedade nos animais (Hamilton et al., 2014), além expô-los a diversos riscos.

1388 Encontramos também uma queda do número de investidas no alimento no cenário
1389 aquecido em comparação ao controle. Nosso trabalho não está isolado ao observar essa
1390 diminuição na motivação alimentar relacionada à temperatura. Walberg & Fisher (2011),
1391 também observaram uma redução na motivação alimentar em *black bullhead* (*Ameiurus melas*),
1392 enquanto registraram um aumento para *black crappie* (*Pomoxis nigromaculatus*) no mesmo
1393 estudo. Embora seja esperado um aumento no comportamento alimentar associado ao aumento
1394 de temperatura, é importante reconhecer que essas alterações podem variar entre diferentes
1395 espécies. Estudos anteriores indicam que espécies de peixes de água fria reduzem o consumo
1396 quando expostas a temperatura mais alta (Behrens & Lafferty, 2007). Ressaltamos que não
1397 encontramos diferenças significativas na ingestão entre os tratamentos. No entanto, a relação

1398 entre motivação alimentar e ingestão não é tão simples e envolve uma série de fatores. Animais
1399 saciados podem continuar forrageando por razões que vão além da imediata necessidade de
1400 alimentação, como a busca por nutrientes específicos ou a acumulação de reservas energéticas
1401 para períodos de escassez futura, além da competição intraespecífica (Tomida et al., 2012).

1402 Neste estudo, destacamos efeitos diretos do aquecimento global e da acidificação no
1403 comportamento defensivo do amboré. Assim como em outros trabalhos (Draper & Weissburg,
1404 2019; Nagelkerken & Munday, 2016; Ferrari et al., 2015; Queirós et al., 2014; Schalkhauser et
1405 al., 2014; Rosa & Seibel, 2008), enfatizamos a complexidade contida na compreensão dos
1406 efeitos do aumento da temperatura e diminuição do pH. A abordagem conjunta desses
1407 estressores se mostra um desafio necessário. A cada novo avanço, percebemos que a interação
1408 entre eles é muito mais impactante e diversa do que seus efeitos individuais. Além disso, nosso
1409 estudo evidencia que os comportamentos afetados podem representar riscos claros à
1410 sobrevivência das espécies presas. Elas deixam de avaliar de forma efetiva o risco de predação e
1411 acabam se expondo inadequadamente. Ainda é necessário aprofundar o entendimento das
1412 interações que esses estressores podem causar no comportamento e na fisiologia. Esses aspectos
1413 podem alterar significativamente o funcionamento dos ecossistemas, tal qual conhecemos hoje.

1414 **5. Certificado e autorizações**

1415 Este trabalho está em conformidade com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal
1416 adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal — Brasil (CONCEA)
1417 de acordo com as recomendações para pesquisa envolvendo vertebrados e foi aprovado pela
1418 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências do Câmpus do
1419 Litoral Paulista (Protocolo n° 10/2023-CEUA). Todas as atividades de coleta e manutenção de
1420 animais seguiram rigorosamente as diretrizes estabelecidas pelo SISBIO Sistema Brasileiro de
1421 Autorização e Informação em Biodiversidade (Protocolo n° 72194-4). Todas as diretrizes
1422 internacionais, nacionais e institucionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram
1423 seguidas.

1424

1425

1426

1427

1428

1429

1430 **6. Referências**

- 1431 Alvarenga CMD, Volpato GL (1995) Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile
1432 tilapia. *Physiol Behav.* 57, 75-80.
- 1433 Arvigo AL, Miyai CA, Sanches FHC, Barreto RE, Costa TM (2019) Combined effects of
1434 predator odor and alarm substance on behavioral and physiological responses of the pearl
1435 cichlid. *Physiol Behav.* 206, 259-263.
- 1436 Boullis A, Frassotte B, Sarles L, Lognay G, Heuskin S, Vanderplanck M, et al. (2017) Elevated
1437 carbon dioxide concentration reduces alarm signaling in aphids. *J Chem Ecol.* 43, 164-171.
- 1438 Barreto RE, Barbosa-Junior A, Urbinati EC, Hofmann A (2014) Cortisol influences the
1439 antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the frillfin goby. *Horm Behav.* 65, 394-
1440 400.
- 1441 Barreto RE, Sanches FHC, Giaquinto PC, Delicio HC, Volpato GL (2013) Blood cues induce
1442 antipredator behavior in Nile tilapia conspecifics. *PLoSone.* 8(1), e54642.
- 1443 Barreto RE, Barbosa-Junior A, Giassi ACC, Hoffmann A (2010) The “club” cell and
1444 behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in Nile tilapia. *Mar Freshw
1445 Behav Physiol.* 43, 75-81.
- 1446 Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL (2003) Ventilatory frequency indicates visual
1447 recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behav Process.* 60, 235-239.
- 1448 Behrens MD, Lafferty KD (2007) Temperature and diet effects on omnivorous fish
1449 performance: implications for the latitudinal diversity gradient in herbivorous fishes. *Can J fish
1450 Aquat Sci.* 64, 867-873.
- 1451 Briceño FA, Fitzgibbon QP, Polymeropoulos ET, Hinojosa IA, Pecl GT (2020) Temperature
1452 alters the physiological response of spiny lobsters under predation risk. *Conserv Physiol.* 8,
1453 2020.
- 1454 Briffa M, de la Haye K, Munday PL (2012) High CO₂ and marine animal behaviour: potential
1455 mechanisms and ecological consequences. *Mar Pollut Bull.* 64, 1519-1528.
- 1456 Carrieri MP, Volpato GL (1991) Does snatching frequency really indicate food ingestion in the
1457 Nile tilapia? *Physiol Behav.* 50, 489–492.
- 1458 Chalom A, Muto EY, Soares LSH (2008) Variabilidade trófica na alimentação do bagre-
1459 amarelo *Cathorops spixii* (Agassiz, 1829) no litoral do estado de São Paulo, in: Braga. ES.
1460 (Eds.) *Oceanografia e mudanças globais*, Instituto Oceanográfico da Universidade de São
1461 Paulo/Brasil, São Paulo, pp. 257-272.
- 1462 Chen I, Hill JK, Ohlemuller R, Roy DB, Thomas CD (2011) Rapid range shifts of species of
1463 climate warming. *Science.* 333, 1024-1026.
- 1464 Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signalling in aquatic predator-prey systems: a
1465 review and prospectus. *Écoscience.* 5(3), 338-352.

- 1466 Cronin TW (2005) The role of vision in predator-prey interactions. In: Barbosa P, Castellanos I.
1467 Ecology of predator-prey interactions. New York, Oxford University Press. pp. 105-138.
- 1468 Dixson DL, Munday PL, Jones GP (2010) Ocean acidification disrupts the innate ability of fish
1469 to detect predator olfactory cues. *Ecol Lett.* 12, 68-75.
- 1470 Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009) Ocean acidification the other CO₂ problem.
1471 *Annu Rev Mar Sci.* 1, 169-192.
- 1472 Draper AM, Weissburg MJ (2019) Impacts of global warming and elevated CO₂ on sensory
1473 behavior in predator-prey interactions: a review and synthesis. *Ecol Evol.* 7(71), 1-19.
- 1474 Dwyer KS, Brown JA, Parrish C, Lall SP (2002) Feeding frequency affects food consumption,
1475 feeding pattern and growth of juvenile yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). *Aquac.* 213,
1476 279–292.
- 1477 Ferrari MCO, Munday PL, Rummer JL, McCormick MI, Corkill K, Watson S, et al. (2015)
1478 Interactive effects of ocean acidification and rising sea temperatures alter predation and predator
1479 selectivity in reef fish communities. *Glob Chang Biol.* 21(5), 1848-1855.
- 1480 Freitas RHA, Volpato GL (2008) Behavioral response of Nile tilapia to an allopatric predator.
1481 *Mar Freshw Behav Phy.* 41, 267-272.
- 1482 Giaquinto PC, Volpato GL (2001) Hunger suppresses the onset and the freezing component of
1483 the antipredator response to conspecific skin extract in pintado catfish *Behav.* 138, 1205-1214.
- 1484 Goldenberg SU, Nagelkerken L, Marangon E, Bonnet A, Ferreira CM, Connell SD (2018)
1485 Ecological complexity buffers the impacts of future climate on marine consumers. *Nat Clim*
1486 *Change.* 8, 229-233.
- 1487 Hailman JP (1977) Optical signals: animal communication and light. Oxford, England, Indiana
1488 University Press, pp. 362.
- 1489 Hamilton TJ, Holcombe A, Tresguerres M (2014) CO₂-induced ocean acidification increases
1490 anxiety in Rockfish via alteration of GABA_A receptor functioning. *Proc Royal Soc B.*
1491 281(1775), 20132509.
- 1492 Hara TJ (1994) The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Rev Fish*
1493 *Biol Fisher.* 4, 1-35.
- 1494 Hickling R, Roy DB, Hill JK, Fox R, Thomas CD (2006) The distributions of a wide range of
1495 taxonomic groups are expanding polewards. *Glob Chang Biol.* 12, 450-455.
- 1496 Ide LM, Urbinati EC, Hoffmann A (2003) The role of olfaction in the behavioural and
1497 physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. *J Fish Biol.* 63, 332-343.
- 1498 IPCC (2021) “Climate change 2021: The physical science basis in contribution of working
1499 group I to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. eds
1500 Masson-Delmotte V, Zhai A, Pirani SL Connors C, Péan S, Berger N, Caud Y, Chen L,
1501 Goldfarb MI, Gomis M, Huang K, Leitzell E, Lonnoy JBR, Matthews TK, Maycock T,
1502 Waterfield O, Yelekçi R, Yu R, Zhou B (2021) Cambridge University Press.

- 1503 Kats LB, Dill LM (1998) The scent of death: Chemosensory assessment of predation risk by
1504 prey animals. *Ecoscience*. 5, 361-394.
- 1505 Kidawa A, Potocka M, Janecki T (2010) The effects of temperature on the behaviour of the
1506 Antarctic sea star *Odontaster validus*. *Pol Polar Res*. 31, 273-284.
- 1507 Kowalewska AA, Krebs N, Tollrian R, Weiss LC (2020) Elevated pCO₂ affects behavioural
1508 patterns and mechano-sensation in predatory phantom midge larvae *Chaoborus obscuripes*. *Sci*
1509 *Rep*. 10, 1800.
- 1510 Lopes PRD, Oliveira-Silva JT (1998) Alimentação de *Bathygobius soporator* (Valenciennes,
1511 1837) (Actinopterygii: Teleostei: Gobiidae) na localidade de Cacha Pregos (Ilha de Itaparica),
1512 Bahia, Brasil. *Biotemas*. 11, 81-92.
- 1513 Marochi MZ, De Grande FR, Pardo JCF, Montenegro A, Costa TM (2022) Marine heatwave
1514 impacts on newly-hatched planktonic larvae of an estuarine crab. *Estuar Coast Shelf Sci*. 278,
1515 108-122.
- 1516 Milazzo M, Mirto S, Domenici P, Gristina M (2013) Climate change exacerbates interspecific
1517 interactions in sympatric coastal fishes. *J Anim Ecol*. 82, 468-477.
- 1518 Munday PL, Dixson DL, McCormick MI, Meekan M, Ferrari MCO, Chivers DP (2010)
1519 Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. *Proc Natl Acad Sci*.
1520 USA. 107, 12930-12934.
- 1521 Nagelkerken I, Munday P (2016) Animal behaviour shapes the ecological effects of ocean
1522 acidification and warming: moving from individual to community-level responses. *Glob Chang*
1523 *Biol*. 22, 974-989.
- 1524 Paganini AW, Miller NA, Stillman JH (2014) Temperature and acidification variability reduce
1525 physiological performance in the intertidal zone porcelain crab *Petrolisthes cinctipes*. *J Exp*
1526 *Biol*. 217, 3974-3980.
- 1527 Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across
1528 natural systems. *Nature*. 421, 37-42.
- 1529 Pereira RT, Leutz JACM, Valença-Silva G, Barcellos LJG, Barreto RE (2017) Ventilation
1530 responses to predator odors and conspecific chemical alarm cues in the frillfin goby. *Physiol*
1531 *Behav*. 179:319-323.
- 1532 Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD (2005) Climate change and distribution shifts in
1533 marine fishes. *Science*. 308, 1912-1915.
- 1534 Pfeiffer W (1977) The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*.
1535 4,653-665.
- 1536 Pistevos JC, Nagelkerken I, Rossi T, Olmos M, Connell SD (2015) Ocean acidification and
1537 global warming impair shark hunting behaviour and growth. *Sci Rep*. 5, 16293.

1538 Porteus CS, Hubbard PC, Webster TMU, Aerle R, Canário AVM, Santos EM, et al. (2018)
1539 Near-future CO2 levels impair the olfactory system of a marine fish. Nat Climate Change. 8,
1540 737-743.

1541 Queirós AM, Fernandes JA, Faulwetter S, Nunes J, Rastrick SPS, Mieszkowska N, et al. (2014)
1542 Scaling up experimental ocean acidification and warming research: from individuals to the
1543 ecosystem. Glob Chang Biol. 21(1), 130-143.

1544 Roggatz CC, Lorch M, Hardege JD, Benoit DM (2016) Ocean acidification affects marine
1545 chemical communication by changing structure and function of peptide signaling molecules.
1546 Glob Change Biol. 22, 3914-3926.

1547 Rosa R, Seibel BA (2008) Synergistic effects of climate-related variables suggest future
1548 physiological impairment in a top oceanic predator. PNAS. 105(52), 20776-20780.

1549 Sanches FHC, Miyai CA, Pinho-Neto CF, Barreto RE (2015) Stress responses to chemical alarm
1550 cues in Nile tilapia. Physiol Behav. 149, 8-13.

1551 Schalkhauser B, Bock C, Pörtner HO, Lannig G (2014) Escape performance of temperate king
1552 scallop, *Pecten maximus* under ocean warming and acidification. Mar Biol. 161, 2819-2829.

1553 Smith ME (2000) Alarm response of *Arius felis* to chemical stimuli from injured conspecifics. J.
1554 Chem Ecol. 26, 1635-1647.

1555 Tekin E, Diamant ES, Cruz-Loya M, Enriquez V, Singh N, Savage VM, Yeh PJ (2020) Using a
1556 newly introduced framework to measure ecological stressor interactions. Ecol. 23, 1391-1403.

1557 Tomida L, Lee JT, Barreto RE (2012) Stomach fullness modulates a visually-based prey-size
1558 choice in a predator fish, frillfin goby *Bathygobius soporator*. Zoology 115, 283-288.

1559 Walberg E, Fisher S (2011) Effect of increased water temperature on warm water fish feeding
1560 behavior and habitat use. JUR at Minnesota State University. 11(1), 13.

1561 Wisenden BD (2000) Olfactory assessment of predation risk in the aquatic environment. Philos
1562 Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355, 1205-1208.

1563 Wu F, Wang T, Cui S, Xie Z, Dupont S, Zeng J, et al. (2017) Effects of seawater pH and
1564 temperature on foraging behavior of the Japanese stone crab *Charubdis japonica*. Mar Pollut
1565 Bull. 120, 99-108.

1566

1567

1568

1569

1570

1571

1572 **Considerações Finais**

1573 Neste estudo visamos aprofundar nosso entendimento sobre a comunicação química
1574 mediada pela substância de alarme, reconhecida como uma fonte crucial de informação para o
1575 comportamento antipredatório. No primeiro capítulo, investigamos os potenciais bioativos
1576 presentes na substância de alarme, os quais podem desempenhar o papel de sinalização de risco.
1577 Composta por substâncias nitrogenadas, como esfingolipídeos, aminoácidos e derivados de
1578 purina. Além disso, por meio de um estudo bio guiado, confirmamos a persistência das respostas
1579 de alarme na porção fracionada da pista (SAF). As respostas comportamentais observadas na
1580 SAF assemelham-se as exibidas quando os animais são expostos a substância de alarme
1581 completa (SAC), corroborando a natureza polar da pista.

1582 Os esfingolipídeos são moléculas comuns em membranas biológicas de diversos tecidos
1583 e organismos (Bartke & Hannun, 2009). Por outro lado, os aminoácidos são a unidade básica
1584 das proteínas e desempenham papel importante na regulação de inúmeros processos ligados a
1585 expressão gênica (Akram et al., 2011). Além disso, possuem potencial de compor estimulantes
1586 liberados por presas feridas e carniça (Carr, 1988). No entanto, são os derivados de purina que
1587 merecem atenção especial, uma vez que nossas descobertas corroboram estudos anteriores, os
1588 quais destacam as purinas, como 3(N)-óxido de hipoxantina e N-óxido de piridina, como
1589 principais agentes da sinalização de alerta (Brown et al., 2000; Pfeiffer et al., 1985; Hüttel,
1590 1941). Partindo de um extrato natural, realizamos uma investigação inédita, identificando
1591 grupos moleculares previamente sugeridos como componentes da substância de alarme. Essa
1592 confirmação destaca-se, uma vez que, até então, as respostas comportamentais haviam sido
1593 testadas com moléculas sintéticas, carecendo de evidências claras de sua presença na
1594 composição molecular da substância de alarme.

1595 Demonstramos um método eficiente e coerente, embora o aprofundamento dessas
1596 descobertas seja desafiado por dificuldades metodológicas associadas à extração e isolamento
1597 de compostos hidrossolúveis de matrizes biológicas. A vasta gama de outras substâncias
1598 solúveis presentes nesses compostos pode interferir na análise e separação dos metabólitos,
1599 dificultando a purificação e identificação dessas substâncias (Berlinck et al., 2022).

1600 No capítulo II, realizamos uma análise comportamental das respostas defensivas em um
1601 contexto de mudanças do clima, também utilizando a substância de alarme como sinalizador.
1602 Confirmamos nossa hipótese de um possível efeito dos estressores climáticos nas respostas
1603 comportamentais. Identificamos resultados intrigantes, como as respostas no tempo de
1604 permanência no abrigo que sugerem uma interação complexa entre o aquecimento e a
1605 acidificação. O potencial sinérgico entre esses estressores e sua complexa interação nos
1606 organismos já foi apontado na literatura (Nagelkerken & Munday, 2016; Ferrari et al., 2015;

1607 Queirós et al., 2014; Schalkhausser et al., 2014; Rosa & Seibel, 2008) e nós reiteramos essas
1608 observações neste estudo, destacando mais uma vez a necessidade de estudos que incorporem
1609 tais interações em suas abordagens. Observamos que o tempo no abrigo foi afetado
1610 negativamente por ambos os estressores climáticos, enquanto a motivação alimentar foi
1611 visualmente apenas prejudicada pela temperatura. Esses efeitos estavam em conformidade com
1612 a literatura (Draper & Weissburg, 2019; Nagelkerken & Munday, 2016; Ferrari et al, 2015;
1613 Milazzo et al., 2013; Walberg & Fisher, 2011; Behrens & Lafferty, 2007), evidenciando os
1614 riscos das alterações climáticas para a sobrevivência dos animais. No entanto, nossos resultados
1615 contrariam as expectativas em alguns aspectos, como quando os animais expostos a altas
1616 temperaturas apresentaram uma diminuição na motivação alimentar, embora tenham mantido a
1617 ingestão semelhante ao grupo controle. Ainda que fosse esperado um aumento no
1618 comportamento alimentar e na ingestão em um cenário de aquecimento, existem evidências de
1619 que a motivação alimentar e a ingestão nem sempre apresentam um *feedback* positivo, devido a
1620 uma variedade de razões (Tomida et al., 2012), não exclusivamente relacionadas às mudanças
1621 do clima. É relevante salientar que existem outros relatos de animais expostos a altas
1622 temperaturas que não aumentaram sua motivação alimentar ou ingestão (Walberg & Fisher,
1623 2011; Behrens & Lafferty, 2007).

1624 Nosso estudo oferece contribuições significativas para o entendimento da comunicação
1625 química e dos impactos das mudanças do clima sobre esse processo. Considerando que tais
1626 mudanças podem influenciar os processos de geração, propagação e recepção de pistas
1627 químicas, conhecidos como via de transdução sensorial (Draper & Weissburg, 2019), é
1628 importante conhecer completamente esses mecanismos para identificar quais etapas são mais
1629 suscetíveis aos fenômenos climáticos. Compreender a composição química das pistas
1630 responsáveis por transmitir informações ecologicamente relevantes é fundamental, pois nos
1631 permite inferir os possíveis efeitos das mudanças do clima na etapa de propagação dessas pistas.
1632 Por exemplo, o aquecimento global pode afetar a estrutura de esfingolípídeos, comprometendo
1633 suas funções (Fabri et al., 2020). Da mesma forma, os aminoácidos podem ter sua estrutura e
1634 funções afetadas pelo aumento de temperatura (Barik, 2020).

1635 Em resumo, alcançamos um refinamento significativo nas potenciais moléculas
1636 responsáveis pela sinalização de risco proveniente da substância de alarme, fornecemos
1637 também, *insights* valiosos para as discussões sobre a interação entre o aquecimento global e a
1638 acidificação, bem como seus potenciais efeitos no comportamento de animais marinhos. A
1639 exploração e o aprofundamento de temas como este são de vital importância para
1640 compreendermos as mudanças em nosso planeta e para a estruturação de medidas de mitigação
1641 adequadas, a fim de minimizar o iminente desequilíbrio ecológico e a perda massiva de
1642 biodiversidade.

1643 **Referências**

- 1644 Akram M, Asif HM, Uzair M, Akhtar N, Madni A, Shah SA, et al. (2011) Amino acids: A
1645 review article. *J Med Plant Res.* 5(17), 3997-4000.
- 1646 Barik S (2020) Evolution of protein structure and stability in global warming. *Int J Mol Sci.*
1647 21(24), 9662.
- 1648 Bartke N, Hannun Y (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 50,
1649 S91-S96.
- 1650 Behrens MD, Lafferty KD (2007) Temperature and diet effects on omnivorous fish
1651 performance: implications for the latitudinal diversity gradient in herbivorous fishes. *Can J fish*
1652 *Aquat Sci.* 64, 867-873.
- 1653 Berlinck RGS, Crnkovic CM, Gubiani JR, Bernardi DI, Ióca LP, Quintana-Bulla JI (2022) The
1654 isolation of water-soluble natural products – challenges, strategies and perspectives. *Nat Prod*
1655 *Rep.* 39, 596-669.
- 1656 Brown GE, Brennan S (2000) Chemical alarm signals in juvenile green sunfish (*Lepomis*
1657 *cyanellus*, Centrarchidae). *Copeia.* 4, 1079-1082.
- 1658 Carr WES (1988) The molecular nature of chemical stimuli in the aquatic environment. - In:
1659 Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN (eds), *Sensory biology of aquatic animals.* Springer-
1660 Verlag, Berlin, pp. 3-27.
- 1661 Draper AM, Weissburg MJ (2019) Impacts of global warming and elevated CO₂ on sensory
1662 behavior in predator-prey interactions: a review and synthesis. *Ecol Evol.* 7(71), 1-19.
- 1663 Fabri JHTM, de Sá NP, Malavazi I, Del Poeta M (2020) The dynamics and role of sphingolipids
1664 in eukaryotic organisms upon thermal adaptation. *Prog Lipid Res.* 80, 101063.
- 1665 Ferrari MCO, Munday PL, Rummer JL, McCormick MI, Corkill K, Watson S, et al. (2015)
1666 Interactive effects of ocean acidification and rising sea temperatures alter predation and predator
1667 selectivity in reef fish communities. *Glob Chang Biol.* 21(5), 1848-1855.
- 1668 Hüttel R (1941) Die chemische untersuchung des schreckstoffes aus elritzenhaut.
1669 *Naturwissenschaften.* 29, 333-334.
- 1670 Milazzo M, Mirto S, Domenici P, Gristina M (2013) Climate change exacerbates interspecific
1671 interactions in sympatric coastal fishes. *J Anim Ecol.* 82, 468-477.
- 1672 Nagelkerken I, Munday P (2016) Animal behaviour shapes the ecological effects of ocean
1673 acidification and warming: moving from individual to community-level responses. *Glob Chang*
1674 *Biol.* 22, 974-989.
- 1675 Pfeiffer W, Riegelbauer G, Meier G, Scheibler B (1985) Effect of hypoxanthine-3(N)-oxide and
1676 hypoxanthine-1(N)-oxide on central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbus*
1677 *ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. *J Che Ecol.*
1678 11:507-523.

- 1679 Queirós AM, Fernandes JA, Faulwetter S, Nunes J, Rastrick SPS, Mieszkowska N, et al. (2014)
1680 Scaling up experimental ocean acidification and warming research: from individuals to the
1681 ecosystem. *Glob Chang Biol.* 21(1), 130-143.
- 1682 Rosa R, Seibel BA (2008) Synergistic effects of climate-related variables suggest future
1683 physiological impairment in a top oceanic predator. *PNAS.* 105(52), 20776-20780.
- 1684 Schalkhauser B, Bock C, Pörtner HO, Lannig G (2014) Escape performance of temperate king
1685 scallop, *Pecten maximus* under ocean warming and acidification. *Mar Biol.* 161, 2819-2829.
- 1686 Tomida L, Lee JT, Barreto RE (2012) Stomach fullness modulates a visually-based prey-size
1687 choice in a predator fish, frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Zoology* 115, 283-288.
- 1688 Walberg E, Fisher S (2011) Effect of increased water temperature on warm water fish feeding
1689 behavior and habitat use. *JUR at Minnesota State University.* 11(1), 13.
- 1690
- 1691
- 1692
- 1693
- 1694
- 1695