

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 25/02/2015.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Centro de Aquicultura da UNESP- CAUNESP



**AMBIENTE DE TANQUE-REDE AUMENTA AS INTERAÇÕES AGRESSIVAS
E O ESTRESSE SOCIAL NA TILÁPIA-DO-NILO**

Aluna: Camila Nomura Pereira Boscolo

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Gonçalves de Freitas

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em aquicultura.



JABOTICABAL

2014

Ao meu filho Pedro Henrique que veio para iluminar nossa família e encher meu
coração de amor e alegria, e ao meu marido Thiago pelo incondicional apoio e
amor

Dedico este trabalho

Agradecimentos

À Prof. Dr. Eliane Gonçalves de Freitas pela confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho. Obrigada pelos exemplos que sempre tem me dado sobre a sua forma de fazer ciência, cimentando em mim uma verdadeira admiração pelo seu trabalho.

Aos membros da banca de qualificação Dr. Diogo Teruo Hashimoto e Dr. Luiz Henrique Florindo pelas sugestões dadas a esse manuscrito.

Aos membros da banca de defesa, Dr. Fabiana Garcia, Dr. Luciane G. Batalhão, Dr. Marisa Fernandes de Castilho, e Dr. Thaís B. Carvalho pelas sugestões dadas a este trabalho que contribuiu muito para o seu crescimento.

À minha família, em especial, aos meus pais Allan e Nina que sempre me apoiaram e sempre me incentivaram. Pais, vocês sempre serão meus exemplos de humildade, bondade e caráter.

Aos meus irmãos Flávia e Henrique mesmo distante, mas, sempre pensando na “irmãzinha”.

Aos meus pontinhos de alegria Marcelo e Gabriela por iluminar a nossa família.

À minha sogra Odete Scremin pelo carinho, apoio e ajuda de sempre.

Ao meu marido Thiago Scremin Pereira por toda a ajuda na coleta e análise de dados e também por sempre me incentivar e me fazer feliz! Além de meu amigo é meu amado e sempre companheiro. Obrigada pela família maravilhosa que temos! Amo você.

Ao meu pequeno sábio filhote Pedro Henrique que durante a realização do doutorado conviveu com os animais do laboratório, suportou as análises estatísticas e todas as análises que foram feitas no experimento. Filho, sua pequena sabedoria me inspira pra vida toda, pois, me mostra que as coisas simples da vida sempre nos fazem felizes.

Aos meus amores Fiona e Serena por me alegrarem sempre e por terem feito grande parte da minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos do Laboratório de Comportamento Animal por toda ajuda na coleta de dados e pela companhia agradável: Ana Gauy, Ana Paula Montedor, Felipe Dorigão, Gisele Colognesi, Juliana Santos, Ludmilla Falsarella, Manuela Brandão, Nayara Almeida.

Gostaria de agradecer em especial à Ana Paula Montedor pela ajuda nas análises de glicogênio hepático e pela amizade, e à Gisele Colognesi pela ajuda na quantificação do tempo de interação com o substrato e pela amizade. Sem a ajuda de vocês teria sido tudo mais difícil.

À amiga e técnica de laboratório Roselene Costa Ferreira por todo auxílio prestado nas coletas, pela amizade verdadeira e por sempre me mostrar que devemos agir com muito amor. Rose, você é meu exemplo de pessoa serena, amorosa e sempre justa, por isso, sempre me espelho em você.

Ao Carlos Eduardo de Souza pela ajuda na manutenção dos animais.

Ao grande amigo, Julian David Alvarado Castillo pela amizade, companheirismo e pelos momentos agradáveis e muito engraçados. Mesmo distante a amizade nunca termina.

À Prof. Dr. Renata Guimarães Moreira do Laboratório de Metabolismo e Reprodução Peixes –USP pela colaboração nas análises dos esteroides

À Prof. Dr. Elisabeth Criscuolo Urbinati, CAUNESP, pela colaboração nas análises de glicogênio hepático.

Ao Rodrigo Gimbo e a Gisele Fávero do Laboratório de Fisiologia do FCVA UNESP, por toda ajuda prestada nas análises de glicogênio hepático.

Aos colegas, docentes e funcionários do CAUNESP, pela boa convivência e pelos ensinamentos transmitidos durante esses anos.

À Fundação de Amparo de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado durante 22 meses (Proc.2011/18530-0).

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

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPQ (Bolsa de doutorado)
Fundação de Amparo à pesquisa FAPESP (Bolsa de doutorado PROC. 2011-18530-0).

A tese se encontra no formato de artigo e será submetida como *full paper* à revista *Aquaculture* ou *Applied Animal Behavior Science*.

RESUMO

A posição social (dominância ou submissão) na tilápia-do-nilo é sinalizada por meio de informações visuais, sonoras e químicas. Tais sinalizações podem ser reduzidas em ambiente de tanque-rede, onde a elevada taxa de renovação de água pode “diluir” as informações químicas. Além disso, os tanques-rede não possuem substrato removível, que também atua como um redutor das interações agressivas para a tilápia-do-nilo. Assim, testamos a hipótese de que a ausência concomitante de sinalizadores da posição social em ambiente de tanque-rede aumenta as interações agressivas e, consequentemente o estresse social em peixes territoriais. Grupos de três machos de tilápia-do-nilo (GIFT) foram mantidos em aquários contendo redes (imitando tanques-rede) e foram testados em cinco tratamentos: 1. Com substrato/sem renovação de água (Controle 1). 2. Com substrato/sem renovação de água - sem rede (Controle 2). 3. Com substrato/com renovação de água. 4. Sem substrato/com renovação de água. 5. Sem substrato/sem renovação de água. Os animais foram agrupados por dois dias, nos quais foi registrada (15 min/dia) a frequência de interações agressivas. Avaliamos a estabilidade social por meio das reversões na posição social (*rank*) dos indivíduos e dos níveis de Testosterona (T) e 11-cetotestosterona (KT). Utilizamos cortisol e glicogênio hepático como indicador de estresse. A frequência de interações agressivas e os níveis de cortisol foram maiores nos tratamentos sem substrato removível. Além disso, observamos que houve maior reversão do *rank* nos tratamentos com renovação de água. Os níveis de testosterona foram mais elevados nos tratamentos sem substrato removível. Já a KT foi maior nos tratamentos sem prejuízo dos sinais sociais. Assim, concluímos que a ausência de indicadores da posição social decorrente do ambiente do tanque-rede aumenta as interações agressivas e o estresse social na tilápia-do-nilo. Além disso, observamos que os indicadores da posição social possuem diferentes papéis, ou seja, o substrato é associado à agressividade e ao estresse social, enquanto que a renovação de água é associada à estabilidade social. Apesar desses fatores em conjunto (ausência de substrato + renovação de água) não exacerbarem as interações agressivas a ausência de apenas um desses sinais é suficiente para reduzir o bem-estar da tilápia-do-nilo cultivada em tanques-rede.

Palavras chave: substrato, *Oreochromis*, renovação de água, comunicação química, andrógenos, cortisol.

ABSTRACT

The social position (dominance or submission) in Nile tilapia is signalized through visual sound, and chemical information. Such signals can be reduced in cages, where the high rate of water renewal may "dilute" the chemical information environment. In addition, the cages do not have removable substrate, which also acts as a reducing of aggressive interactions for Nile tilapia. Thus, we tested the hypothesis that the concomitant absence of signals of social position in cages environment increases aggressive interactions and consequently the social stress in territorial fish. Groups of three male Nile tilapia (GIFT) were maintained in aquaria containing networks (imitating cages) and were tested in five treatments: 1. Substrate presence / without water renewal (Control 1). 2. Substrate presence / without water renewal - no network (Control 2). 3. Substrate presence/ plus water renewal. 4. Substrate absence / plus water renewal. 5. Substrate absence / without water renewal. The animals were grouped by two days, during which it was recorded (15 min / day) the frequency of aggressive interactions. We assess the social stability by means of reversals in social position (rank) of individuals and levels of Testosterone (T) and 11 - ketotestosterone (KT). We use cortisol and liver glycogen as an indicator of stress. The frequency of aggressive interactions and cortisol levels were higher in the treatments without removable substrate. Moreover, we observed that there was a higher rank reversal of the treatments with water renewal. Testosterone levels were higher in the treatments without removable substrate. KT was higher in treatments without damage to social cues. Thus, we conclude that the absence of indicators of social position arising from the cages environment increases aggressive interactions and social stress in Nile tilapia. Furthermore, we observed that the indicators of social position have different roles, in other words, the substrate is associated with aggression and social stress, while the water renewal is associated with social stability. Despite these factors simultaneous (substrate absence + water renewal) not exacerbate aggressive interactions, the absence of one of the two signals is sufficient to impair the welfare of Nile tilapia cultured in cages.

Keywords: substrate, *Oreochromis*, water renewal, chemical communication, androgens, cortisol.

1. INTRODUÇÃO

As práticas de manejo utilizadas na piscicultura, como altas densidades de estocagem, transporte, biometrias e classificação de animais por similaridade de tamanho geralmente provocam estresse nos peixes (*e.g.* Pickering *et al.*, 1982; Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Outra fonte de estresse bastante comum na piscicultura é aquele causado por interações sociais em peixes, como ocorre em ciclídeos (Earley *et al.*, 2006) e salmonídeos (Pottinger e Pickering, 1992, Sloman *et al.*, 2000). Nessas interações, os peixes interagem agressivamente durante o estabelecimento da hierarquia de dominância (*e.g.* Enquist e Jakobsson, 1986; Turner e Huntingford, 1986), e os animais que ganham a luta (dominantes) têm prioridade sobre os perdedores (subordinados) ao acesso a recursos do ambiente, tais como alimentos, parceiros para acasalamento, abrigo e território (Huntingford e Turner 1987; Johnsson *et al.*, 2006, Bogdan *et al.*, 2012). Em condições naturais, as lutas inicialmente podem ser intensas e demandar elevado custo para os animais envolvidos, mas após o estabelecimento da hierarquia, as interações agressivas são reduzidas, prevalecendo exibições (*displays*) que são comportamentos de baixa intensidade agressiva e baixo custo energético (*e.g.* Haller e Wittemberger, 1988; Chellapa *et al.*, 1989; Johnsson *et al.*, 2006).

As exibições são comportamentos realizados pelos ciclídeos e que auxiliam no reconhecimento da posição social sem a necessidade de lutas constantes (Johnsson *et al.*, 2000). Além das exibições, a posição social entre os indivíduos também pode ser sinalizada pelo tamanho corporal (Boscolo *et al.*, 2011) por diferenças na coloração do corpo (Keenleyside e Yamamoto 1962; O'Connor *et al.*, 1999), cor dos olhos (Volpato *et al.*, 2003), comunicação química (Giaquinto e Volpato, 1997; Almeida *et al.*, 2005; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008) e som (Amorim *et al.*, 2003, Longrie *et al.*, 2013). Assim, essas sinalizações são fundamentais para manter a posição social e reduzir confrontos físicos diretos entre os indivíduos (Beeching, 1992). O reconhecimento da posição social também é essencial para reduzir o gasto energético e as possibilidades de injúrias decorrentes dos ataques (Neat *et al.*, 1998; Sloman *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2006) e o estresse decorrente dessas interações (Johnson *et al.*, 2006). Dessa forma, as sinalizações da posição social são mecanismos que podem reduzir o estresse social em peixes (*e.g.* Boscolo *et al.*, 2011).

Embora as sinalizações sejam fundamentais para reduzir o estresse, algumas condições podem diminuir ou impedir a completa sinalização da posição social e assim,

aumentar as interações agressivas em peixes (e.g. Boscolo *et al.*, 2011). Isso pode acontecer, por exemplo, em sistemas de produção em tanques-rede, o qual possui um ambiente que pode prejudicar as interações sociais. Nesse sistema, os animais são agrupados em altas densidades de estocagem em gaiolas que permanecem suspensas em reservatórios ou rios (Garcia *et al.*, 2013). Devido ao grande número de animais agrupados, esse sistema requer renovação contínua de água para evitar a formação de compostos nitrogenados que reduzem a saúde e o crescimento dos peixes (Schmittou, 1993). No entanto, espécies que utilizam a comunicação química para sinalizar a posição social teriam a sinalização social reduzida, já que a elevada taxa de renovação de água em tanques-rede pode “diluir” a informação química no ambiente e provocar elevação das interações agressivas (e.g. Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008).

Dentre as espécies que utilizam comunicação química para sinalizar a posição social, algumas são de interesse para a aquicultura. A tilápia mossâmbica (*Oreochromis mossambicus*), por exemplo, é um ciclídeo que libera urina como forma de sinalização social (Almeida *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2007). De acordo com esses autores, a liberação de substâncias químicas na urina é fundamental para manter a posição social e, conseqüentemente, reduzir as chances de interações agressivas. Outro exemplo é a tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, uma das espécies mais cultivada em tanques-rede no mundo (FAO, 2012). A tilápia-do-nilo, como todo ciclídeo, é um peixe territorial que apresenta hierarquia de dominância definida por meio de interações agressivas (Lowe-McConnell, 1958) e comunica a sua posição social, em parte, através de comunicação química (Giaquinto e Volpato, 1997; Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008). De acordo com Gonçalves-de-Freitas *et al.* (2008) a renovação da água aumenta os ataques emitidos pelo peixe subordinado na tilápia-do-nilo, indicando que substâncias químicas presentes na água atuam no reconhecimento da posição social e que a ausência dessas substâncias desestabilizam a hierarquia social. Assim, a diluição dos sinais químicos no ambiente causado pela renovação da água em tanques-rede pode prejudicar o reconhecimento da posição social entre os indivíduos, o que levaria ao aumento das interações agressivas, à instabilidade social (reversões na posição social) (Oliveira e Almada, 1996) e aumento nos níveis de estresse social (estresse causado pelas interações agressivas) (Fox *et al.*, 1997).

Outra característica do tanque-rede que pode prejudicar o reconhecimento da posição social e aumentar os confrontos físicos diretos entre os indivíduos é a ausência de substrato removível (cascalho, areia, pedras) o qual pode ter diversas funções de acordo

com a espécie. Os ciclídeos, por exemplo, utilizam o substrato para se alimentar e para construir ninhos durante a estação de desova (Fryer e Iles, 1972). O macho da tilápia-do-nilo, por exemplo, defende território no substrato, onde os ninhos são construídos e disputados por meio de interações agressivas (Gonçalves-de-Freitas e Nishida, 1998; Mendonça e Gonçalves-de-Freitas, 2008; Mendonça *et al.*, 2010). Assim, a presença de substrato removível pode diminuir o tempo e a energia disponível para as interações agressivas com seus coespecíficos. De acordo com Mendonça (2006), a tilápia-do-nilo pode aumentar a frequência de interações agressivas quando privadas de construir ninhos, indicando que o substrato removível pode funcionar como regulador de agressividade nesta espécie. Além disso, a ausência do substrato removível pode causar instabilidade da hierarquia social, como ocorre em *O. mossambicus* (Galhardo *et al.*, 2008; Galhardo *et al.*, 2009). Como o sistema de produção em tanques-rede, assim como outros sistemas de produção intensivos, não possuem substrato removível, essa condição poderia atuar como um fator adicional no aumento das interações agressivas e do estresse social em peixes sociais.

Além do aumento das interações agressivas e da instabilidade social, espera-se que em condições nas quais os sinais sociais são prejudicados, os níveis de andrógenos devem ser mais elevados. A constante renovação de água e ausência de substrato removível prejudica o reconhecimento da posição social (Gonçalves-de-Freitas *et al.*, 2008), provocando aumento das interações agressivas e consequentemente aumento dos níveis de andrógenos. Além disso, estudos recentes tem demonstrado que os níveis de esteroides sexuais, incluindo andrógenos, são influenciados pelo ambiente social (Creel *et al.*, 2013). De acordo com Sloman *et al.*, (2006) os andrógenos tem mostrado influência na agressão em diversos estudos (*e.g.* Oliveira *et al.*, 2001). Assim, as interações agressivas em peixes são seguidas por elevação dos níveis de andrógenos (testosterona e 11-cetotestosterona), sendo que os dominantes apresentam níveis mais elevados do que os submissos (Oliveira e Gonçalves, 2008). De acordo com Wingfield *et al.* (1990), essa mudança nos níveis hormonais reforça a dominância e, em casos onde as interações são mais intensas, os níveis hormonais são mais elevados. Além disso, a diferença entre os níveis de andrógenos entre dominantes e submissos são evidentes após o estabelecimento da hierarquia (Wingfield, 2005). Em condições nas quais os sinais sociais são prejudicados, os níveis de andrógenos dos animais são mais elevados. Dessa forma, é possível que a presença do substrato removível e a renovação de água afetem a intensidade do desafio social, provocando mudanças hormonais, como previsto

na “hipótese do desafio” (Wingfield, 1990). Esta hipótese prediz que os andrógenos podem estar presentes na circulação sanguínea em três níveis: (1) nível homeostático, sendo a secreção dos andrógenos em nível basal; (2) basal reprodutivo, aumento dos andrógenos suficiente para a reprodução; (3) nível fisiológico máximo, resposta a um estímulo ambiental, como interações agressivas (Wingfield *et al.*, 1990). Assim, como o desafio social aumenta os níveis de andrógenos em vertebrados (Wingfield *et al.*, 1990), é possível que o prejuízo nos sinais sociais aumente as interações agressivas e consequentemente aumenta os níveis de andrógenos. Essa relação entre hormônios e comportamento é bi-direcional, ou seja, assim como os hormônios modulam o comportamento agressivo dos peixes, o comportamento agressivo modula os níveis hormonais (Oliveira *et al.*, 1996).

Uma vez que os indicadores da posição social são importantes elementos na redução das interações agressivas em espécies sociais, testamos a hipótese de que a ausência concomitante de sinalizadores da posição social em ambiente de tanque-rede aumenta o estresse social e os níveis de andrógenos em peixes territoriais por meio do aumento das interações agressivas e da instabilidade social. O **objetivo** deste estudo foi, portanto, testar o efeito da renovação de água e da ausência de substrato removível sobre as interações agressivas, instabilidade social, estresse social e os níveis de andrógenos na tilápia-do-nilo. A importância deste estudo é demonstrar como um conjunto de fatores atuando simultaneamente (ausência de substrato + renovação água) pode prejudicar o bem-estar em peixes sociais. Além disso, este estudo é o primeiro a investigar o efeito do ambiente de tanque-rede sobre a liberação de andrógenos (variável que pode ser associada a efeitos da instabilidade social).

De acordo com Oliveira e Galhardo (2007), há uma crescente preocupação com o bem-estar animal, e, nas últimas décadas os estudos nessa área centram-se em aves e mamíferos, porém, há um aumento de pesquisas que se preocupam com o bem-estar de peixes (*e.g.* Huntingford *et al.*, 2006). De acordo com Pedrazzani *et al.* (2007), o comportamento do consumidor é dinâmico ao longo do tempo, e, podemos prever que, da mesma forma que acontece com os outros animais, o consumidor começará a fazer considerações sobre o bem-estar dos peixes. Segundo Conte (2004), a interação social entre os peixes cultivados em ambiente de produção tem implicações sobre o bem-estar. Dessa forma, pesquisas que avaliem as interações sociais de animais de produção são importantes para compreender o comportamento nesse ambiente e sugerir alternativas para melhorar o bem-estar. Além disso, as informações obtidas neste estudo são

importantes para modelar normas de boas práticas de manejo, linhas de orientação e legislação acerca de como os peixes devem ser manejados em cativeiro. Assim, como o bem-estar de peixes vem sendo considerado sob vários aspectos (*e.g.* Huntingford *et al.*, 2006; Volpato *et al.*, 2007) todas as informações sobre o comportamento dos animais utilizados na piscicultura são importantes para propor técnicas mais adequadas de manejo (Huntingford *et al.*, 2006). Dessa forma, o efeito das interações sociais sobre o bem-estar ainda é um fator importante a ser investigado na piscicultura (Adams *et al.*, 2007; Brännäs e Johnsson, 2008).

7. CONCLUSÕES

1. A ausência de indicadores da posição social (substrato removível e comunicação química) decorrente do ambiente do tanque-rede aumenta a agressividade e o estresse social na tilápia-do-nilo.
2. O substrato removível é associado ao estresse social e à agressividade, enquanto que a renovação de água é associada à estabilidade social.
3. A testosterona parece envolvida no controle do comportamento agressivo e a KT ligada à estabilidade social e a presença de substrato.
4. Apesar desses fatores somados (ausência de substrato + renovação de água) não exacerbarem a agressividade, a ausência de apenas um desses sinais é suficiente para prejudicar o bem-estar da tilápia-do-nilo cultivada em tanques-rede.