

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**“MONITORAMENTO DAS VARIÁVEIS PLASMÁTICAS E  
SOROLÓGICAS DO SANGUE DE TILAPIA DO NILO, DURANTE 24 HORAS”**

**DIANA MEIRA DE ALMEIDA**

**Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo  
Novembro - 2016**

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**“MONITORAMENTO DAS VARIÁVEIS PLASMÁTICAS E  
SOROLÓGICAS DO SANGUE DE TILAPIA DO NILO, DURANTE 24 HORAS”**

**DIANA MEIRA DE ALMEIDA**

**Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva**

**:**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**  
**Novembro - 2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

A447e

Almeida, Diana Meira de

Monitoramento das variáveis plasmáticas e sorológicas do sangue de Tilápia do Nilo, durante 24 horas. / Diana Meira Almeida. – São Paulo, 2016  
vii, 43f. ; gráf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani-Paiva.

1. Peixe. 2. Estresse. 3. Ciclo circadiano. 4. Manejo. I. Ranzani-Paiva, Maria José Tavares. II. Título.

CDD 639.3



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**"MONITORAMENTO DAS VARIÁVEIS PLASMÁTICAS E SOROLÓGICAS  
DO SANGUE DE TILÁPIA DO NILO, DURANTE 24 HORAS"**

**AUTOR: DIANA MEIRA ALMEIDA**

**ORIENTADOR: Maria José Tavares Ranzani de Paiva**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de  
**MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA**, Área de Concentração em  
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. ANTENOR AGUIAR SANTOS

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. CLÁUDIA MARIS FERREIRA

Data da realização: 18 de novembro de 2016

\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Prof. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA

## EPÍGRAFE

“Aquele que habita no esconderijo do  
Altíssimo, à sombra do Onipotente  
descansará”.

Salmos 91

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha avó Alba (**In memoriam**), por sempre ter acreditado em mim, ter alimentado os meus sonhos e acreditado neles.

Com todo o meu amor,

Saudade!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre ter me dado forças pra chegar até aqui, minha família que por tantas vezes ter me dado alegria e esperança, minha mãe Valeria e ao meu marido Roberto, que me incentivaram, aos meus filhos que amo tanto, Henry e Maysa.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria José Tavares Ranzani-Paiva, pela força de vontade, pelos ensinamentos, por ter acreditado em mim e pela autonomia que pude ter para efetuar o experimento e suas análises.

Aos pesquisadores Dr<sup>a</sup> Danielle de Carla Dias, Dr Carlos Massatoshi Ishikawa, Dr Leonardo Tachibana pelos conselhos, apoio, confiança e colaboração para esse trabalho acontecer.

À Dr<sup>a</sup> Maria Letizia Petesse (Instituto de Pesca), por ter ajudado na construção do trabalho, auxílio na análise estatística dos dados e por seus conselhos.

À Dr<sup>a</sup> Renata Guimarães, pela oportunidade e paciência em transmitir seus conhecimentos.

Ao Instituto de Pesca – APTA/SAA-SP e ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca pela oportunidade da realização da pós-graduação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do auxílio financeiro (2014/17967-4).

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) e ao chefe da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, Dr. Fábio Rosa Sussel, por permitir utilizar a infraestrutura necessária para realização deste projeto e pelo apoio. Por todos dessa unidade, em especial, Jair Donizetti Mazzafero e Cláudio Cirineu Ciola, que colaboraram com a realização desse sonho que se tornou real.

À banca examinadora Dr<sup>a</sup> Maria Letizia Petesse, Dr<sup>a</sup> Claudia Maris Ferreira, Dr Antenor Santos e Dr Uriel Rodriguez pelos conselhos e sugestões no Exame de Qualificação.

Ao técnico, Felipe de Araújo e ao estagiário Matheus Guimarães por ter colaborado inúmeras vezes.

Aos que colaboraram para que o experimento acontecesse, André Conrado, Soliris Castilho, Uriel Rodriguez Estrada, entre outras pessoas.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos, Rafael Guedes, Micheli Junco Guedes, Elvis Nascimento Rodrigues, Ligia Padilha Rodrigues, Ana Paula Farias e Evaldo Santana.

Ao meu primo, Caio Meira Coimbra, por ter me escutado falar sobre o assunto muitas vezes.

O meu mais sincero obrigada!

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Agradecimentos  | i  |
| Sumário   | ii |
| Resumo  | iv |
| Abstract  | v  |
| Introdução geral  | 1  |
| Referências bibliográficas  | 8  |
| Apresentação da Dissertação   | 13 |
| CAPITULO 1 – “Monitoramento das variáveis plasmáticas, sorológicas<br>do sangue de tilápia do Nilo, durante 24 horas” | 14 |
| Resumo  | 15 |
| Abstract  | 16 |
| Introdução  | 17 |
| Material e Métodos  | 21 |
| Resultados  | 23 |
| Discussão   | 30 |
| Conclusão   | 35 |
| Referências bibliográficas  | 37 |

## Resumo

A tilápia é uma das espécies comercialmente mais importantes para aquicultura devido ao crescimento rápido, rusticidade, boa conversão alimentar, adaptabilidade aos diferentes sistemas de criação e boa aceitação pelo mercado consumidor. A deficiência em qualquer aspecto do manejo causa situações de estresse resultando em baixa eficiência do sistema imunológico, redução da sobrevivência, do crescimento e da capacidade reprodutiva. Por outro lado, os organismos respondem, também, a determinados ritmos biológicos, como os circadianos, aos quais os animais se adaptam naturalmente. Devido à importância dos efeitos do estresse e do ciclo circadiano no cultivo de peixes, com este trabalho pretendeu-se monitorar as variáveis plasmáticas (lactato e proteínas totais), sorológicas (cortisol e colesterol) e do sangue total (glicose) em tilápia do Nilo no ciclo de 24 horas. Para o experimento foi utilizada uma bateria de 49 aquários com 5 indivíduos cada. Todos eles sofreram, no início do experimento, o mesmo estresse de captura e manipulação. Em seguida, as amostras de sangue dos indivíduos de cada aquário foram sequencialmente retiradas com intervalos de 30 minutos até completar as 24h de observação. Somente os indivíduos do primeiro aquário tiveram a amostra de sangue retirada após 15 minutos da aplicação do estresse. Para visualizar o andamento semi-horário das variáveis medidas, gráficos circulares foram elaborados. A ausência de diferenças significativas entre as variáveis medidas e as fases do ciclo circadiano (intervalos luz-escuro e manhã-tarde-noite-madrugada), foi verificada através dos testes de hipótese de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis respectivamente. Os resultados obtidos permitiram concluir que as variáveis: cortisol, glicose, lactato e proteínas não são afetadas pelo ciclo circadiano nem pelo efeito do estresse de manejo. A diferença entre os períodos de luz e escuro não foi significativa e a intensidade e frequência dos picos observados não foram prejudiciais para os indivíduos. Somente o colesterol mostrou relação com o ciclo circadiano de 12/12h (luz-escuro) apresentando valores maiores no período de luz. Isto pode estar relacionado com o fato de que os peixes não foram alimentados durante o experimento.

Palavras-chave: Peixe, Estresse, Ciclo circadiano, Manejo.

## Abstract

Tilapia is one of the most commercially important species for aquaculture due to rapid growth, rusticity, good feed conversion, adaptability to different breeding systems and good acceptance by the consumer market. Deficiency in any aspect of management causes stresses resulting in poor immune system efficiency, reduced survival, growth and reproductive capacity. On the other hand, organisms also respond to certain biological rhythms, such as circadians, to which animals naturally adapt. Due to the importance of the effects of stress and the circadian cycle in fish culture, this work was intended to monitor the plasma (lactate and total proteins), serological (cortisol and cholesterol) and total blood (glucose) variables in Nile tilapia in the 24 hour cycle. For the experiment, a battery of 49 aquariums with 5 individuals each was used. All of them suffered, at the beginning of the experiment, the same stress of capture and manipulation. Then the blood samples of individuals from each aquarium were sequentially removed at 30-minute intervals until completion of 24 h observation. Only individuals from the first aquarium had the blood sample withdrawn after 15 minutes of stress application. In order to visualize the semi-clockwise movement of the measured variables, circular charts were elaborated. The absence of significant differences between the measured variables and the phases of the circadian cycle (light-dark intervals and morning-afternoon-night-dawn) was verified through the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis hypothesis tests, respectively. From the observes results we concluded that the variables cortisol, glucose, lactate and proteins are not affected by the circadian cycle nor by the effect of management stress. The difference between light and dark periods was not significant and the intensity and frequency of the observed peaks were not detrimental to the individuals. Only cholesterol showed a relation with the circadian cycle of 12/12h (dark light), presenting higher values in the light period. This may be related to the fact that the fish were not fed during the experiment.

Key words: Fish, Stress, Circadian cycle, Management.

## **Introdução geral**

O Brasil tem um grande potencial para a produção de pescado, pois além da abundância em água, conta com condições climáticas favoráveis para a criação de peixes de água-doce (PAVANELLI *et al.*, 2002).

Na última década a aquicultura passou por um intenso processo de desenvolvimento. No Brasil, a atividade cresceu 56% nos últimos 12 anos e tem se firmado cada vez mais em decorrência dos recursos hídricos disponíveis, clima favorável, mão de obra relativamente barata e crescente mercado interno, além de possuir cerca de 5,5 milhões de hectares de água, aproximadamente 208 reservatórios potenciais para a atividade e uma costa marítima de 8.000 km (BUENO, 2015). Nesta década (MPA, 2010), o país chegou ao sexto lugar como produtor de tilápia cultivada no mundo e a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) representou aproximadamente 47% da produção total de pescados em aquicultura de água doce.

A tilápia do Nilo é considerada uma espécie exótica por ser procedente da África e foi introduzida inicialmente no Brasil pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) em 1971.

*Oreochromis niloticus*, apresenta ótima adaptação às condições pluviais e climáticas do nosso país, mostrando rápida taxa de crescimento, adaptabilidade aos diferentes sistemas de criação e boa aceitação pelo mercado consumidor (MELLO, 2012). Entre as espécies com interesse potencial para aquicultura, a tilápia do Nilo, (APPLEYARD *et al.*, 2001) destaca-se, também, por apresentar crescimento rápido, rusticidade (HAYASHI *et al.*, 1999), boa conversão alimentar e carne com características sensoriais desejáveis, sendo os filés sem espinhos intramusculares, o que facilita sua comercialização nos mercados interno e externo (SCHWARZ *et al.*, 2010). Além destas características, esta espécie apresenta elevado valor comercial e custos de produção relativamente baixos (MORAES *et al.*, 2009).

Para LOVSHIN (1997), a disseminação destes peixes pelo mundo, foi inicialmente, promovida com o objetivo de subsistência em países em desenvolvimento.

Para a aquicultura, a sua viabilidade se ampara em razão do desenvolvimento de tecnologias e manejo apropriados (TEIXEIRA, 1991). O manejo adequado, em particular, se torna fundamental para o sucesso da

aquicultura e consiste no monitoramento de aspectos como: qualidade da água, alimentação, densidade de estocagem e sanidade. O controle adequado destes aspectos tem como finalidade proporcionar o bem-estar dos peixes no cultivo assim que possam expressar seu melhor potencial de crescimento (OLIVEIRA e GALHARDO, 2007).

Entretanto, a variabilidade das condições no ambiente de cultivo como, por exemplo, queda de temperatura, chuvas e outros fatores da natureza podem alterar o equilíbrio do animal podendo levá-lo a morte. Também as intervenções no sistema de cultivo como, por exemplo, a técnica de captura, as manipulações dos peixes para biometria e o transporte podem alterar a homeostasia dos indivíduos (INOUE *et al.*, 2004).

Segundo WENDEELAR-BONGA (1997) o estresse pode ser definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, é ameaçado ou perturbado em decorrência da ação de estímulos intrínsecos denominados estressores.

As respostas ao estresse correspondem a uma série de alterações fisiológicas sendo divididas em três categorias: primária, secundária e terciária. As primárias são hormonais, as secundárias comportam mudanças nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos apresentando alterações na glicemia, no ácido láctico, no glicogênio hepático e muscular, além dos efeitos hidrominerais, como alterações na concentração plasmática de cloro, sódio, potássio, proteínas e na osmolaridade do plasma (ADAMANTE, 2005). Finalmente, as terciárias, são relacionadas ao comprometimento do crescimento, mudanças no comportamento e aumento da susceptibilidade a doenças (MAZEAUD *et al.*, 1977).

Segundo IWAMA (1993) o estresse ocorre de duas maneiras, sendo importante diferenciá-las: o estresse agudo e o estresse crônico. O primeiro geralmente acontece durante o manejo dos animais, como no transporte ou durante a realização de biometrias. O segundo tipo de estresse é o crônico, que ocorre quando os peixes são permanentemente estressados, por agentes estressores de natureza química, como pH incorreto, baixo nível de oxigênio dissolvido na água, concentração elevada de amônia (MORAES *et al.*, 2004), poluentes orgânicos e inorgânicos (CARVALHO e FERNANDES, 2006) ou de natureza física, como alta densidade populacional, confinamento e captura

(COSTA *et al.*, 2004). Nestas condições as consequências geralmente são: redução do crescimento, ganho ou perda de peso e queda da resistência a patógenos devido à resposta imunológica deprimida.

O aspecto central da adaptação ao estresse é a realocação de energia para longe das atividades de alta demanda energética, como crescimento e reprodução e em direção a atividades que requerem intensificação para restaurar a homeostase, tais como respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos. Tal dinâmica pode reduzir consideravelmente a capacidade de desempenho do peixe tanto durante a fase de restabelecimento frente a um estresse agudo quanto no estresse crônico (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Quando a homeostasia está ameaçada por um estímulo potencialmente nocivo (estressor), observa-se alguns ajustes fisiológicos comuns aos vertebrados para lidar com essa situação e restaurar total ou parcialmente as condições iniciais. Por exemplo, um estressor pode aumentar a atividade do sistema nervoso autônomo simpático, culminando com o aumento dos níveis das catecolaminas e rápidos ajustes cardiorrespiratórios. Persistindo os efeitos do estressor, é comum observar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (tecido inter-renal em peixes) levando ao aumento dos níveis de glicocorticóides, como o cortisol (BARRETO *et al.*, 2010).

O estresse envolvido com a despesca e o confinamento dos peixes durante a depuração e transporte promove elevação de cortisol no sangue dos animais. O cortisol é um hormônio que aumenta a permeabilidade das membranas branquiais o que, nos peixes de água doce, resulta em excessiva entrada de água e perda de minerais, principalmente sódio e cloreto através das brânquias, levando o peixe ao desequilíbrio osmorregulatório (GIBSON e MATHIS, 2006).

O cortisol é amplamente reconhecido e utilizado para caracterizar a resposta primária (NOLAN *et al.*, 1999). Imediatamente após a percepção do estímulo adverso pelo sistema nervoso central, catecolaminas e cortisol são liberados na corrente sanguínea. Nestas condições, o cortisol é o principal mediador dos mecanismos bioquímicos para disponibilizar energia adicional ao organismo em condições adversas (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Se um animal está submetido a estresse intenso e constante, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, acarretando danos permanentes à sua saúde e bem-estar (CARMICHAEL, 1984).

Dentre os indicadores de estresse animal, o cortisol plasmático/sorológico é o indicador mais largamente utilizado em peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento (WENDEELAR-BONGA, 1997).

A liberação do cortisol tem como consequência alterações que incluem hiperglicemia, depleção das reservas glicogênicas, lipólises e inibição da síntese protéica. Um aumento do catabolismo de proteínas musculares e alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres, colesterol podem também ocorrer. Dessa forma, quando o peixe é exposto a agentes estressores uma série de repostas é iniciada, sendo que se o estresse é severo ou duradouro, os níveis mais altos da organização biológica ficam afetados (OBA *et al.*, 2006).

O cortisol apresenta função glicocorticóide, que irá estimular a glicogenólise e a gliconeogênese hepática e dessa forma, a glicose será indicador de estresse de resposta secundária, e os níveis basais de peixes teleósteos podem ser facilmente detectados (SILVA *et al.*, 2009) para diagnosticar a ocorrência de estresse fisiológico (WEDEMEYER *et al.*, 1990).

Pode-se dizer também que a hiperglicemia resultante do estresse, relatada em vários teleósteos (BARTON e IWAMA, 1991), é mediada principalmente por ação das catecolaminas e da liberação de glicose hepática e/ou mobilização de ácidos graxos livres, também por ação das catecolaminas (PICKERING, 1998).

O lactato também é um bom indicador de estresse porque indica o acúmulo de ácido láctico decorrente do esforço físico à medida que os animais são expostos a agentes estressores (PICKERING, 1993).

Os picos de colesterol, ao contrário, são atribuídos ao consumo de pregnenolona, precursora de cortisol, que por sua vez, estaria promovendo alterações metabólicas (OBA *et al.* (2009)

Finalmente, as alterações nas concentrações de proteínas totais estão relacionadas ao aumento de cortisol que resulta no aumento da gliconeogênese e da atividade do catabolismo das proteínas (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Cabe destacar que as causas do estresse em peixes são praticamente inevitáveis quando se trata do manejo rotineiro e por razões operacionais intrínsecas a atividade de cultivo (CARNEIRO e URBINATI, 1999).

Por outro lado, além de estresse não periódicos ou irregulares relacionados com a atividade de cultivo, os organismos respondem, também, a determinados ritmos biológicos. Estes são definidos como qualquer evento que se repete de maneira regular em um organismo. Os ritmos mais estudados são aqueles relacionados às mudanças ambientais, como os eventos cíclicos (exemplo: luz-escuro) presentes num determinado ambiente aos quais o animal deve se adaptar (MORGAN, 2004).

Os ciclos geofísicos criados pelos movimentos da terra são responsáveis por recorrentes ciclos periódicos vivenciados pelos organismos vivos. Sob tais ciclos, os animais têm desenvolvido comportamentos e mecanismos fisiológicos para antecipar previsíveis mudanças no ambiente, conseguindo, portanto, otimizar os processos biológicos (ASCHOFF, 1981; VERA *et al.*, 2009). As mudanças ambientais atuam como um Zeitgeber, ou seja, um sincronizador sobre o qual os ritmos biológicos são moldados em relação à periodicidade, amplitude e fase do evento natural (RENSING e RUOFF, 2002; VERA *et al.*, 2009). Várias condições devem ser atendidas para que um fator ambiental possa ser considerado como um válido Zeitgeber. Portanto, quando o animal é exposto a um determinado fator externo deve haver uma relação entre a fase estável e o sincronizador do ritmo. Uma vez que o sincronizador é suprimido, o ritmo biológico de funcionamento é chamado de livre curso e a fase é levemente alterada daquela previamente determinada pelo Zeitgeber (VERA *et al.*, 2009).

Os ciclos circadianos são ciclos que se repetem em intervalos de 20 até 28 horas e sobre eles se baseia o ciclo biológico de quase todos os seres vivos (VERA *et al.*, 2009) sendo, portanto, um dos mais estudados (VERA *et al.*, 2007; 2009).

O período desses ritmos biológicos equivale quase aos ciclos diários de claro/escuro (SHEEBA *et al.*, 1999; ROENNEBERG e MERROW, 2002), mas há organismos que apresentam ritmos com períodos inferiores há 20 horas, como os ritmos ultradianos (respiração, batimentos cardíacos, disparos de neurônios, etc.) e outros cujo período é superior a 28 horas, chamados de

ritmos infradianos (ciclo menstrual, ciclo sazonal climático, reprodução, etc.) (CAPERL *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2003).

Os peixes, quando submetidos a um ciclo diário de luz/escuro demonstram um padrão de atividade locomotora que os podem classificar como diurnos, noturnos e crepusculares (MADRID *et al.*, 2001; HERRERO *et al.*, 2003; SCHULZ e LEUCHTENBERGER, 2006; BLANCO-VIVES e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009).

Pode-se concluir que o ciclo luz/escuro tem sido considerado um dos mais importantes fatores ambientais sincronizadores do ritmo biológico (VERA *et al.*, 2007), sendo o fator chave para sincronização do ritmo de atividade em peixes (LIGO e TABATA, 1996). Sendo assim, o efeito do ciclo circadiano deve ser levado em consideração para o sucesso da criação de determinadas espécies.

No entanto, em algumas espécies de peixes teleósteos a caracterização do padrão diário de atividade não é tão expressiva, sendo que dentro da mesma espécie pode haver variabilidade em seu padrão de atividade (HELFMAN, 1993; VERA *et al.*, 2009). Geralmente, é aceito que o padrão de atividade em peixes demonstre forte plasticidade (ALI, 1992; MADRID *et al.*, 2001; REEBS, 2002; VERA *et al.*, 2009). Essa variabilidade do padrão de atividade foi também observada em alguns estudos com adultos de tilápia do Nilo (VERA *et al.*, 2009). Essa diferença na organização circadiana seria, em grande parte, por consequência da variação do padrão de comportamento individual do peixe (VERA *et al.*, 2009), ou devido a uma rápida adaptação a determinados ambientes (MIGAUD *et al.*, 2007). Assim, a variação de atividade pode ser atribuída à grande variação nas preferências dos regimes de luz, podendo ser espécie específica, além de depender da fase de desenvolvimento do peixe (FORTES-SILVA *et al.*, 2010).

Apesar das diferenças observadas nas distintas espécies de peixes, que reforçam a hipótese da plasticidade nos ritmos biológicos em peixes, parece que é fundamental à presença ou ausência de luz para a caracterização do ritmo circadiano, sendo este menos influenciado pela disponibilidade de alimento (BARAS, 2000). Portanto, o ciclo luz/escuro, pode ser considerado um fator importante no controle dos ritmos biológicos em peixes (LOPEZ-OLMEDA *et al.*, 2009; MONTOYA *et al.*, 2010).

Devido à importância dos efeitos do estresse e do ciclo circadiano no cultivo de peixes, com este trabalho nos pretendemos monitorar as variáveis plasmáticas (lactato e proteínas totais), sorológicas (cortisol e colesterol) e do sangue total (glicose) em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetida a estresse de manejo no ciclo de 24 horas.

As informações obtidas contribuem a individualização de valores de referência para as variáveis analisadas voltadas à otimização das práticas de manejo nas implantações de tilapicultura.

## Referências bibliográficas

- ADAMANTE, W.B. 2005. Estresse de alevinos de Dourado e Mandi sob diferentes densidades e tempos de transporte. Santa Catarina, Brasil. Florianópolis, 39f (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/101891/225333.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 de Novembro 2016.
- ALI, M.A. 1992. Rhythms in fishes. *Plenum Press Publisher*. 154-166.
- APPLEYARD, S.A.; RENWICK, J.M.; MATHER, P.B. 2001. Individual heterozygosity levels and relative growth performance in *Oreochromis niloticus* (L.) cultured under Fijian conditions. *Aquaculture Research*, 32 04: 287-296.
- ASCHOFF, J. 1981. Handbook of behavioral neurobiology. *Biological Rhythms*.
- BARAS, E. 2000. Day-night alternation prevails over food availability in synchronising the activity of *Piaractus brachypomus* (Characidae). *Aquatic Living Resources* 13: 115-120.
- BARRETO, R.E.; BARBOSA, A.; GIASSI, A.C.C.; HOFFMANN, A. 2010. The 'club' cell and behavioral and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile tilapia. *Freshwater Behavior Physiology*, 43 :75-81.
- BARTON, B.A. e IWAMA, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- BLANCO-VIVES, B. e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2009. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 98: 268-275.
- BUENO, F. R.; DE CARVALHO GOMES, L.; CHAGAS, E. C. 2015. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36, 3 :343-349.
- CAPERL, J.; LOZANO, R.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M.; JARILLO, J. A. 2003. Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Ecosistemas*, 1. do World Wide. Disponível em: <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/revisiones2.html>. Obtido em 12 de novembro de 2016.
- CARMICHAEL, G.J.; TOMASSO, J.R.; DAVIS, K.B. 1984. Characterization and alleviations of stress associated with hauling largemouth bass. *Transaction of the American Fisheries Society*, 113: 778-787.

- CARNEIRO, P. C. F. e URBINATI, E. C. 1999. "Stress" e crescimento de peixes em piscicultura intensiva." In: *III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, Campinas. Anais. CBNA*, p.25-40.
- CARVALHO, C.S. e FERNANDES, M.N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*. 251:109-117.
- COSTA, O.F.T.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. 2004. Susceptibility of the amazonian fish, *Colossoma macrospomun* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*. 232:627-636.
- FORTES-SILVA, R.; MARTÍNEZ, F.J.; VILLARROEL, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2010. Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*., 156: 445- 450.
- GIBSON, A.K e MATHIS, A. 2006. Opercular beat rate for rainbow darters *Etheostoma caeruleum* exposed to chemical stimuli from conspecific and heterospecific. *Journal Fish of Biology*, 69: 224–232.
- HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M. 1999. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum*, 21, 3: 733-737.
- HELFMAN, G.S. 1993. Fish behavior by day, night and twilight. In: Pitcher, T.J. (Ed.). Behavior Teleo Fish. *Chapman and Hall*, 479- 512.
- HERRERO, M.J.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F.J. 2003. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Chronobiology International* 20: 1001-1017.
- INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. 2004. Assessment of 2-phenoxyethanol and benzocaine as anesthetics for field procedures in matrinxá (*Brycon cephalus*). *Biodiversidade Pampeana*, 2: 10-15.
- IWAMA, G.K.1993. Intensive fish productions, *Guided Independent Study: Course manual. UBC Access, University of British Columbia, Vancouver. 130p.*
- LIGO, M. e TABATA, M. 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiology & Behavior*, 60: 775-781.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; EGEA-ÁLVAREZ, M. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2009. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? *Physiology Behavior*, 96: 631-636.

- LOVSHIN, L.L. 1997. *Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry*. In: *Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes, 1, Piracicaba, Anais. Piracicaba: CBNA: 137-164.*
- MADRID, J.A.; BOUJARD, T.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2001. Feeding rhythms. In: *Houlihan, D.; Jobling, M.; Boujard, T. Food Intake in Fish. Oxford, 189-215.*
- MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. 2003. Adaptação temporal. IN. MARQUES; L; MENNA-BARRETO. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo, 55-98.
- MAZEAUD M.M., MAZEAUD F.; DONALDSON E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society, 106* : 201-212.
- MELLO, F.; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; RESENDE, E. K.; STREIT JR, D. 2012. *Curvas de crescimento em tambaquis (Colossoma macropomum)*. In: *Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, nº 9, 2012, João Pessoa. Anais. João Pessoa: SBMA. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/11025246/curvas-de-crescimento-de-tilapias-do-nilo-oreochromis-niloticus-linhagem-gift/6>.*
- MIGAUD, H.; DAVIE, A.; MARTINEZ-CHAVEZ, C.C.; AL-KHAMEES, S. 2007. Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleosts. *Journal of Pineal Research, 43*: 327-335.
- MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Review in Fish Biology and Fisheries, 9*: 211-268.
- MONTOYA, A.; LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; GARAYZAR, A.B.S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2010. Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light–dark cycle. *Physiology & Behavior, 101, 1*,: 101-107.
- MORAES, A. M.; QUADRO, S. W.; TAVARES, F.; MACHADO, F. D. 2009. Desempenho zootécnico de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, com diferentes rações comerciais. *Revista Ciência Agronômica, 40, 03*: 388-395.
- MORAES, G.; POLEZ, V.L.P.; IWAMA, G.K. 2004. Biochemical responses of two erythrinidae fish to environmental ammonia. *Brazilian Journal Biology, 64*:95-102.
- MORGAN, E. 2004. Ecological significance of biological clock. *Biological Rhythm Research, 35*: 3-12.

- MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura). 2010. Boletim estatístico da pesca e aqüicultura. Brasil. Disponível em: [http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est\\_2011\\_bol\\_\\_bra.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf) Acesso: 01 de dezembro.
- NOLAN, S.J.; MCNULTY, J.M.; KRISHNASAMY, R.; MCGREGOR, W.G. 1999. C8-guanine adduct-induced stabilization of a -1 frame shift intermediate in a nonrepetitive DNA sequence. *Biochemistry* 38:14056–14062.
- OBA, E. T. 2006. Efeitos do exercício físico moderado e da suplementação da dieta com vitamina C, no crescimento e no metabolismo do matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Teleostei: Characidae). São Carlos, Brasil. São Paulo 99 f. (Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas)- Universidade Federal de São Carlos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/equipe/-/empregado/335493/eliane-tie-oba-yoshioka>. Acesso em: 01 de dezembro.
- OBA, E.T.; MARIANO, W. dos S.; SANTOS, L.R.B. dos. 2009. *Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável*. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, 226-247.
- OLIVEIRA, R. F.e GALHARDO, L. 2007. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36 : 77-86.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2002. *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Editora Eduem, Maringá, 2: 305.
- PICKERING, A. D. 1998. Stress responses of farmed fish. In: Black, K. D. & Pickering, A. D. (eds). *Biology of Farmed Fish*: 222–255.
- PICKERING, A.D. 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111: 51-63. Plenum Press Publisher, 4:3-10.
- REEBS, S. G. 2002. Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12: 349-371.
- RENSING, L. e RUOFF, P. 2002. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol International*, 19: 807-864.
- ROENNEBERG, T. e MERROW, M. 2002. “What watch?... such much!”\* Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Research*., 309,1: 3-9.
- SCHULZ, U.H., e LEUCHTENBERGER, C. 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Brazilian Journal Biology*, 66: 565-574.

- SCHWARZ, K. K.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; MICHELATO, M.; GUALDEZI, M. C. 2010. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. *Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá*, 32, 2: 197-203.
- SHEEBA, V.; SHARMA, V. K.; JOSHI, A. 1999. Adaptive significance of circadian rhythms. *Resonance*: 73-75.
- SILVA, R.D.; ROCHA, L.O.; FORTES, B.D.A.; RODRIGUES, C.P.F.; LOBO, J.R.; FALEIRO, M.B.R., DE PAULA, F.G.; VIEIRA, D. 2009. Determinação de glicose plasmática em exemplares adultos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) por glicosímetro digital portátil e por método enzimático. *Anais 6º Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão, Goiânia* : 5914-5919.
- TEIXEIRA FILHO, A.C.1991. Piscicultura ao alcance de todos. *São Paulo: Nobel*: 212p.
- VERA, L.M.; CAIRNS, L.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MIGAUD, H. 2009. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chronobiology International*, 26: 666-681.
- VERA, L.M.; De PEDRO, N.; GÓMEZ-MILÁN, E.; DELGADO, M.J.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; MADRID, J.A.; SANCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology Behavior*, 90: 518-524.
- WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. 1990. *Stress and acclimation*. In SCHRECK, C. B. and MOYLE, P. B. (eds.), *Methods for fish biology*. American Fisheries Society: 451–489.
- WENDEELAR-BONGA, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77:591–625.

#### APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO:

- A presente dissertação é constituída por um único capítulo em formato de artigo científico.
- Este artigo científico está redigido nas normas do Boletim do Instituto de Pesca.

#### CAPITULO 1:

### **“MONITORAMENTO DAS VARIÁVEIS PLASMÁTICAS E SOROLÓGICAS DO SANGUE DE TILAPIA DO NILO, DURANTE 24 HORAS”**

# **CAPÍTULO 1**

**“MONITORAMENTO DAS VARIÁVEIS PLASMÁTICAS E SOROLÓGICAS  
DO SANGUE DE TILAPIA DO NILO, DURANTE 24 HORAS”**

## **MONITORAMENTO DAS VARIÁVEIS PLASMÁTICAS E SOROLÓGICAS DO SANGUE DE TILÁPIA DO NILO, DURANTE 24 HORAS**

Diana M. ALMEIDA<sup>1</sup>, Leonardo TACHIBANA<sup>2</sup>, Danielle C. DIAS<sup>2</sup>, Maria José T. RANZANI-PAIVA<sup>2</sup>

1: Pós graduação - Instituto de Pesca, APTA-SSA. Av. Francisco Matarazzo 455, CEP 05001-900, Água Branca - SP - Brasil. [tizzianni@gmail.com](mailto:tizzianni@gmail.com),

2: Pesquisador científico - Instituto de Pesca, APTA-SSA. [itachiba@gmail.com](mailto:itachiba@gmail.com), [daniellebio2004@yahoo.com.br](mailto:daniellebio2004@yahoo.com.br), [mase@pesca.sp.gov.br](mailto:mase@pesca.sp.gov.br)

### **RESUMO**

A tilápia é uma das espécies comercialmente mais importantes para aquicultura devido ao crescimento rápido, rusticidade, boa conversão alimentar, adaptabilidade aos diferentes sistemas de criação e boa aceitação pelo mercado consumidor. A deficiência em qualquer aspecto do manejo causa situações de estresse resultando em baixa eficiência do sistema imunológico, redução da sobrevivência, do crescimento e da capacidade reprodutiva. Por outro lado, os organismos respondem, também, a determinados ritmos biológicos, como os circadianos, aos quais os animais se adaptam naturalmente. Devido à importância dos efeitos do estresse e do ciclo circadiano no cultivo de peixes, com este trabalho pretendeu-se monitorar as variáveis plasmáticas (lactato e proteínas totais), sorológicas (cortisol e colesterol) e do sangue total (glicose) em tilápia do Nilo no ciclo de 24 horas. Para o experimento foi utilizada uma bateria de 49 aquários com 5 indivíduos cada. Todos eles sofreram, no início do experimento, o mesmo estresse de captura e manipulação. Em seguida, as amostras de sangue dos indivíduos de cada aquário foram sequencialmente retiradas com intervalos de 30 minutos até completar às 24h de observação. Somente os indivíduos do primeiro aquário tiveram a amostra de sangue retirada após 15 minutos da aplicação do estresse. Para visualizar o andamento semi-horário das variáveis medidas, gráficos circulares foram elaborados. A ausência de diferenças significativas entre as variáveis medidas e as fases do ciclo circadiano (intervalos luz-escuro e manhã-tarde-noite-madrugada), foi verificada através dos testes de hipótese de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis respectivamente. Os resultados obtidos permitiram concluir que as variáveis: cortisol, glicose, lactato e proteínas não são afetadas pelo ciclo circadiano nem pelo efeito do estresse de manejo. A diferença entre os períodos de luz e escuro não foi significativa e a intensidade e frequência dos picos observados não foram prejudiciais para os indivíduos. Somente o colesterol mostrou relação com o ciclo circadiano de 12/12h (luz-escuro) apresentando valores maiores no período de luz. Isto pode estar relacionado com o fato de que os peixes não foram alimentados durante o experimento.

Palavras-chave: Peixe, Estresse, Ciclo circadiano, Manejo.

## ABSTRACT

Tilapia is one of the most commercially important species for aquaculture due to rapid growth, rusticity, good feed conversion, adaptability to different breeding systems and good acceptance by the consumer market. Deficiency in any aspect of management causes stresses resulting in poor immune system efficiency, reduced survival, growth and reproductive capacity. On the other hand, organisms also respond to certain biological rhythms, such as circadians, to which animals naturally adapt. Due to the importance of the effects of stress and the circadian cycle in fish culture, this work was intended to monitor the plasma (lactate and total proteins), serological (cortisol and cholesterol) and total blood (glucose) variables in Nile tilapia in the 24 hour cycle. For the experiment, a battery of 49 aquariums with 5 individuals each was used. All of them suffered, at the beginning of the experiment, the same stress of capture and manipulation. Then the blood samples of individuals from each aquarium were sequentially removed at 30-minute intervals until completion of 24 h observation. Only individuals from the first aquarium had the blood sample withdrawn after 15 minutes of stress application. In order to visualize the semi-clockwise movement of the measured variables, circular charts were elaborated. The absence of significant differences between the measured variables and the phases of the circadian cycle (light-dark intervals and morning-afternoon-night-dawn) was verified through the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis hypothesis tests, respectively. From the observes results we concluded that the variables cortisol, glucose, lactate and proteins are not affected by the circadian cycle nor by the effect of management stress. The difference between light and dark periods was not significant and the intensity and frequency of the observed peaks were not detrimental to the individuals. Only cholesterol showed a relation with the circadian cycle of 12/12h (dark light), presenting higher values in the light period. This may be related to the fact that the fish were not fed during the experiment.

Key words: Fish, Stress, Circadian cycle, Management.

## Introdução

As tilápias estão entre os grupos de peixes que mais crescem em termos de comercialização no mundo especialmente devido ao aumento de sua produção na China e em outros países em desenvolvimento como o Brasil. As tilápias são nativas da África, Israel e Jordânia e a partir dos últimos 50 anos estão se espalhando pelo mundo, sendo produzidas em mais de 100 países, nos mais diversos climas, sistemas de produção e salinidades de água. Entre as diversas espécies, as do gênero *Oreochromis*, são as mais utilizadas na aquicultura (HEMPEL, 2002).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*) e a tilápia azul (*Oreochromis aureus*), são as que atingiram maiores destaque em termos de produção. No Brasil, a tilapicultura segue a tendência mundial, com produção de 80% de tilápia do Nilo e 20% de outras tilápias (FAO, 2007).

Segundo CYRINO e CONTE (2006) a tilápia do Nilo é uma espécie tropical cuja temperatura ideal de desenvolvimento varia entre 25 e 30 °C, tendo seu crescimento afetado com temperatura de 15 °C e não resistindo a temperaturas por volta de 9 °C.

A viabilidade da espécie para aquicultura se ampara em razão do desenvolvimento de tecnologias e manejos apropriados (TEIXEIRA, 1991). O manejo adequado, em particular, se torna fundamental para o sucesso da aquicultura e consiste no monitoramento de aspectos como: qualidade da água, alimentação, densidade de estocagem e sanidade. O controle adequado destes aspectos tem como finalidade proporcionar o bem-estar dos peixes no cultivo assim que possam expressar seu melhor potencial de crescimento (OLIVEIRA e GALHARDO, 2007). Entretanto, a variabilidade das condições no ambiente de cultivo como exposição a fatores ambientais naturais (por exemplo: variações diárias de luz/escuro e de temperatura e presença/ausência de chuvas), ou as intervenções de rotina no sistema de cultivo (por exemplo: as técnicas de captura, a manipulação dos peixes para biometria e o transporte) podem alterar a homeostasia dos indivíduos (INOUE *et al.*, 2004) desencadeando respostas de estresse.

CARNEIRO e URBINATI (1999) afirmam, neste propósito, que as causas do estresse em peixes são praticamente inevitáveis quando se trata do manejo rotineiro e por razões operacionais intrínsecas a atividade de cultivo. Neste caso, os indivíduos são submetidos a uma condição de estresse agudo ou crônico onde as respostas desencadeadas, segundo IWAMA (1993), correspondem a uma série de alterações fisiológicas que podem ser de tipo primário (alterações hormonais – exemplo: cortisol), secundário (alterações na glicemia, no ácido láctico, no glicogênio hepático e muscular) ou terciário (alterações relacionadas ao comprometimento do crescimento, mudanças no comportamento e aumento da susceptibilidade a doenças) (ADAMANTE, 2005; MAZEAUD *et al.*, 1977). Em geral, quando determinados limites são ultrapassados, a capacidade de recuperação e o desempenho do peixe durante a sucessiva fase de reestabelecimento podem ser comprometidos (MOMMSEN *et al.*, 1999). Estas observações justificam a necessidade de monitorar o comportamento de algumas variáveis do sangue para compreender melhor as consequências de operações de manipulação na fisiologia dos indivíduos de forma que condições de estresse possam ser rapidamente detectadas.

De acordo com MENNA-BARRETO (2003) e ROTENBERG *et al.* (2003) importantes efeitos na homeostasia podem, também, derivar de alterações nos ritmos endógenos de um ser vivo em respostas a determinados estímulos ambientais. De fato, muitos processos fisiológicos e comportamentais nos organismos são rítmicos ocorrendo no período de 24 horas e são referidos como circadianos ou nictemerais (SHEEBA *et al.*, 1999; ROENNEBERG e MERROW, 2002).

Os ritmos biológicos, em geral, são definidos como qualquer evento que se repete de maneira regular em um organismo relacionado às mudanças ambientais cíclicas (exemplo: luz-escuro) ao qual o animal deve se adaptar (MORGAN, 2004).

Os circadianos em peixes são estratégias de sobrevivência que buscam o melhor ajuste possível entre a fisiologia do animal e alguns eventos previsíveis, como o nascer do sol (MADRID *et al.*, 2001).

Entende-se hoje que os ritmos biológicos, que observamos na natureza, são os resultados da interação entre relógios biológicos endógenos e fatores ambientais externos aos quais os organismos estão submetidos ou adaptados.

O processo que faz essa interação é conhecido como sincronização ou arrastamento, e os ciclos ambientais capazes de promovê-la em uma determinada espécie são identificados como agentes sincronizadores ou arrastadores (*zeitgebers*) (MENNA-BARRETO e MARQUES, 2002).

Relógios circadianos aumentam a habilidade inata à sobrevivência dos organismos às constantes modificações ambientais possibilitando-os antecipar eficientemente eventos periódicos tais como disponibilidade de alimento, luz, reprodução entre outros. Um indivíduo que é simplesmente dirigido por mudanças externas é desvantajoso em relação a um que é regulado por um relógio endógeno flexível e antecipatório. Os organismos dotados dessa propriedade de antecipação a eventos periódicos se mostraram evolutivamente viáveis e sobreviveram, conservando-a até hoje nas diversas formas que os relógios biológicos têm assumido nas diferentes espécies (SHEEBA *et al.*, 1999; PANDA *et al.*, 2002; ROENNEBERG e MERROW, 2002; BRASNDSTATTER, 2003; MARKUS *et al.*, 2003; MENNA-BARRETO, 2003; PARANJPE e SHARMA, 2005).

A habilidade de responder a luz é um aspecto universal dos relógios em todos os organismos, sobre o qual é ajustado o ciclo de atividade/repouso (RANDALL *et al.*, 2000). Este ciclo de claro e escuro pode variar de acordo com as estações do ano de tal forma que a duração do fotoperíodo é maior no verão do que no inverno (MARKUS *et al.*, 2003).

Todos os sistemas circadianos se constituem, em pelo menos três elementos: (1) uma via aferente que transmite informações do meio ambiente; (2) um ou mais osciladores capazes de gerar a oscilação, e (3) vias eferentes, através do qual o oscilador regula a expressão de diversos ritmos. Pode-se dizer que os fotorreceptores são a primeira via de captação e identificação do ciclo ambiental (MARQUES, 2003).

Em peixes, anfíbios e répteis identificam-se osciladores circadianos oculares, com as propriedades descritas para invertebrados, como moluscos e crustáceos. Mesmo sem tentar qualquer interpretação de caráter evolutivo, percebe-se que as modificações dos padrões anatômicos tomaram rumos bastante paralelos nos dois grupos zoológicos. Em ambos observa-se uma tendência à interiorização dos osciladores, que em grupos anteriores ocupam uma posição bastante periférica, em geral, junto aos olhos, ou então são

estruturas visuais, como células retinianas, que adquiriram as funções de osciladores. Neste nível da escala filogenética aparece a função da glândula pineal como marcapasso circadiano. Além da função da retina e da pineal, em certos peixes, anfíbios e répteis (especialmente nos lagartos) apresentou-se, um conjunto de neurônios hipotalâmicos osciladores, que pode ser considerado como precursor dos neurônios supraquiasmáticos de mamíferos (GOLOMBEK e AGUILAR-ROBLERO, 2003).

O ciclo circadiano se destaca como o mais estudado dentre os ciclos (VERA *et al.*, 2009). Pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre as manifestações desse ritmo, buscando confirmar e entender melhor os ritmos locomotor, reprodutivo e alimentar (SANCHEZ-VAZQUEZ, *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2009; KULCZYKOWSKA e SÁNCHEZ-VAZQUEZ, 2010). Estas pesquisas evidenciam a importância do ciclo claro-escuro como sincronizador do ritmo biológico. Entre estas, o conhecimento do padrão de atividade locomotora das espécies é fundamental para fins de criação em cativeiro, contribuindo a direcionar a escolha da espécie mais adequada para uma determinada região de cultivo, assim como auxiliando nas formas de manejo (como por exemplo, estabelecimento dos horários de alimentação), sendo estes aspectos que podem resultar em fatores determinantes para o alcance do sucesso do empreendimento. Neste contexto, há registros de variações diárias nos níveis de glicose, cortisol, enzimas digestivas, lactato, colesterol e proteínas associadas à sincronização pelo ciclo de alimentação (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 1998; VERA *et al.*, 2007; LÓPEZ-OLMEDA *et al.*, 2009; MONTROYA *et al.*, 2010; DEL POZO *et al.*, 2012).

Em relação ao efeito do estresse de manejo, ao contrário, nota-se certa carência de informação. Por isto, com este trabalho nos pretendemos monitorar as variáveis plasmáticas, sorológicas e do sangue em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetida a estresse de manejo no ciclo de 24 horas. Em particular procuramos responder as seguintes perguntas: como variam, ao longo de 24 horas, as variáveis do sangue total, plasmáticas e sorológicas em indivíduos de tilápia submetidos a estresse de manejo? Quais variáveis são mais afetadas pelo efeito do estresse? As variações observadas podem ser reconduzidas a influência do ciclo circadiano? Qual parte do ciclo tem mais influência sobre as concentrações das variáveis do sangue

## Material e métodos

No presente estudo foram utilizados machos de tilápia revertidos, num total de 600 indivíduos. O experimento foi realizado no Pólo Centro Leste, UPD de Pirassununga da APTA/SAA, no mês de abril de 2015.

No dia do experimento, apresentavam média de comprimento de  $15,02 \pm 1,20$  cm e peso médio de  $66,60 \pm 16,20$  g. O ensaio experimental iniciou às 7:00 h e terminou às 7:00 h do dia seguinte, totalizando 24 horas.

Para o experimento foi utilizada uma bateria de 49 aquários, com fluxo de água e aeração constante, temperatura de 25°C e densidade de 5 indivíduos por aquário, totalizando 245 peixes. Todos eles sofreram o mesmo estresse de captura (realizado com puçá) e foram manipulados para registro das biometrias (comprimento total e peso) permanecendo por um minuto fora da água. Este protocolo foi considerado representativo de uma condição de estresse de manejo normalmente presente no âmbito do cultivo. Considerando que os peixes foram aclimatados em três tanques durante 6 meses e mantidos com ciclo de 12h de luz (07:00-18:00h) e 12 de escuro (18:00-07:00h), o monitoramento das variáveis do sangue ao longo das 24h, além da resposta do organismo ao estresse de manipulação incorporam também o efeito do ciclo circadiano.

Cada indivíduo pertencente ao experimento foi aleatoriamente selecionado entre os 600 disponíveis. Durante o período do experimento os animais não receberam alimentação e foram mantidos em luz constante. Nós julgamos que estas condições não afetaram os resultados observados porque: i) a duração do experimento foi limitada no tempo (24h) e ii) porque é demonstrado que os ritmos biológicos continuam a se expressar durante dias, meses ou anos após a supressão do agente sincronizador (zeitgebers) (MENNA-BARRETO e MARQUES, 2002) dependendo da espécie e das condições experimentais. Estes ritmos, obtidos após a supressão do agente sincronizador, são conhecidos como ritmos em livre-curso e são expressões de relógios biológicos endógenos (MARQUES *et al.*, 2003; ROTENBERG *et al.*, 2003).

Cada peixe foi retirado do aquário, anestesiado com óleo de cravo (25 mg L<sup>-1</sup> em balde de 40 L de água) e o sangue colhido por punção caudal. A primeira amostra de sangue ocorreu após 15 minutos da aplicação do agente estressor e, posteriormente, há 30 minutos, 1:00 h, 1:30 h e assim por diante até 24:00 h. Para

a colheita do sangue foram utilizadas duas seringas, uma heparinizada e outra não heparinizada. A primeira é recomendada quando se pretende fazer a análise do sangue total (glicose) ou plasma (lactato e proteínas totais) sendo que a heparina inibe a formação dos coágulos. A seringa sem heparina é recomendada para as análises do soro (cortisol, colesterol) onde, ao contrário, o processo de coagulação é esperado. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 2.000 rpm (72 xg) durante 10 minutos para obtenção da separação do plasma/soro. As duas amostras foram armazenadas em microtubos de polietileno, separadas e posteriormente analisadas.

As concentrações sorológicas do cortisol ( $\mu\text{g dL}^{-1}$ ) e do colesterol ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) foram, respectivamente, determinadas com o kit Elisa – DBC e com o sistema enzimático colorimétrico –Trinder.

As concentrações plasmáticas do lactato ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) e das proteínas totais ( $\text{g L}^{-1}$ ) foram, respectivamente, realizadas com o sistema enzimático oxidase–Trinder e com o Reagente de biureto – colorimétrico.

As concentrações da glicose ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) foram analisadas através do sangue total utilizando o Sistema Accu-Check Activ Performa.

#### *Análise de dados*

Os valores das variáveis do sangue, plasmáticas e sorológicas medidas nos indivíduos pertencentes a cada intervalo horário considerado para o experimento foram inicialmente submetidos à análise descritiva sendo calculadas as seguintes estatísticas: média  $\pm$  erro padrão, mediana, mínimo e máximo.

Em seguida, gráficos circulares foram elaborados utilizando à média dos indivíduos de cada aquário, para visualizar o andamento semi-horário dos parâmetros plasmáticos (lactato e proteínas totais), sorológicos (cortisol, colesterol) e de sangue total (glicose) ao longo do período de observação. Os valores medidos foram analisados em relação ao ciclo circadiano luz/escuro (ciclo de 12/12h) e, dentro deste, entre os períodos manhã-tarde e noite-madrugada (ciclo de 6/6h). Isto se justifica pelo fato de que o efeito fisiológico desencadeado pelo ciclo circadiano também influencia as variáveis do sangue.

Enfim, para verificar a ausência de diferenças significativas entre as variáveis medidas e as faixas horárias de 12/12h e de 6/6h, os testes de hipótese de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis foram respectivamente

aplicados. O uso da alternativa não-paramétrica foi justificado pela ausência dos requisitos de normalidade e homogeneidade das variâncias, indispensáveis para a aplicação do teste t assim como da ANOVA, que também permaneceram após transformação logarítmica dos dados.

A agregação dos dados por faixa horária, relacionadas com as fases do ciclo circadiano, permitiu evidenciar de forma mais clara e sintética a dinâmica das variáveis do sangue total, plasmáticas e sorológicas ao longo do período observado. Quando o resultado do teste de hipótese de Kruskal-Wallis foi significativo ( $p < 0,05$ ), o teste a *posteriori* de comparação múltipla foi aplicado para individualizar quais faixas horárias eram diferentes entre eles.

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica (StatSoft, versão 7).

## Resultados

Os resultados do monitoramento de 24 horas das variáveis: cortisol, glicose, lactato, colesterol e proteínas totais são apresentados separadamente para cada uma delas. Os valores foram organizados em relação ao ciclo circadiano representado pelas fases de luz-escuro (12/12h) e pelos intervalos manhã-tarde e noite-madrugada (6/6h).

### *Monitoramento do cortisol nas 24h*

A média e o erro padrão da média do cortisol entre todos os 49 intervalos horários considerados foi de  $5,75 \pm 0,44 \mu\text{g dL}^{-1}$  e variou entre um mínimo de  $1,38 \mu\text{g dL}^{-1}$  e um máximo de  $14,93 \mu\text{g dL}^{-1}$ , com mediana de  $4,93 \mu\text{g dL}^{-1}$ .

Na Figura 1a, pode-se observar que no período de luz ocorreram dois picos, respectivamente a 11:00h ( $13,396 \mu\text{g dL}^{-1}$ ) e a 18:00h ( $14,934 \mu\text{g dL}^{-1}$ ). Também, no período escuro ocorreram dois picos: as 18:30h ( $13,934 \mu\text{g dL}^{-1}$ ) e as 22:00h ( $11,377 \mu\text{g dL}^{-1}$ ) mostrando que o cortisol apresenta flutuações dentro do ciclo circadiano. Em particular, os picos das 18:00h e 18:30h podem estar relacionados com a passagem da luz para o escuro assim como o das 22:00h, enquanto que o da 11:00h pode ser a expressão do efeito do estresse de manejo.

Analisando os valores em relação ao ciclo de 6/6h (Figura 1b), é possível evidenciar uma clara diminuição dos valores na parte da madrugada, indicando que nesta faixa horária os valores tendem a estabilizar, ou seja, diminui a frequência e a intensidade dos picos, indicando a recuperação da resposta fisiológica ao estresse aplicado.

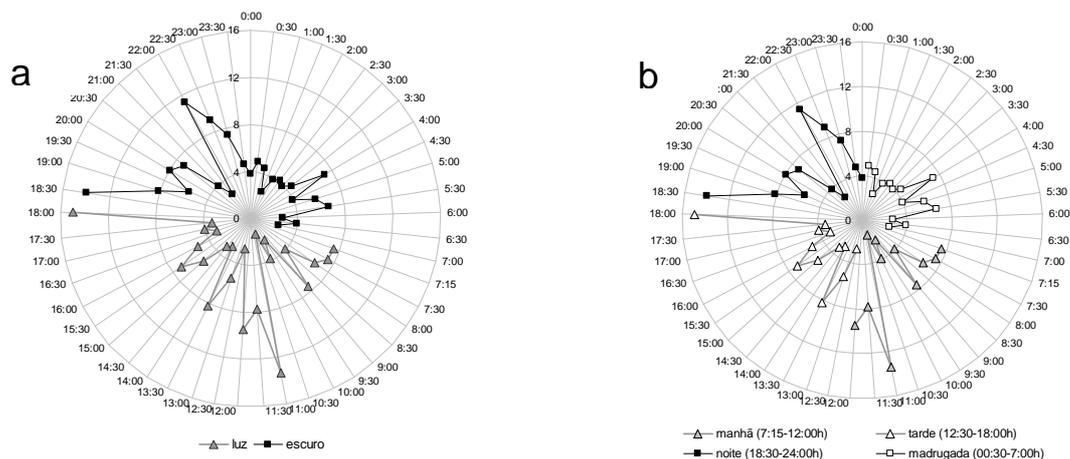


Figura 1: Médias do cortisol ( $\mu\text{g dL}^{-1}$ ) no ciclo de 12/12h (a) e no ciclo de 6/6h (b) de tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Ciclo de 12/12h: luz (7:15-18:00h), escuro (18:30-7:00h); ciclo de 6/6h: manhã (7:15-12:00h), tarde (12:30-18:00h), noite (18:30-24:00h), madrugada (00:30-7:00h).

O teste de Mann-Whitney relativo ao ciclo de 12/12h não mostrou diferenças significativas entre luz e escuro ( $n=245$ ;  $U=7463$ ;  $p=0,983$ ), assim como o teste de Kruskal-Wallis aplicado aos intervalos de 6/6h ( $n=245$ ;  $H=5,89$ ;  $p=0,12$ ), indicando que apesar dos picos observados em correspondência da passagem luz/escuro e da estabilização em volta de valores mínimos na parte da madrugada, as flutuações observadas do cortisol não mostraram alterações substanciais ao longo do experimento.

#### Monitoramento da glicose nas 24h

A média e o erro padrão da média da glicose entre todos os 49 intervalos horários considerados foi de  $86,66 \pm 6,65 \text{ mg dL}^{-1}$  e variou entre um mínimo de  $39,40 \text{ mg dL}^{-1}$  e um máximo de  $207,80 \text{ mg dL}^{-1}$ , com mediana de  $66,80 \text{ mg dL}^{-1}$ .

Na Figura 2a, pode-se observar que no período de luz ocorreu um pico as 13:30h ( $201,8 \text{ mg dL}^{-1}$ ), enquanto que no período escuro ocorreram três picos

respectivamente as 20:00h (207,8 mg dL<sup>-1</sup>), as 22:30 (197 mg dL<sup>-1</sup>) e as 01:00h (206,4 mg dL<sup>-1</sup>). Este achado está de acordo com o fato de que os picos da glicose ocorreram sempre após os do cortisol com um atraso de cerca duas horas.

Analisando os valores em relação ao ciclo de 6/6h (Figura 2b), é possível evidenciar a menor flutuação dos valores da glicose somente na parte da manhã, mostrando que a resposta da glicose ao estresse de manipulação não é imediata. Uma tendência a diminuição dos valores da glicose pode também ser observada na parte da madrugada a partir de 5:00h.

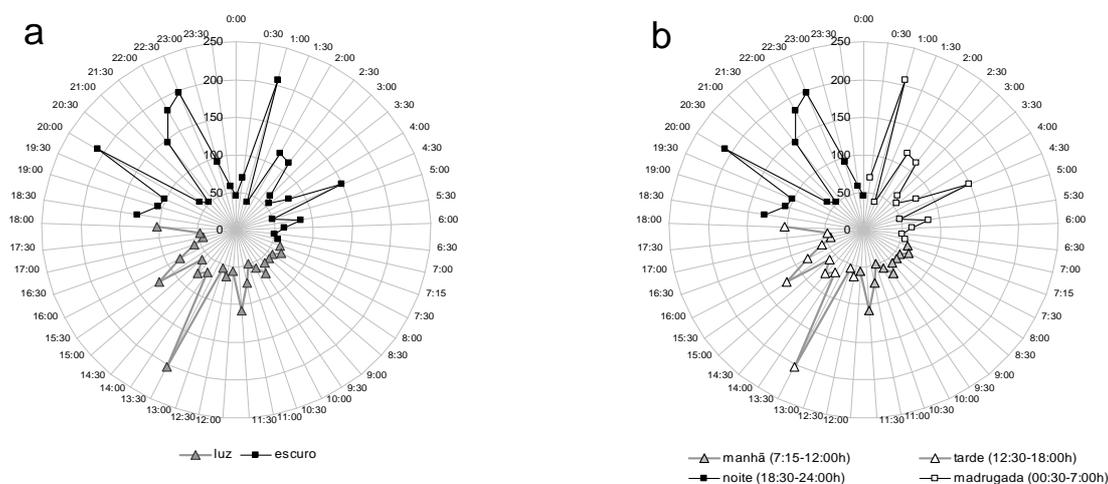


Figura 2: Médias da glicose no ciclo de 12/12h (a) e no ciclo de 6/6h (b) em tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Ciclo de 12/12h: luz (7:15-18:00h), escuro (18:30-7:00h); ciclo de 6/6h: manhã (7:15-12:00h), tarde (12:30-18:00h), noite (18:30-24:00h), madrugada (00:30-7:00h).

O teste de Mann-Whitney aplicado ao ciclo de 12/12h (n=245; U= 7230,50; p=0,66), assim como o teste de Kruskal-Wallis (n=245; H=3,80; p=0,28) aplicado aos intervalos de 6/6h não mostraram diferenças significativas indicando que as flutuações observadas não são representativas de alterações consistentes devidas ao estresse de manipulação aplicado.

Como mostrado na Figura 3, a correlação entre cortisol e glicose resultou positiva com coeficiente de correlação r=0,36 e significativa por p<0,05, confirmando o padrão observado.

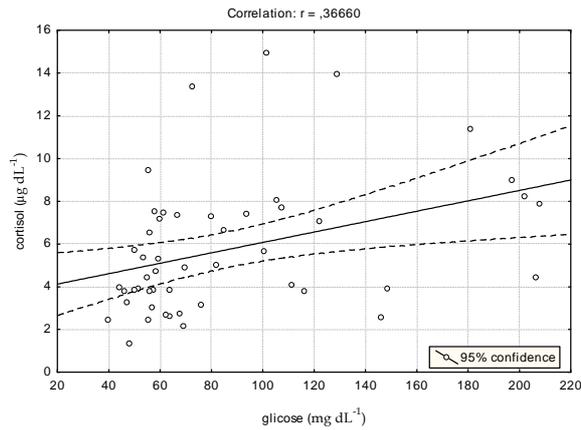


Figura 3: Correlação entre cortisol e glicose.

### Monitoramento do lactato nas 24h

A média e o erro padrão da média do lactato entre todos os 49 intervalos horários considerados foram de  $0,04 \pm 0,00$  mmol L<sup>-1</sup> e variou entre um mínimo de 0,02mmol L<sup>-1</sup> e um máximo de 0,08mmol L<sup>-1</sup>, com mediana de 0,03mmol L<sup>-1</sup>.

Na Figura 4a, pode-se observar que os picos mais intensos ocorreram no início do período de luz, as 7:30h (0,075 mmol L<sup>-1</sup>) e no final do escuro a 6:30h (0,064 mmol L<sup>-1</sup>) e a 7:00h (0,0836 mmol L<sup>-1</sup>), mostrando que a resposta do lactato pode estar mais associada ao ciclo circadiano em correspondência da passagem do escuro para luz do que ao estresse de manipulação. Analisando os valores em relação ao ciclo de 6/6h (Figura 4b), observa-se que flutuações na resposta do lactato ocorreram em todas as faixas.

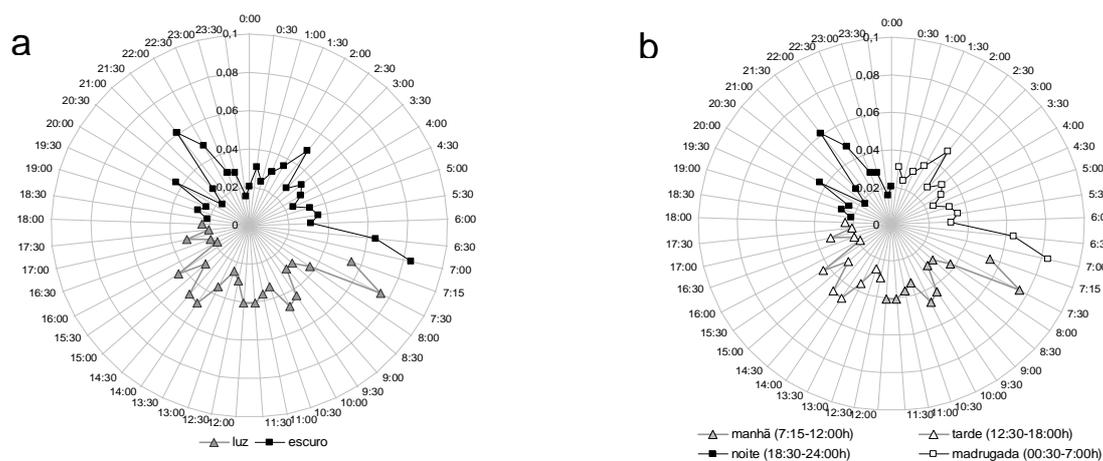


Figura 4: Médias do lactato no ciclo de 12/12h (a) e no ciclo de 6/6h (b) na tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Ciclo de 12/12h: luz (7:15-18:00h), escuro (18:30-7:00h); ciclo de 6/6h: manhã (7:15-12:00h), tarde (12:30-18:00h), noite (18:30-24:00h), madrugada (00:30-7:00h).

O teste de Mann-Whitney aplicado ao ciclo de 12/12h, todavia, não mostrou diferença significativa entre luz e escuro ( $n=245$ ;  $U=6476,50$ ;  $p=0,07$ ), mas o teste de Kruskal-Wallis, ao contrário, mostrou diferença significativa entre os intervalos de 6/6h ( $n=245$ ;  $H=20,77$ ;  $p=0,00$ ). O teste *a posteriori* de comparação múltipla (Tabela 1) revelou que o período da manhã é diferente da tarde e da noite e que o da madrugada é diferente da noite. As flutuações apresentadas ao longo das 24 horas raramente ultrapassam os  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  e os menores valores foram observados no fim da tarde entre 16:00 e 18:00h. Em geral, observamos que o lactato respondeu rapidamente aos estímulos, e apresentou flutuações ao longo das 24h, provavelmente dependendo das condições de estocagem.

Tabela 1: Teste *a posteriori* de comparação múltipla para os períodos de 6/6h. Os valores que mostraram diferenças estatisticamente significativas estão sublinhados.

| Lactato (6/6h) | Manhã       | Tarde       | Noite       | Madrugada   |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Manhã          |             | <u>0,02</u> | <u>0,00</u> | 0,70        |
| Tarde          | <u>0,02</u> |             | 1,00        | 0,72        |
| Noite          | <u>0,00</u> | 1,00        |             | <u>0,02</u> |
| Madrugada      | 0,70        | 0,72        | <u>0,02</u> |             |

#### *Monitoramento do colesterol nas 24h*

A média e o erro padrão da média do colesterol entre todos os 49 intervalos horários considerados foi de  $0,04 \pm 0,00 \text{ mg dL}^{-1}$  e variou entre um mínimo de  $0,02 \text{ mg dL}^{-1}$  e um máximo de  $0,08 \text{ mg dL}^{-1}$ , com mediana de  $0,04 \text{ mg dL}^{-1}$ . Em geral, a resposta do colesterol apresentou flutuações ao longo do período de observação e começou a normalizar por volta de 17:30h.

Na Figura 5a pode-se observar que no período de luz ocorreram dois picos respectivamente as 07:30h ( $0,0642 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e 16:30h ( $0,0772 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e no período escuro ocorreram várias flutuações, mas raramente os valores ultrapassaram  $0,04 \text{ mg dL}^{-1}$ . O pico da 7:30h pode ter sido influenciado pelo ciclo circadiano devido a passagem do escuro para luz, enquanto que o pico das 16:30h pode estar relacionado ao efeito do estresse de manipulação.

Analisando os valores em relação ao ciclo de 6/6h (Figura 5b), todavia, é possível evidenciar uma clara diminuição dos valores na parte da noite e da madrugada, indicando que nesta faixa horária os valores tendem a estabilizar, ou seja, diminui a frequência e a intensidade dos picos.

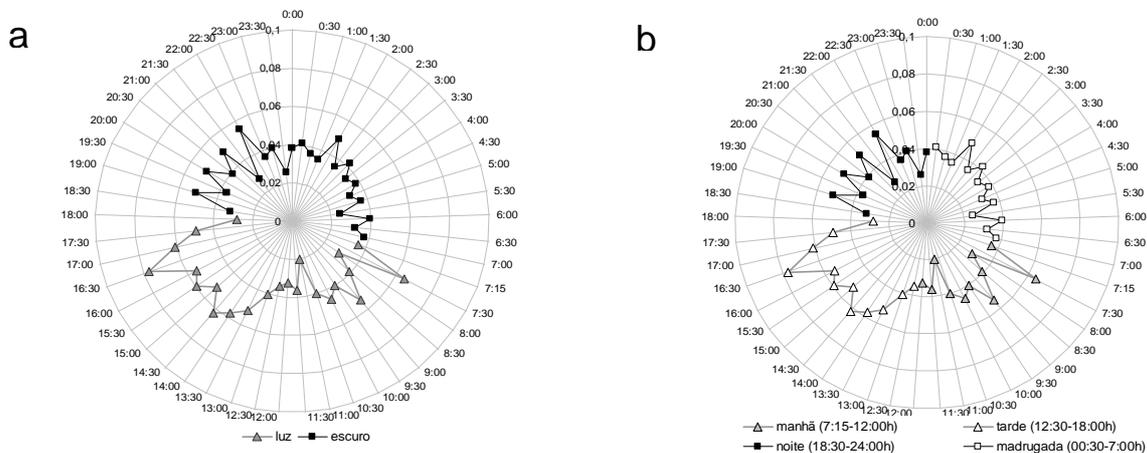


Figura 5: Médias do colesterol no ciclo de 12/12h (a) e no ciclo de 6/6h (b) da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Ciclo de 12/12h: luz (7:15-18:00h), escuro (18:30-7:00h); ciclo de 6/6h: manhã (7:15-12:00h), tarde (12:30-18:00h), noite (18:30-24:00h), madrugada (00:30-7:00h).

O teste de Mann-Whitney aplicado ao ciclo de 12/12h mostrou diferença significativa entre luz e escuro ( $n=245$ ;  $U= 5387,50$ ;  $p= 0,00$ ), assim como o teste de Kruskal-Wallis aplicado aos intervalos de 6/6h ( $n=245$ ;  $H= 36,26$ ;  $p=0,00$ ). Neste caso, o teste a posteriori de comparação múltipla (Tabela 2) revelou que o período da tarde é diferente de todos. Nesta faixa, de fato, ocorreram os maiores valores do colesterol.

Tabela 2: Teste a *posteriori* de comparação múltipla para os períodos de 6/6h. Os valores que mostraram diferenças estatisticamente significativas estão sublinhados.

| Colesterol (6/6h) | Manhã       | Tarde       | Noite       | Madrugada   |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Manhã             |             | <u>0,00</u> | 1,00        | 1,00        |
| Tarde             | <u>0,00</u> |             | <u>0,00</u> | <u>0,00</u> |
| Noite             | 1,00        | <u>0,00</u> |             | 1,00        |
| Madrugada         | 1,00        | <u>0,00</u> | 1,00        |             |

### Monitoramento das proteínas totais nas 24h

A média e o erro padrão da média das proteínas totais entre todos os 49 intervalos horários considerados foi de  $0,03 \pm 0,00$  g dL<sup>-1</sup> e variou entre um mínimo de  $0,02$  g dL<sup>-1</sup> e um máximo de  $0,05$  g dL<sup>-1</sup>, com mediana de  $0,03$  g dL<sup>-1</sup>.

Na Figura 6a, pode-se observar que no período de luz ocorreram 2 picos respectivamente a 8:00h ( $0,048$  g dL<sup>-1</sup>) e 16:00h ( $0,043$  g dL<sup>-1</sup>) e durante o período escuro ocorreu um pico as 18:30h ( $0,040$  g dL<sup>-1</sup>), mas em geral as proteínas tiveram um comportamento parecido nas duas partes do ciclo. O pico das 8:00h poderia estar relacionado com a passagem de escuro para luz, assim como o das 18:30h a passagem da luz para o escuro, enquanto que o das 16:30h poderia estar relacionado com o efeito da manipulação. De alguma forma, a variabilidade das proteínas foi limitada indicando que elas não foram afetadas pelo ciclo circadiano nem para a manipulação. Esta conclusão foi confirmada pelo teste de Mann-Whitney que não mostrou diferença significativa entre luz-escuro ( $n=245$ ;  $U= 7415,50$ ;  $p=0,91$ ).

Analisando os valores em relação ao ciclo de 6/6h (Figura 6b) é possível evidenciar uma clara diminuição dos valores na parte da noite e madrugada, indicando que nesta faixa horária os valores tendem a estabilizar, ou seja, diminui a frequência e a intensidade dos picos. Também neste caso, o teste de Kruskal-Wallis aplicado aos intervalos de 6/6h ( $n=245$ ;  $H=1,13$ ;  $p=0,78$ ) não mostrou diferença significativa entre as faixas, indicando que os valores das proteínas permaneceram similares dentro do período de observação.

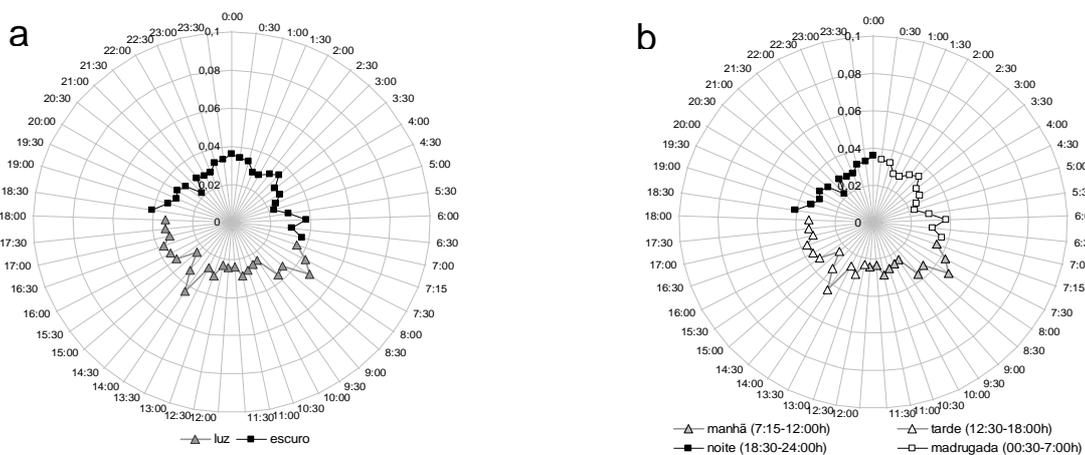


Figura 6: Médias das proteínas totais no ciclo de 12/12h (a) e no ciclo de 6/6h (b) da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Ciclo de 12/12h: luz (7:15-18:00h), escuro

(18:30-7:00h); ciclo de 6/6h: manhã (7:15-12:00h), tarde (12:30-18:00h), noite (18:30-24:00h), madrugada (00:30-7:00h).

## **Discussão**

O cortisol, principal corticosteróide em peixes, é considerado um bom indicador para a avaliação de estresse primário (BARTON, 2002). O nível basal de cortisol varia entre as diversas espécies de peixes, sendo que, para tilápia do Nilo (*O. niloticus*) estes se encontram entre 2,2-7,8  $\mu\text{g dL}^{-1}$  (BARRETO, 2002), entretanto, em situações de estresse agudo, como manipulação do animal, pode ocorrer um rápido aumento do cortisol, chegando a valores entre 4-20  $\mu\text{g dL}^{-1}$ . Estes níveis de cortisol podem retornar aos valores basais em 24 h (ROCHA *et al.*, 2004) indicando que a tilápia do Nilo é um peixe rústico e bem adaptado as condições de manejo. No nosso experimento, o cortisol mostrou flutuações ao longo das 24h que podem estar relacionados tanto com o ciclo circadiano quanto com o estresse de manipulação, mas a ausência de diferenças significativas entre as várias partes do ciclo, indicam que as variações do cortisol são independentes do ciclo e do estresse e os picos observados não afetaram o bem estar dos indivíduos sendo a maioria dos valores inferiores a 8  $\mu\text{g dL}^{-1}$ . Também observamos que a resposta do cortisol não foi imediata, ocorrendo após quatro horas da aplicação do agente estressor e da passagem de escuro para luz. Ao contrário a reação foi mais rápida no caso da passagem de luz para escuro, mas perdurou por mais tempo voltando a estabilizar somente na parte da madrugada.

Em relação ao tempo de resposta, há relatos na literatura demonstrando diferenças quanto ao tempo de liberação do cortisol entre diferentes espécies de peixes (STRANGE *et al.*, 1977; SMART, 1981; SCHRECK, 1981; PICKERING, 1984; VIJAYAN e MOON, 1994; EINARSDÓTTIR e NILSSEN, 1996; WENDEELAR-BONGA, 1997). Em relação à tilápia STRANGE *et al.*, (1978), BARTON *et al.*, (1980), BYRON e BENFEY (1994), observaram diminuição da concentração do cortisol após o estresse, o que também ocorreu no nosso experimento.

O padrão observado no nosso experimento mostrou que o manejo de captura, representado pela manipulação e transferência dos indivíduos de um

tanque para o outro, deve ser considerado como o principal agente estressor, mas que também as condições de manutenção após a transferência ou a transição de luz para escuro, podem gerar condições de estresse.

A glicose é reconhecida para caracterizar a resposta secundária ao estresse em peixes (NOLAN *et al.*, 1999). As reações fisiológicas (secundárias) ocorrem naturalmente no ambiente aquático e, em geral, são positivas para os organismos permitindo reações rápidas no caso de estímulos imprevistos como, por exemplo, reação de fuga a predadores ou auxiliando na adaptação à novas condições ambientais (DAVIS *et al.*, 2006).

O aumento dos níveis de glicose no sangue (hiperglicemia) é induzido pelo cortisol que atua como glicocorticoide. Esta atividade ocorre com os seguintes dois mecanismos: 1) o estímulo da hidrólise das reservas de glicogênio no fígado (glicogenólise) e 2) a indução do organismo a sintetizar glicose a partir de precursores não-carboidratos, além de estimular a reposição do glicogênio hepático (gliconeogênese) (PICKERING, 1993; VIJAYAN *et al.*, 1991; WENDEELAR-BONGA, 1997, URBINATI e CARNEIRO, 2004).

Segundo a literatura, após o aumento da concentração dos hormônios de emergência no sangue causado pelo agente estressor, há aumento significativo da concentração da glicose, preparando o animal para enfrentar uma situação de emergência (ROTLLAND e TORT, 1997; OLIVEIRA *et al.*, (2010).

Em situações de estresse, as concentrações de glicose sanguínea nos peixes aumentam rapidamente como mecanismo fisiológico de defesa, uma vez que o organismo se prepara para uma fuga ou combate, necessitando de uma fonte de energia de fácil metabolização e imediata utilização. As responsáveis pela hiperglicemia em teleósteos estressados são as catecolaminas adrenalina e noradrenalina (BARTON e IWAMA, 1991). Essas substâncias induzem o organismo a quebrar o glicogênio do fígado (glicogenólise) disponibilizando a glicose no sangue (NOLAN, 2000; CASTRO e FERNANDES, 2009).

O glicogênio é uma das muitas formas de armazenamento de energia obtida através da ração que é fornecida aos peixes. Ele é encontrado em grande quantidade no fígado e no músculo do peixe. As quantidades de glicogênio armazenadas no fígado e a capacidade de mobilização desta reserva energética variam entre as espécies de peixe, quando submetidos ao

período de jejum (BARTON e IWAMA, 1991; ENES *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

VIJAYAN *et al.* (1997), observaram que a tilápia mossambica (*Oreochromis mossambicus*) estressadas durante 2 ou 24 horas apresentaram maior concentração de cortisol e glicose, comparativamente a peixes não estressados. Para esses autores, a glicose pode surgir de forma rápida da glicogenólise, enquanto sua manutenção por períodos longos é resultado da gliconeogênese de substratos como lactato e aminoácidos.

No nosso trabalho verificamos que o pico da glicose ocorre sempre após o do cortisol como confirmado da correlação positiva e significativa entre as duas variáveis. A glicose apresentou maiores flutuações no período escuro como resposta aos picos de cortisol, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as várias partes do ciclo circadiano indicando que os níveis da glicose se mantiveram similares dentro do período observado. A maioria deles mostrou valores menores de 130 mg dL<sup>-1</sup>.

O lactato, segundo PICKERING (1993), é um indicador de estresse porque através dele ocorre o acúmulo de ácido láctico que é o resultado do esforço físico à medida que os animais são expostos a agentes estressores. Nestas condições, ocorre o aumento do metabolismo anaeróbico para atender à demanda energética imposta pelo manejo devido à movimentação excessiva do cortisol dos animais (IWAMA *et al.*, 2004).

Todas as células do organismo necessitam de energia para realizar os processos metabólicos básicos à sua sobrevivência (tipicamente sob a forma de adenosina-trifosfato, ATP). Esta energia celular é produzida por três grandes processos: a glicólise, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (GUYTON e HALL, 2003; ACIERNO e MITCHELL, 2007). O lactato é um produto final da glicólise anaeróbica que ocorre em tecidos hipóxicos (POLI *et al.*, 2005).

Em geral, o aumento das concentrações do lactato é observado como resposta ao estresse em consequência da elevação do cortisol (MOMMSEN *et al.*, 1999). Animais sob estresse apresentam aumento das concentrações de cortisol e catecolaminas. O cortisol, ao agir sobre o fígado, aumenta a glicogenólise e a liberação de glicose, enquanto que as catecolaminas

aumentam a liberação de lactato pelos tecidos periféricos (CARNEIRO *et al.*, 2002; INOUE *et al.*, 2005).

Sob condições de estresse prolongado, haverá degradação intensa do glicogênio muscular, formando grandes quantidades de ácido láctico (BARTON *et al.*, 2002). A conversão de piruvato em lactato ocorre de forma mais ou menos contínua e, em situações de hipóxia tecidual, a concentração de lactato que será liberado na corrente sanguínea aumenta ainda mais (BOLTON, 2007). Caso as condições anaeróbicas persistam, ocorre sobrecarga generalizada e os tecidos que anteriormente eram capazes de reciclar este produto deixam de ser e o lactato será acumulado. Em consequência disso, situações de estresse intenso podem levar à exaustão muscular (BARTON *et al.*, 2002). Em condições normais, o reuso do lactato, produzido no músculo durante o exercício, é induzido pelos baixos níveis de cortisol e nos processos oxidativos, uma maior utilização de lactato (MILLIGAN e FARREL, 1991) é estimulada para fornecer energia aeróbica ao peixe para as suas funções locomotoras (natação). Neste propósito, IVERSEN *et al.*, (1998), no experimento com o pirarucu, observou valores iniciais de lactato altos quando comparados a outros peixes. Os autores interpretaram este resultado como decorrente da intensa natação do cardume no tanque de criação. Desta forma, o alto valor encontrado pelos autores no momento após o estímulo ( $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ ) demonstra que os peixes estavam sob situação de estresse como resposta direta ao pouco espaço disponível e a incapacidade de natação.

O salmão do Atlântico (*Salmo salar*) apresentou resposta diferente; os valores de lactato aumentaram após o estímulo e permaneceram altos por até 48 horas após o manejo (IVERSEN *et al.*, 1998).

Os valores encontrados no presente trabalho mostraram que o lactato varia ao longo do período provavelmente como resposta as condições de estocagem devido ao pouco espaço disponível e a incapacidade de natação no aquário utilizado para o experimento. Também mostraram que a resposta é ativada rapidamente após o estresse e em correspondência da passagem de escuro para luz, mesmo que a diferença entre as duas partes do ciclo circadiano não foi significativa. Durante o período observado o lactato variou entre  $0,02\text{-}0,04 \text{ mmol L}^{-1}$  evidenciando valores estatisticamente maiores do período da manhã em relação aos da tarde e da noite, confirmando o efeito da

aplicação do agente estressor e do ciclo circadiano na parte da manhã. Em geral, os valores observados não foram prejudiciais para os animais mostrando que o lactato varia ao longo do período de 24h provavelmente como resposta as condições de estocagem.

Relativamente ao colesterol, OBA *et al.*, (2009) afirmam que os picos nesta variável, podem estar relacionados ao consumo de pregnenolona (precursora do cortisol) que por sua vez, promove alterações metabólicas.

Segundo alguns autores, os níveis de colesterol em membranas plasmáticas de teleósteos não mudam (ROBERTSON e HAZEL, 1995), entretanto, para outros, podem diminuir (GABBIANELLI *et al.*, 1996) de acordo com a temperatura em que o peixe é mantido.

Outros trabalhos demonstram que o nível sanguíneo de colesterol (UMMINGER, 1969; MCCARTNEY, 1965b), bem como das proteína plasmática (GLUTH e HANK, 1983) variam conforme a temperatura da água. Além disso, sexo (MCCARTNEY, 1965a), dieta, estado nutricional (MCCARTNEY, 1965b) e estresse (WENDEMEYER, 1972) também podem levar alterações nessas variáveis. Apesar de algumas dietas dos peixes teleósteos não conterem colesterol, frequentemente esses animais possuem altas taxas desses lipídeos no sangue, demonstrando sua capacidade de sintetizá-lo e transportá-lo (HILDITCH, 1956).

Os resultados obtidos no nosso trabalho mostraram que o colesterol flutua ao longo do período observado variando entre 0,02-0,05 mg dL<sup>-1</sup>. A análise dos dados em relação ao ciclo circadiano mostraram maiores valores em correspondência da parte de luz, indicando que esta substância é mais disponibilizada nesta condição. Observamos também que os valores mais altos ocorreram na parte da tarde indicando que a resposta do colesterol não é rápida em relação à aplicação do estresse de manipulação e da passagem de escuro para luz. Outro aspecto que pode ser ressaltado para explicação deste resultado é que durante o experimento os peixes não foram alimentados e, portanto, eles podem ter ativado as reservas lipídicas para suprir a esta falta.

Alterações na concentração das proteínas plasmáticas totais podem estar relacionadas com o aumento de cortisol, já que sua elevação causa aumento da gliconeogênese e da atividade do catabolismo das proteínas (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Nos trabalhos de CARNEIRO e URBINATI (2001) e URBINATI e CARNEIRO (2001) não ocorreram diferenças estatísticas entre as médias de proteínas totais por amostra, sugerindo que animais jovens apresentam maior resistência ao estresse de manejo.

PETERS *et al.*, (1980) também não encontraram diferenças em relação aos níveis de proteínas totais em peixes submetidos a estresse não intenso, afirmando que a mobilização de proteínas como fonte energética é dependente da intensidade do estresse ao qual o animal foi submetido. Os nossos resultados estão de acordo com os autores citados visto que quase todos os valores encontrados variaram entre 0,02-0,04 g dL<sup>-1</sup> não apresentando flutuações marcadas. Isto também concorda com o fato de que todos os indivíduos utilizados eram jovens e que o estresse aplicado não foi suficiente para desencadear a resposta desta variável.

## **Conclusão**

A deficiência do manejo em aquicultura leva ao estresse, que resulta em redução das respostas imunológicas com conseqüente queda da sobrevivência, do crescimento e diminuição da capacidade reprodutiva dos peixes. Da mesma forma, importantes efeitos na homeostasia podem, também, derivar de alterações nos ritmos endógenos em respostas a determinados estímulos ambientais. De fato, o ciclo luz/escuro tem sido considerado um dos mais importantes fatores ambientais na regulação do ritmo biológico (VERA *et al.*, 2007) cujo padrão deve ser levado em conta para o sucesso da criação de determinadas espécies em cativeiro (LIGO e TABATA, 1996).

Os resultados deste trabalho fornecem informações originais e relevantes sobre o comportamento de algumas variáveis do sangue total, plasmáticas e sorológicas da tilápia do Nilo que podem ser utilizadas para avaliar o efeito do estresse causado pela manipulação durante o manejo de rotina do cultivo da espécie.

As variáveis examinadas são facilmente obtidas no âmbito do processo de cultivo e representativas dos fatores de estresse aos quais os animais são submetidos. Os resultados mostraram como são os ajustes corpóreos quando os peixes estão expostos à substância de alarme. Nossos resultados indicam

que o estresse aplicado não foi elevado e que os indivíduos se recuperaram ao longo das 24 h monitoradas.

Com base nas perguntas formuladas nos objetivos, nos podemos concluir que as variáveis: cortisol, glicose, lactato e proteínas não são afetadas pelo ciclo circadiano nem pelo efeito do estresse de manejo, não mostrando diferença significativa entre os períodos de luz e escuro. Também podemos concluir que a intensidade e frequência dos picos não foram prejudiciais para os indivíduos. Somente o colesterol mostrou relação com o ciclo circadiano apresentando valores maiores no período de luz. Isto pode estar relacionado com o fato de que os peixes não foram alimentados durante o experimento.

Em relação à parte do ciclo de 6/6h que apresentou mais influência sobre as concentrações das variáveis consideradas, vimos que o colesterol mostrou valores mais altos na parte da tarde ao contrário do lactato que teve os maiores picos na parte da manhã. Este último resultado indica que o acúmulo desta substância ocorreu em decorrência da proximidade do agente estressor aplicado e da passagem de escuro para luz.

As informações obtidas contribuem à individuação de valores de referência das variáveis do sangue, plasmáticas e sorológicas voltadas à otimização das práticas de manejo nas implantações de tilapicultura.

## Referências bibliográficas

- ACIERNO, M. J. e MITCHELL M. A. 2007. Evaluation of four point-of-care meters for determination of blood lactate concentrations in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230, 9: 1315-1318.
- ADAMANTE, W. B. 2005. Estresse de alevinos de Dourado e Mandi sob diferentes densidades e tempos de transporte. Santa Catarina, Brasil. Florianópolis, 39f (Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina). Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/101891/225333.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 de Novembro 2016.
- BARRETO, R.E. 2002. Estressor social facilita estresse na tilapia do nilo? São Paulo, Brasil. São Paulo 38f. (Dissertação de Mestrado. Unesp – Botucatu). Disponível em: <http://bv.fapesp.br/pt/bolsas/85426/estressor-social-facilita-estresse-na-tilapia-do-nilo/> Acesso em: 12 de Novembro 2016.
- BARTON, B.A.; PAULENCU, C.R.; PETER, R.E. 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 805-811.
- BARTON, B.A. e IWAMA, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- BARTON, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.
- BARTON, B.A.; SCHRECK, C.B.; SIGISMONDI, L.A., 2002. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 15: 245-251.
- BOLTON, J. D. 2007 Clinical use of lactate testing in shock states, *Seminars in Anaesthesia, Perioperative Medicine and Pain*, 26 :35-39.
- BRANDSTÄTTER, R. (2003). Encoding time of day and time of year by the avian circadian system. *Journal of Neuroendocrinology*., 15, 4 :398-404.
- BYRON, M. e BENFEY, T.J. 1994. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis Mitchill*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2, 13 :153-160.

- CARNEIRO, P. C. F. e URBINATI, E. C. 1999. "Stress" e crescimento de peixes em piscicultura intensiva." In: *III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, Campinas. Anais. CBNA*, p.25-40.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*, 32: 1-8.
- CARNEIRO P.C.F.; URBINATI, E.C. 2002. Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquaculture International*, 34: 1-9.
- CASTRO, F. J. e FERNANDES, M. N. 2009. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. *Embrapa Amapá*, 361-388.
- CYRINO, J. E. P e CONTE, L. 2006. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). *AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. Jaboticabal*, 151-171.
- DAVIS, K. B. e PETERSON, B. C. 2006 The effect of temperature, stress, and cortisol on plasma IGF-I and IGFBPs in sunshine bass. *General and Comparative Endocrinology*, 149: 219– 225.
- DEL POZO, A.; MONTOYA, A.; VERA, L.M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2012. Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiology & Behavior* . 106, 4: 446-450.
- EINARSDÓTTIR, I.E.; NILSSEN, K.J.1996. Stress responses of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) elicited by water level reduction in rearing tanks. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5, 15 : 395-400.
- ENES, P.; PANSERAT. P.; KAUSHIK, S.;OLIVA-TELLES, A. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35 : 519-539.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2007. *Fish Stats Plus: universal software for fishery statistical time series: version 2.32*.
- GABBIANELLI, R.; FALCIONI, G.; MAZZANTI,L.; BERTOLLI, E.; ZOLESSA, G. 1996. Seasonal variations of physical and biochemical membrane properties in trout erythrocytes (*Salmo irideus*). *Comparative Biochemistry & Physiology*, 114: 275-279.

- GLUTH, G e HANK, W. 1983. The effect of temperature on physiological changes in carp, *Cyprinus carpio L.*, induced by phenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 7: 373-389.
- GOLOMBEK, D. A. e AGUILAR-ROBLERO, R. 2003. Mecanismos de temporização nos vertebrados. Em: N. Marques; L. Menna-Barreto. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicações*:163-190.
- GUYTON, A.C. e HALL, J.E. 2003. Chapter 72, Energetic and metabolic rate – adenosine triphosphate function as an energy currency in metabolism. / *Textbook of medical physiology*, 11: 881-883.
- HEMPEL, E. 2002. Tilapia, the new whitefish. *Seafood international*, AGRA, 17: 16-20.
- HILDITCH, T. P. 1956 The chemical constitution of natural fats. *Chapman & Hall LTD*, 1706-1715.
- INOUE, L. A. K.; NETO, C. S.; MORAES, G. 2004. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in field procedures. *Ciência Rural, Santa Maria*, 4, 2: 563-565.
- INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. 2005. Efeito do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. *Acta Amazonica*,35 :289-295.
- IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; NILSSEN, K.J. 1998. Recovery from loading and transport stress in atlantic salmon (*Salmo salar L.*) *Aquaculture*, 168: 387-394.
- IWAMA, G.K.1993. Intensive fish productions, Guided Independent Study: Course manual. *UBC Access, University of British Columbia, Vancouver*, 130p.
- IWAMA, G.; AFONSO, L.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. 2004. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *The Journal of Experimental Biology*, 204: 15-19.
- KULCZYKOWSKA, E. e SÁNCHEZ-VAZQUEZ, F. J. 2010. Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research*.41, 5: 654-667.
- LIGO, M. e TABATA, M. 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiology & Behavior*, 60: 775-781.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; EGEA-ÁLVAREZ, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2009. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? *Physiology & Behavior*,.96, 5:.631-636.

- MADRID, J.A.; BOUJARD, T; SANCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2001. Feeding rhythms. Food Intake in Fish. *Blackwell Science*, 189-215.
- MARKUS, R. P.; AFECHÉ, S. C.; BARBOSA Jr.; E. M., LOTUFO, C. M. C.; FERREIRA, Z. S.; CIPOLA-NETO, J. 2003. Glândula pineal e melatonina. Em: IN. MARQUES; L. MENNA-BARRETO. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicação*. São Paulo, p. 191-222.
- MARQUES, M. D. 2003. Evolução da ritmicidade biológica. Em: IN. MARQUES; L. MENNA-BARRETO. (Org.). *Cronobiologia: princípios e aplicações*, São Paulo, p.269-280.
- MAZEAUD M.M., MAZEAUD F.; DONALDSON E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106: 201-212.
- MCCARTNEY, T.H. 1965a. The influence of age and sex on the total serum cholesterol level in brown trout. *Fish Research Bulletin*, 22: 42-43.
- MCCARTNEY, T.H. 1965b. The nutrition of trout. *Cortland Hatchery Report*, 33: 35-43.
- MENNA-BARRETO, L. 2003. O tempo na Biologia. In: MARQUES; L. *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo: 26-29.
- MENNA-BARRETO, L. e MARQUES, N.2002. O tempo dentro da vida, além da vida dentro do tempo. *Ciência e cultura*, 54 ,2: 44-46.
- MILLIGAN, C.L. e FARRELL, A.P. 1991. Lactate utilization by an in situ perfused trout heart: effects of workload and blockers of lactate transport. *Journal of the Experimental Biology*, 155: 357–373.
- MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Review in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.
- MONTOYA, A.; LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; GARAYZAR, A.B.S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2010. Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light–dark cycle. *Physiology & Behavior*, 101, 1: 101-107.
- MORGAN, E. 2004. Ecological significance of biological clock. *Biological Rhythm Research*, 35: 3-12.
- NOLAN, S.J.; MCNULTY, J.M.; KRISHNASAMY, R.; MCGREGOR, W.G. 1999. C8-guanine adduct-induced stabilization of a -1 frame shift intermediate in a nonrepetitive DNA sequence. *Biochemistry* 38:14056–14062.

- NOLAN, D.T. 2000. Skin response of fish stress to stressors. Nijmegen-Holanda. 211 f. (Tese Doutorado. Universidade Católica de Nijmegen-Holanda). Disponível em: <http://blog.projetopacu.com.br/wp-content/uploads/capitulo8-estresse-em-peixes.pdf>. Acesso em: 25 de novembro 2016.
- OBA, E.T.; MARIANO, W. dos S.; SANTOS, L.R.B. dos. 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá. p.226-247.
- OLIVEIRA, R. F.; GALHARDO, L. 2007. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36: 77-86.
- OLIVEIRA, C.; DINIS, M.T.; SOARES, F.; CABRITA, E.; POUSÃO-FERREIRA, P.; SÁNCHEZVÁZQUEZ, F.J. 2009. Lunar and daily spawning rhythms of Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Fish Biology*. 75, 1: 61-74.
- OLIVEIRA, R.H.; SILVA, E.M.P.; BUENO, R.S.; BARONE, A.A.C. 2010. O extrato de maracujá sobre a morfometria de hepatócitos em tilápia do Nilo. *Ciência Rural*, 40: 2562-2567.
- PANDA, S.; HOGENESCH, J. B. e KAY, S. A. 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417: 329-335.
- PARANJPE, D. A. e SHARMA, V. K. 2005. Evolution of temporal order in living organisms. *Journal Circadian Rhythms*, 3,1: 7-19.
- PETERS, G.; DELVENTHAL, H.; KLINGER, H. 1980. Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Archive fur fischereiwissenschaft*, 30, 2-3 :157-180.
- PICKERING, A.D. 1984. Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 53: 252-259.
- PICKERING, A.D. 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111 : 51-63.
- POLI, B.M.; PARISI, F.; ZAMPACAVALLO, G. 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13: 29-49.
- RANDALLI, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. 2000. Fisiologia animal: mecanismos e adaptações: *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro, 729p.
- ROBERTSON, J. C.; HAZEL, J. R. 1995. Cholesterol content of trout plasma membranes varies with acclimation temperature. *The American Physiological Society* 38: 1113–1119.

- ROCHA, R.M.; CARVALHO, E.G; URBINATI, E.C 2004. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquaculture Research*, 35 :245-249.
- ROENNEBERG, T. e MERROW, M. 2002. "What watch?... such much!"\* Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell. Tissue Research*., 309,1: 3-9.
- ROTENBERG, L.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. 2003 História e perspectivas da cronobiologia. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO (Org). *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo, 31-53.
- ROTLAND, J.; TORT, L. 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red progy previously subjected to crowding stress. *Journal of Fish Biology*, v.51: 21-28.
- SANCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MADRID, J.A.; ZAMORA, S.; LIGO, M. TABATA, M. 1996. Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: Dual and independent phasing. *Physiology & Behavior* , 60: 665-674.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; AZZAYDI M.; MARTÍNEZ F.J., ZAMORA S. MADRID, J.A. 1998 Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiology International*, 15, 6 :607-622.
- SHEEBA, V.; SHARMA, V. K.; JOSHI, A. 1999. Adaptive significance of circadian rhythms. *Resonance*: 73-75.
- SMART, G.R. 1981. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. *Stress and Fish*: 277-293.
- STRANGE, R.J.; SCHRECK, C.B.; GOLDEN, J.T. 1977. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. *Transactions of the American Fisheries*, 3, 106: 213-218.
- STRANGE, R.J.; SCHRECK, C.B.; EWING, R.D. 1978. Cortisol concentrations in confined juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Transactions of the American Fisheries*, 6, 107: 812-819.
- TEIXEIRA FILHO, A.C.1991. Piscicultura ao alcance de todos. *São Paulo: Nobel*: 212.
- UMMINGER, B. L. 1969. Physiological studies on supercooled killifish (*Fundulus heteroclitus*). I Serum inorganic constituents in relation to osmotic and ionic regulation at subzero temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 172:283-302.
- URBINATI, E.C. e CARNEIRO, P.C.F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.;

- FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. *Sociedade Brasileira de Aqüicultura e biologia Aquática*, 171-193.
- VERA, L.M.; DE PEDRO, N.; GÓMEZ-MILÁN, E.; DELGADO, M.J.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology & Behavior*. 90, 2-3: 518-524.
- VERA, L.M.; CAIRNS, L.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MIGAUD, H. 2009. Ritmos circadianos de atividade locomotora na tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. *Cronobiologia Internacional*, 26, 4: 666-681.
- VIJAYAN, M.M.; BALLANTIYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. 1991. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology*.82:476-486.
- VIJAYAN, M..M. e MOON, T.W. 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *The Canadian Journal of Zoology*, 72:379-382.
- VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.G. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 116C, 1:89-95.
- WEDEMEYER, G. 1972. Some physiological consequences of handling stress in the juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Research Board of Canada*,.29: 1780-1783.
- WENDEELAR-BONGA SE. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77:591–625.