

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA**

**EFEITO DO ETANOL  
NA RELAÇÃO PRESA-PREDADOR  
EM PEIXES ZEBRA (*Danio rerio*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Thiago Acosta Oliveira**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**

**EFEITO DO ETANOL  
NA RELAÇÃO PRESA-PREDADOR  
EM PEIXES ZEBRA (*Danio rerio*)**

**Thiago Acosta Oliveira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada a Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Acosta Oliveira, Thiago  
EFEITO DO ETANOL NA RELAÇÃO PRESA-PREDADOR EM PEIXES  
ZEBRA (DANIO RERIO) / Thiago Acosta Oliveira.-2013.  
55 p.; 30cm

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Peixe Zebra (Danio rerio), etanol, comunicação  
química, cortisol. I. José Gil Barcellos, Leonardo II.  
Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Linha de Pesquisa-farmacologia Aplicada a Produção Animal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO ETANOL NA  
RELAÇÃO PRESA-PREDADOR  
EM PEIXES ZEBRA (*Danio rerio*)**

elaborada por  
**Thiago Acosta Oliveira**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Comissão Examinadora:**

**Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos (UFSM)**  
(Presidente – Orientador)

**Prof. PhD. Angelo Luis Stapassoli Piato (Unochapecó)**

**Prof. Dr. Denis Rosemberg (Unochapecó)**

Santa Maria, 16 de julho de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me proporcionou a vida e a fé que tenho nele.

Aos meus pais, Paulo e Cristina, pelos ensinamentos, educação e carinho, por me acompanharem em todos os momentos da minha vida, sempre apoiando e incentivando minhas conquistas, sendo muito importantes para que eu superasse mais esta etapa.

Aos meus dois irmãos menores, Igor e Lucas, pelos momentos de alegria, pelo amor e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos, por ter aberto as portas do mundo da pesquisa, pela oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo e obter o título de mestre.

Agradeço a Dra. Michele Fagundes e as colegas Daiane e Gessi pelas correções realizadas na dissertação, assim como aos demais colegas de laboratório que também auxiliaram na realização deste trabalho com o coleguismo e companheirismo que sempre me proporcionaram, agradeço pela convivência enriquecedora e pelo profissionalismo.

Agradeço aos meus amigos por terem me incentivado em minhas conquistas e me ajudado a aprender com a vida, agradeço pela amizade que perdura mesmo na distância.

Ao Programa de Pós Graduação em farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria pela concessão da bolsa CAPES.

Enfim a todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO DO ETANOL NA RELAÇÃO PRESA-PREDADOR EM PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*)**

AUTOR: Thiago Acosta Oliveira

ORIENTADOR: Leonardo José Gil Barcellos

Data e Local da Defesa: Passo Fundo, 16 de julho de 2013.

Recentemente o peixe zebra (*Danio rerio*) tem sido amplamente utilizado em pesquisas ligadas as propriedades ansiolíticas e mecanismos farmacológicos do alcoolismo. Pesquisas anteriores tem demonstrado seus efeitos em diversos parâmetros comportamentais, similares aos já verificados na exposição a drogas ansiolíticas. Atenuação das reações de medo, ocasionadas pela presença do predador também tem sido demonstradas, em decorrência da exposição ao etanol. A detecção da presença do predador pode ocorrer de maneira visual, onde o peixe ameaçado tem a capacidade de comunicar demais indivíduos sobre o risco, através da liberação de substância química, denominada substância distúrbio. A ameaça predatória ocasiona ajustes fisiológicos em consequência da resposta de estresse, que tem por objetivo manter a homeostase do animal, sendo a secreção do hormônio cortisol o principal indicador desta resposta. Uma vez que o etanol pode afetar as reações de medo, avaliamos seus possíveis efeitos no aumento dos níveis de cortisol de peixes zebra, em consequência da exposição visual ao predador e percepção da substância distúrbio. Finalmente, nosso trabalho demonstrou por primeira vez a interferência de baixas doses de etanol (0,25%, 0,50% e 1%) em exposição aguda, na resposta de estresse desencadeada pela presença do predador, bloqueando a secreção de cortisol tanto em peixes zebra doadores como peixes zebra receptores da substância distúrbio. Na ausência de etanol, detectamos resposta de estresse com aumento dos níveis de cortisol tecidual em peixes doadores de substância distúrbio devido a presença do predador, assim como em peixes receptores devido a percepção da informação química. Tendo isto em conta, postulamos que o etanol pode interferir na percepção visual do predador e/ou a secreção de substância distúrbio, assim como na capacidade de detecção desta substância por peixes receptores.

**Palavras chave:** Peixe zebra (*Danio rerio*). Cortisol. Etanol

## **ABSTRACT**

Master Course Dissertation  
Graduation Program in Pharmacology  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFFECT OF ALCOHOL IN PREY-PREDATOR RELATIONSHIPS IN ZEBRA FISH**

**AUTHOR:** Thiago Acosta Oliveira

**ADVISER:** Leonardo José Gil Barcellos

**Defense Place and Date:** Passo Fundo, July, 16<sup>nd</sup>, 2013.

Currently, the zebrafish (*Danio rerio*) is widely used in research related to anxiolytic properties and pharmacological mechanisms of alcoholism. Previous research has shown its effects on several behavioral parameters, similar to that already observed in exposure to anxiolytic drugs, as well as attenuation of fear responses against the predator. The detection of the presence of predator can occur in a visual way, and threatened fish has the ability to communicate about risk to other individuals through the release of a chemical called disturbance substance. The predatory threat causes physiological adjustments as a result of the stress response, which aims to maintain the homeostasis of the animal, and the secretion of the hormone cortisol, the main endocrine indicator of this response. As ethanol can affect the reactions of fear, we evaluated its possible effects on cortisol levels in zebrafish as a result of exposure to the visual perception of predator and disturbance substance. Finally, our study demonstrated for the first time the interference of low doses of ethanol (0.25%, 0.50%, and 1%) for acute exposure on the stress response triggered by the presence of the predator, blocking cortisol secretion in both fish: donors and receivers. In the absence of ethanol, we detected stress response with an increase in cortisol levels in fish tissue disturbance substance of donor fish due to the presence of predators, as well as in fish receptors due to the perception of chemical information. Therefore, we postulate that ethanol may interfere with the visual perception of both predator and/or secretion of disturbance substance, as well as the ability to detect this substance.

**Keywords:** Zebrafish (*Danio rerio*). Cortisol. Ethanol.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
1.1 Resposta de estresse .....	8
1.2 Peixe zebra como modelo experimental .....	9
1.3 Peixe zebra e poluição ambiental .....	11
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Local de experimentação e testes .....	14
3.2 Animais e condições de manutenção .....	14
3.3 Substância testada .....	15
<b>ESTUDOS REALIZADOS .....</b>	<b>15</b>
4.1 Estudo 1 - Teste agudo de estresse.....	15
4.2 Estudo 2 - Efeito do etanol na relação presa-predador.....	15
4.3 Estudo 3 – efeito da presença da bomba submersa .....	18
5.1 Procedimento relação presa-predador .....	18
5.2 Coleta e análise de cortisol.....	19
5.3 Análise estatística.....	19
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
6.1 Estudo 1 - Teste agudo de estresse.....	20
6.2 Estudo 2 - Relação presa-predador .....	21
6.2.1 Resultado para a concentração de 0,25% .....	21
6.2.2 Resultado para a concentração de 0,50% .....	22
6.2.3 Resultado para a concentração de 1,00% .....	23
6.3 Estudo 3 – efeitos da presença da bomba submersa.....	24
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>8. ARTIGO PLUBLICADO NA REVISTA Plos ONE.....</b>	<b>27</b>
<b>9. Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish .....</b>	<b>28</b>
9.1 Abstract .....	28
9.2 Materials and Methods.....	29
9.2.1 Ethical Note.....	29
9.2.2 Animals .....	29
9.2.3 Experimental Design – General Information .....	29
9.2.4 Study 1 - Communication of Predation Risk in Fish Exposed to Alcohol.....	30
9.2.5 Study 2 – Alcohol Effects on Stress Response .....	32
9.2.6 Study 3 – Effects of a Submersible Pump.....	32
9.2.7 Procedures and Techniques – Cortisol Extraction and Analysis.....	33



9.2.8 Statistical Analysis .....	34
9.3 Results .....	34
9.3.1 Study 1 – Alcohol Concentration of 0.25% .....	34
9.3.2 Study 1 – Alcohol Concentration of 0.50% .....	34
9.3.3 Study 1 – Alcohol Concentration of 1.00% .....	35
9.3.4 Study 2 – Effect of Alcohol on Stress Response.....	37
9.3.5 Study 3 – Effect of the Submersible Pump .....	37
9.5 Author Contributions .....	40
9.6 References.....	41
<b>10. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>11. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## INTRODUÇÃO

Em um contexto ecológico, a relação presa-predador faz parte da manutenção da vida, sendo um fator de mortalidade importante para muitos organismos aquáticos, onde um evento de predação pode ser descrito como um ciclo com a busca por parte do predador que encontra, ataca, captura e finalmente ingere a presa (BRONMARK & HANSSON, 2000). O encontro entre presa e predador, pode ocorrer de maneira direta quando o predador tem a oportunidade de atacar e comer a presa, e ou indireta quando a presa detecta a presença do predador por sinais químicos, olfatórios, visuais e/ou acústicos (BARCELLOS *et al.*, 2007). Tanto o contato direto quanto o indireto com um predador pode ser uma fonte significativa de estresse para os peixes. Assim um encontro com um possível predador pode ser considerado com uma situação estressante e induz uma resposta de estresse com um custo de energia para a fuga (BELL *et al.*, 2007).

A capacidade do animal em desenvolver comportamento antipredatório pode ocorrer através de aprendizagem, sendo que depois de várias exposições a um predador e de ter experimentado seus efeitos nocivos, os membros de uma determinada espécie podem desenvolver comportamentos para evitar esses contatos (“avoidance behavior”). Alternativamente, as diferentes espécies talvez tenham evoluído uma predisposição genética que direcione o comportamento a fim de evitar o predador logo no primeiro encontro. Aparentemente a evolução favoreceu a este último tipo de aprendizagem em um número de espécies. Existem numerosos exemplos para estes fenômenos em peixes (STEPHANIE *et al.*, 2008).

A comunicação química entre peixes expostos a risco de predação já foi verificada por WISENDEN *et al.*, (1995) mostrando que indivíduos da espécie *Etheostoma exile* visualmente estimulados por um modelo artificial de predador liberaram substâncias químicas que induziram seus coespecíficos (indivíduos da mesma espécie) a adotarem postura de alerta, sugerindo a possibilidade de que este tipo de sinal, denominado de substância distúrbio, seja liberado na urina, demonstrando não ser necessária lesão tecidual em peixes para que ocorra tal comunicação.

Sinais químicos representam fontes importantes de informações, tendo grande importância em ambientes de visibilidade limitada, devido à turbidez ou baixa luminosidade, ou mesmo quando o animal possui visão pouco desenvolvida (JORDÃO e VOLPATO, 2000; WISENDEM, 2000). Nesse contexto o olfato dos peixes é de extrema eficiência para detecção de sinais químicos na água, diminuindo o risco de predação (HONDA *et al.*, 2008).

Segundo WISENDEN (2000), o reconhecimento de um predador depende da combinação de feromônios de distúrbio, que comumente são denominados de substância de alarme quando da presença de lesão tecidual, e substância distúrbio quando na ausência de lesão tecidual. Sinais olfatórios liberados pelo predador referentes a sua dieta e seu odor característico também podem ser uma fonte de contato indireto. O reconhecimento visual de um predador também tem grande importância para que os peixes ameaçados possam desenvolver comportamento antipredatório. BELL *et al.*, (2007) registraram níveis elevados de cortisol em indivíduos da espécie *Gasterosteus aculeatus* visualmente estimulados por um predador, sendo que estes foram registrados 15 minutos após a exposição e se mantiveram por 60 minutos.

Reconhecimento visual de risco de predação já foi descrito em *Piaractus mesopotamicu* que sinalizaram coespecíficos sobre o risco de predação por intermédio de substância distúrbio, não ocorrendo contato visual nem acústico entre estes grupos de peixes coespecíficos (JORDÃO e VOLPATO, 2000). BRYER *et al.*, (2001) verificaram que peixes da espécie *Cottus cognatus* perceberam o risco de predação através do contato com substância distúrbio liberada por coespecíficos, assim como TOA *et al.*, (2004) constataram elevação nos níveis de cortisol em *Onchorhynchus mykiss* como resposta ao estresse ocasionado pela detecção de substância distúrbio liberada por coespecíficos.

Aumento nos níveis de cortisol tecidual em *Oreochromis niloticus* e *Rhamdia quelen*, em consequência do contato com feromônios liberados por coespecíficos estressados foi relatado por BARCELLOS *et al.*, (2011), na presença de barreiras visuais e acústicas. Os autores sugerem que por ter ocorrido em duas espécies filogeneticamente distintas, esta resposta de estresse foi ocasionada por um mecanismo de comunicação muito primitivo. O feromônio de distúrbio é liberado quando a presa é perseguida ou ameaçada (WISENDEN *et al.*, 1995). A principal hipótese é que este feromônio seja liberado junto a um pulso de urina realizado pela presa ameaçada (KIESECKER *et al.*, 1999).

Ao perceber a ameaça os peixes, incluindo peixes zebras, adotam um postura de alerta denominada resposta de alarme (KORPI *et al.*, 2001). Este tipo de resposta pode ocorrer devido ao rompimento de células especializadas da epiderme, responsáveis pela produção e armazenamento de substância de alarme (WISENDEN *et al.*, 2004), sendo que o mesmo tipo de resposta já foi constatada em *Oreochromis niloticus* (BARRETO *et al.* 2010). No entanto, BARRETO *et al.*, (2013) verificaram comportamento antipredatório em *Oreochromis niloticus* decorrente do contato com sinais químicos presentes no sangue de peixes

coespecíficos, demonstrando a importância da capacidade de substâncias existentes inclusive no sangue provocar resposta de alarme.

### 1.1 Resposta de estresse

O mecanismo da resposta fisiológica ao estresse responsável pela secreção de cortisol tem sido amplamente estudado em peixes zebra (ALSOP & VIJAYAN, 2008, ALSOP & VIJAYAN 2009), e sua semelhança com a resposta hormonal ao estresse em humanos aumenta a relevância da espécie como modelo de estudo em respostas ao estresse relacionadas a medo e ansiedade (GERLAI, 2010). Este tipo de resposta é exemplificada por BARCELLOS *et al.*, (2007) que detectou níveis elevados de cortisol em peixes zebra expostos visualmente a um predador. Nesta espécie, assim como em humanos, o cortisol é o principal hormônio de resposta ao estresse diferente ao que ocorre em roedores onde o papel principal na resposta ao estresse é desenvolvido pelo hormônio corticosterona.

Correlação entre respostas comportamentais e de estresse (cortisol) também tem sido bem documentadas para a espécie. Após tratamento crônico com fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina, também conhecido pelo nome comercial como Prozac), peixes zebra apresentaram vários sinais de redução de medo bem como reduzidos níveis de cortisol tecidual de corpo inteiro (EGAN *et al.*, 2009), sendo estas respostas semelhantes as já observadas em roedores (DULAWA *et al.*, 2004), demonstrando a utilidade desta espécie de peixe como modelo experimental em estudos relacionados a fisiologia da resposta ao estresse e ansiedade em humanos.

A resposta ao estresse é uma resposta integrada de um organismo, que desempenha um papel crucial nos processos homeostáticos. Coordenada pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), a resposta é iniciada por um estímulo externo ou interno referido como estressor (BONGA, 1997), que é o termo utilizado para definir qualquer fator capaz de alterar a homeostase do peixe (SMITH, 1982). Sendo os estressores ligados a condições ambientais, sociais e comportamentais, que ao estimularem o sistema nervoso central (SNC-Hipotálamo) dão início a resposta ao estresse (BARTON, 2002).

MCWEN *et al.*, (2003) definem que o estresse surge quando a influência negativa do estressor excede a capacidade do indivíduo de lidar e manter a homeostase, produzindo o que tem sido chamado de sobrecarga alostática.

Durante a resposta fisiológica ao estresse ocorre a produção do hormônio glicocorticoide cortisol pelo eixo HHI, esse hormônio desempenha um papel essencial na

restauração da homeostase após uma resposta de estresse (BONGA, 1997). O caminho para a liberação de cortisol inicia no eixo HHI com a liberação do fator de liberação de corticotrofina (CRF) principalmente pelo hipotálamo, que por sua vez estimula a glândula hipófise a liberar o ACTH (hormônio adenocorticotrófico), que via circulação chega ao tecido interrenal, estimulando a liberação de cortisol (BARTON, 2002).

O ciclo circadiano de liberação de cortisol em seu tempo e magnitude são variáveis, dependendo provavelmente da severidade e duração do estressor a que os peixes foram submetidos (SUMPTER *et al.*, 1985). A liberação de cortisol também é influenciada pela idade, tamanho e espécie testada, KOAKOSKI *et al.*, (2012); demonstraram que alevinos (60 dias de vida) e juvenis (180 dias de vida) de *Rhamdia quelen* alcançaram picos de liberação de cortisol entre 5 e 30 minutos após aplicação de estressor, enquanto adultos (360 dias de vida) desta mesma espécie tiveram seu pico de liberação de cortisol registrado após 60 minutos de exposição a estressor de manipulação. Estudo publicado pelo mesmo grupo, BARCELLOS *et al.*, (2012) demonstrou o papel determinante da idade nos diferentes perfis de respostas de cortisol ao estresse em peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Em peixes zebra, o pico nos níveis de cortisol tecidual de corpo inteiro foram registrados por RAMSAY *et al.*, (2009) entre 9 e 15 minutos após aplicação de fator estressante em indivíduos adultos.

## **1.2 Peixe zebra como modelo experimental**

O peixe zebra (*Danio rerio*), popularmente conhecido como paulistinha, é um importante organismo modelo para vários campos das ciências. Seu rápido desenvolvimento, facilidade de manutenção, disponibilidade de aquisição e aplicabilidade em experimentos foram fatores que fizeram expandir sua aplicação original (o estudo do desenvolvimento neural em vertebrados e genômica) para a utilização em várias outras áreas como estudos de toxicologia, biologia reprodutiva, neurobiologia, medicina regenerativa, estudos sobre teorias da evolução e estudos comportamentais (BRADBURY, 2004).

Cientistas que trabalham com controle genético do desenvolvimento do sistema nervoso central e comportamento precisam encontrar um quadro comum no qual a complexa interação entre genes e comportamento possam ser estudados. Tradicionalmente os roedores tem sido visto como um modelo de escolha. No entanto, seu comportamento complexo, encéfalo relativamente grande e tipo de reprodução mamífera (fecundação interna, desenvolvimento intra-uterino, e os cuidados pós-natal), significam que um modelo mais simples teria algumas vantagens (MIKLOSI & ANDREW, 2006), o que contribui para que o

peixe zebra esteja se tornando rapidamente um modelo experimental popular nas pesquisas neurocomportamentais.

Seu comportamento é robustamente afetado por manipulações ambientais e farmacológicas, podendo ser estudado baseado em paradigmas de comportamento exploratório, em paralelo com respostas do sistema endócrino (cortisol) ao estresse (CACHAT *et al.*, 2009). Afirma-se que a análise do comportamento é uma ferramenta poderosa com a qual a função do cérebro pode ser estudada, e o peixe zebra representa um excelente modelo para tal análise (GERLAI, 2003), onde a mensuração das concentrações de cortisol podem também ser utilizada como um método complementar para desenvolver ensaios sobre estudos comportamentais (CANAVELLO *et al.*, 2011, BARCELLOS *et al.*, 2010, CACHAT *et al.*, 2009).

Dada a uma extensa homologia de seu genoma com o de outras espécies de vertebrados, inclusive a dos mamíferos, e dada às ferramentas genéticas disponíveis, o peixe zebra tornou-se um popular organismo modelo (GERLAI, 2003), sendo um ideal modelo experimental vertebrado para estudo de numerosas doenças humanas com o qual pode ser feito o estudo dos mecanismos biológicos e genéticos destas doenças (GERLAI *et al.*, 2000) aonde um potencial alvo de análise são as doenças relacionadas a dependência química, como por exemplo o alcoolismo (GERLAI *et al.*, 2000).

Estudos epidemiológicos indicam que o abuso do álcool acarreta expressiva morbimortalidade e que problemas direta ou indiretamente causados pelo abuso do álcool relacionam-se a importantes prejuízos econômicos em todo o mundo (GALASSI *et al.*, 2008). Esta realidade também é verificada em nosso país, onde o álcool contribui fortemente na etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde (GALDURÓZ & CAETANO, 2004). Exposição aguda de peixes zebra ao álcool demonstrou reduzir a ansiedade (um estado comportamental não induzido diretamente por estímulo) e prejudicar as respostas comportamentais induzidas pelo medo em peixes zebra (LUCA e GERLAI, 2012).

Há um interesse crescente em peixes zebra como organismo modelo para pesquisas comportamentais e/ou farmacológicas (GEBAUER *et al.*, 2011). Peixes desta espécie podem ser imersos em soluções de etanol por períodos prolongados de tempo se necessário, permitindo a entrega da droga através de método não invasivo (GERLAI *et al.*, 2006).

A administração de etanol nesta espécie através deste método é simples: o animal esta imerso na solução de etanol e as concentrações no sangue cerebral atingem níveis estáveis dentro de 40 minutos (PAN *et al.*, 2011). O etanol misturado na água do tanque dos peixes é

absorvido pelos vasos sanguíneos brânquiais e da pele, fazendo com que os níveis sanguíneos de etanol entrem em equilíbrio com os níveis externos do tanque rapidamente (GERLAI *et al.*; 2000). Isto demonstra que este método de dosagem pode ser superior aos paradigmas de auto-administração da droga ou exposição passiva ao etanol, métodos utilizados em mamíferos de laboratório (PAN *et al.*; 2011).

Tem sido demonstrado que níveis significativos de etanol no cérebro de peixe zebra adulto podem ser detectados após 15 minutos de exposição a uma concentração de 0,50% de etanol, mantendo níveis estáveis até 24 horas pós-exposição sem diferenças significativas entre as distintas linhagens (DUGLOS & RABIN, 2003).

Efeito do etanol sobre o SNC a nível celular é puramente depressor, embora aumente a atividade neuronal presumivelmente por desinibição em algumas partes do SNC. As principais teorias da ação do etanol: aumento da inibição mediada por GABA (aumento da ação do GABA sobre receptores GABA<sub>A</sub>, semelhante aos benzodiazepínicos), inibição do transporte de adenosina, inibição da liberação de transmissor em resposta à despolarização em terminações nervosas por inibição da abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem nos neurônios e efeitos excitatórios do glutamato inibidos pelo etanol (inibição da função dos receptores NMDA) (RANG & DALE, 2007, p628).

### **1.3 Peixe zebra e poluição ambiental**

De todos os problemas causados pelo excesso de poluição ambiental, um dos mais importantes é a contaminação das águas e a consequente escassez de recursos hídricos de boa qualidade (PACHECO & SANTOS, 2001). Os vazamentos dos tanques de gasolina contribuem fortemente para a escassez destes recursos hídricos, representando um sério problema ambiental, especialmente quando contaminam aquíferos. Para exemplificar, a mais importante fonte de contaminação de águas subterrâneas, nos Estados Unidos, é o vazamento de tanques subterrâneos (USEPA, 2000).

Estes vazamentos em tanques de combustíveis enterrados foram observados em todo mundo com frequência a partir do final da década de 1980, visto que muitos tanques foram instalados ao final da década de 1960 e a longo da década de 1970, sendo sua vida útil de cerca de 25 anos (SCHMIDT, 2010).

O álcool etílico hidratado (etanol) contém pequeno percentual de água e é utilizado no Brasil como combustível nos motores dos veículos a álcool, bem como para fins industriais. Atualmente, o uso de etanol como combustível ganhou notoriedade como alternativa verde

aos combustíveis fósseis. Existe uma grande perspectiva dos produtores de cana-de-açúcar em aumentar a exportação desse combustível, principalmente para os Estados Unidos, visto que o álcool americano é produzido a partir do milho, o que o torna menos competitivo que o nosso em função de sua baixa produtividade (FERREIRA, 2007).

A gasolina comercializada no Brasil é bastante diferenciada de outros países, pois é misturada com 22% de etanol (CORSEUIL e MARINS, 1997), que é composto por dois átomos de carbono, cinco átomos de hidrogênio e um íon OH, cuja fórmula é  $C_2H_5OH$  (FERREIRA, 2007).

Visto que o etanol é uma substância utilizada em larga escala na indústria química e como combustível, destacamos a importância de pesquisar os seus possíveis efeitos em organismos aquáticos, decorrentes de derramamentos e contaminações ambientais ocasionadas na sua produção, armazenamento e transporte.

Comunicação química entre peixes expostos ao predador e a relação deste evento com a produção de cortisol ainda tem sido pouco estudado, assim como a interferência do etanol nas relações tróficas e no eixo HHI. É importante determinar se há influência por parte do contaminante na produção ou transferência de sinal químico entre presas, pois, durante o evento de predação é importante que as presas possuam suas respostas antipredatórias funcionais, sendo que uma contaminação por etanol poderia favorecer espécies de predadores que não são afetadas pela qualidade da água, como, por exemplo, espécies aviárias e mamíferas, ocasionando desequilíbrio de espécies a nível populacional. Espécies de predadores que não são afetadas pelas concentrações de amônia na água, como aviárias e mamíferas tem uma maior probabilidade de obter sucesso na predação da truta marrom em água poluída com amônia, por exemplo (TUDORRACHE *et al.*, 2008).

É esperado que os sinais químicos aumentem a sobrevivência do indivíduo conscientizando-o de possíveis mudanças ambientais (BARCELLOS *et al.*, 2011). Por isso destacamos a importância de estudar uma possível alteração neste tipo de comunicação química em um contexto de contaminação ambiental. Também destacamos a importância de se verificar os efeitos do etanol no eixo HHI, como meio de gerar dados para a realização de pesquisas relacionadas aos mecanismos farmacológicos do alcoolismo e efeitos do etanol sobre as respostas de estresse. Sendo assim, estudamos as relações presa-predador e um possível efeito do etanol nestas, avaliando os níveis de cortisol tecidual de corpo inteiro de peixes zebra.



## OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar se o etanol interfere na relação presa-predador, especificamente reconhecimento visual da situação de risco e na comunicação química desse risco entre os coespecíficos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Verificar se o álcool interfere na resposta de cortisol ao estresse agudo;
- Identificar o reconhecimento visual do predador pela presa e ativação do eixo de estresse;
- Identificar se a exposição à água de coespecíficos em contato visual com o predador desencadeará ativação do eixo do estresse no grupo alvo;
- Verificar se o etanol em diferentes concentrações interfere no reconhecimento visual do predador pela presa e na ativação do eixo do estresse;
- Verificar se o etanol em diferentes concentrações interfere na ativação do eixo do estresse no grupo alvo exposto à água de coespecíficos em contato visual com o predador.
- Verificar se a presença da bomba submersa interfere na resposta de estresse.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética da Universidade de Passo Fundo, sob o número de 013/2012 e reúne as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; <http://www.cobea.org.br>).

### 3.1 Local de experimentação e testes

Este trabalho foi inteiramente desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Peixes do Hospital Veterinário, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Universidade de Passo Fundo (UPF), Campus I, Passo Fundo.

### 3.2 Animais e condições de manutenção

No total foram utilizados 954 peixes zebra (*Danio rerio*) (short fin) adultos para dosagem de cortisol, de ambos os sexos com peso entre 0,5 e 1,5 gramas, provenientes do Laboratório de Piscicultura do Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO). Os peixes permaneceram na densidade de um exemplar para cada dois litros de água, em tanques de plástico, sob fotoperíodo de 14 horas claro e 10 escuro, aeração constante, abastecidos com água previamente declorada.

Inicialmente os animais foram mantidos em uma sala de bioensaio durante 10 dias, alimentados 3 vezes ao dia com ração comercial (Tetramin®). Foram utilizados peixes das espécies *Atrionotus ocellatus* e *Carassius auratus*, como estímulo predatório e não predatório, respectivamente, ambos oriundos do Laboratório de Fisiologia de Peixes e mantidos nas mesmas condições dos peixes zebra. A temperatura média foi de 28°C, amônia total <0.01 mg L<sup>-1</sup>, oxigênio dissolvido 5,8 mg/L, dureza total de 6 mg/L e pH médio igual a 7 e alcalinidade igual a 22 mg L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>; estes níveis foram mantidos tanto no período de aclimatação quanto no período de experimentação, encontrando-se dentro dos padrões para a espécie.

Todos os experimentos foram realizados em uma sala isolada. Vinte e quatro horas (24h) antes dos experimentos, os peixes foram transferidos para o ambiente experimental com condições idênticas ao ambiente de alojamento dos peixes, reduzindo variações nos ensaios. A fim de evitar influência das variações do ciclo circadiano na secreção de cortisol, todas as

coletas foram realizadas no mesmo período do dia (11:00 am). A alimentação dos animais utilizados como estímulo predatório ou não-predatório foi suspensa 24 horas antes do início do período experimental com o objetivo de incentivar possível comportamento predatório.

### **3.3 Substância testada**

As exposições ao etanol foram realizadas nas concentrações 0,25%, 0,50% e 1% com base em achados prévios por GERLAI *et al.*, (2000, 2006, 2011).

## **ESTUDOS REALIZADOS**

### **4.1 Estudo 1 - Teste agudo de estresse**

Este estudo objetivou verificar se a presença de etanol na água na concentração intermediária de 0,50%, afeta a resposta ao estresse agudo em peixes zebra. Para isso foi procedido um teste agudo de estresse na presença dessa concentração de álcool.

Foram utilizados 72 peixes zebra distribuídos em 6 aquários, três com a concentração testada de etanol mais três para o grupo controle. No início do procedimento os peixes foram submetidos à exposição ao etanol na água durante 15 minutos. Após esse período foi aplicado estímulo de estresse por perseguição ativa com rede durante 2 minutos. Em seguida os peixes foram coletados no tempo 15 minutos após o estímulo de estresse para análise de cortisol tecidual, tempo esse determinado para o pico de liberação de cortisol pós-estresse em peixe zebra (RAMSAY *et al.*, 2006).

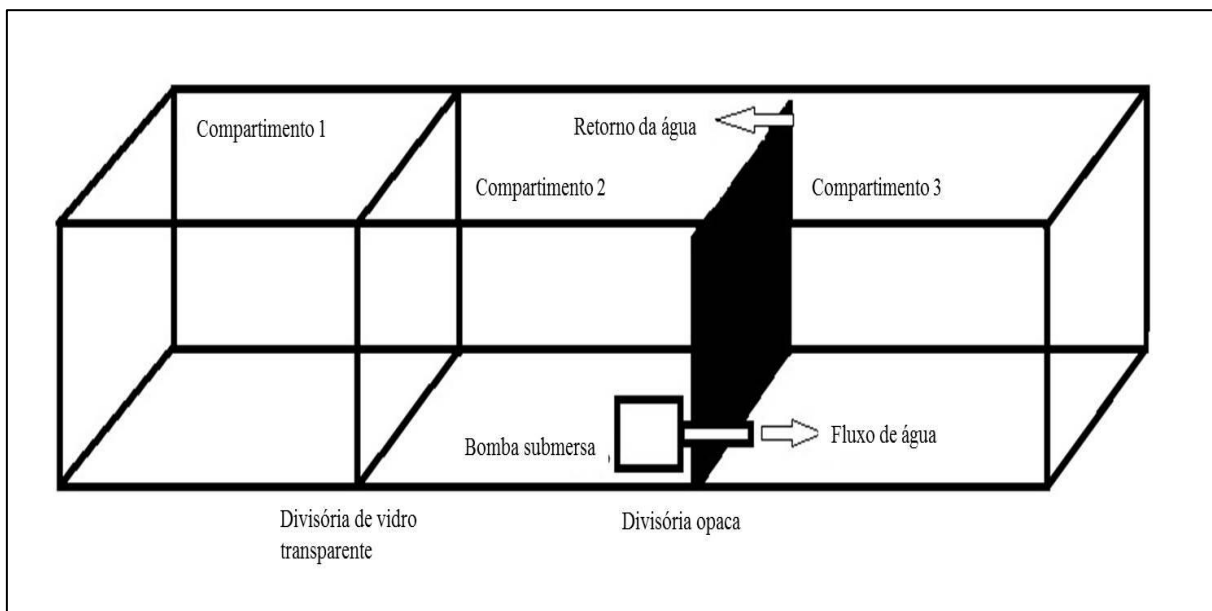
### **4.2 Estudo 2 - Efeito do etanol na relação presa-predador**

Esse estudo objetivou verificar se a presença de álcool na água nas concentrações de 0,25% 0,50% e 1,00% afeta o reconhecimento do predador pelos peixes zebra e/ou a comunicação de sua presença aos seus coespecíficos.

Em aquário de formato retangular foram distribuídos 10 peixes por compartimento (tamanho total do aquário: 120 x 40 x 40, comprimento, largura e altura respectivamente), este aquário foi subdividido em três compartimentos iguais de 45 cm (Figura 1)

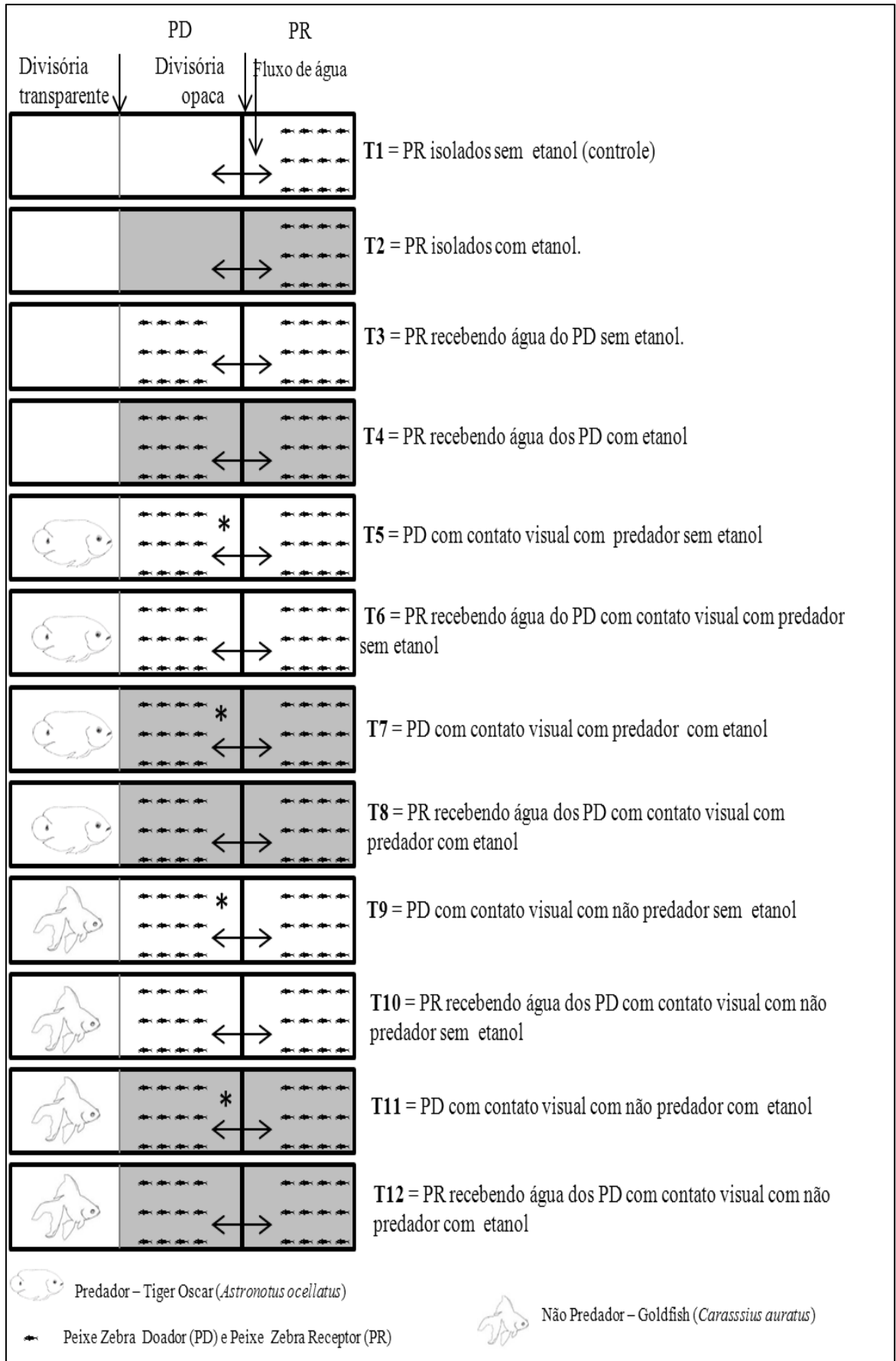
permanecendo da seguinte forma: compartimento 1 - peixe estímulo predatório (*Astronotus ocellatus*) ou não predatório (*Carassius auratus*); compartimento 2 - peixes zebra doadores da substância de distúrbio e compartimento 3 - peixes zebra receptores da substância de distúrbio supostamente liberada pelos peixes zebra do doador, denominados de peixes alvo .

O contato visual entre o peixe estímulo e peixes doadores foi proporcionado pela divisória de vidro transparente entre os compartimentos 1 e 2. O grupo receptor (grupo alvo) permaneceu num compartimento delimitado por uma placa opaca e, portanto, não teve contato visual com os demais peixes, mantendo contato com o grupo doador, unicamente através da água cujo fluxo foi reforçado através de bombeamento entre os compartimentos (Figura 1).



**Figura 1-** Desenho esquemático do aquário experimental.

Na figura 2, estão esquematizados os grupos experimentais que foram realizados:



**Figura 2** - Esquema dos grupos experimentais

### 4.3 Estudo 3 – efeito da presença da bomba submersa

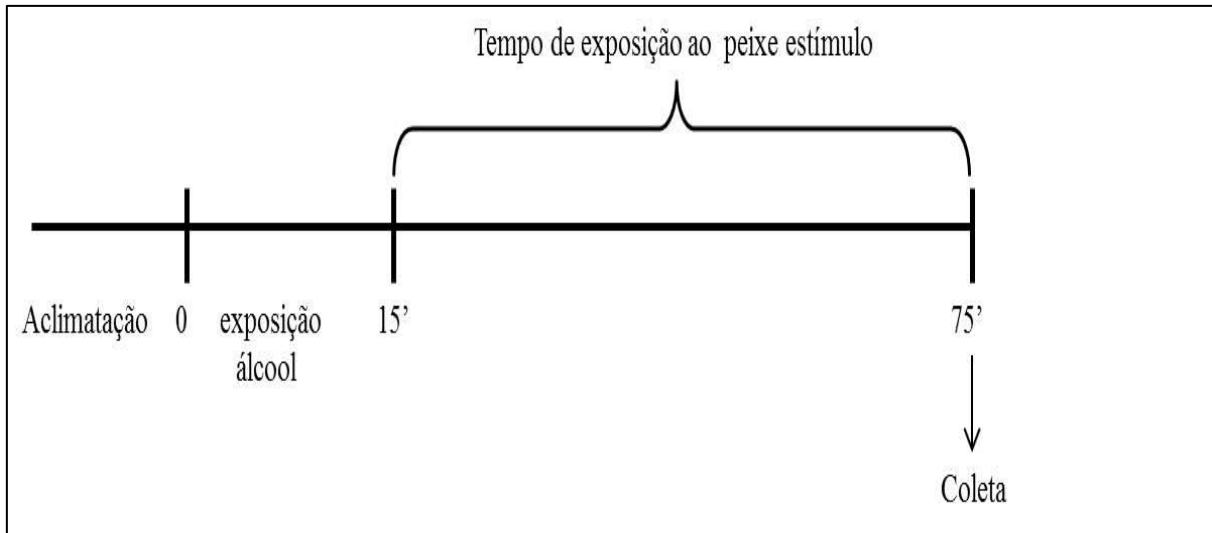
Uma vez que tanto a presença da bomba quanto o ruído e vibração associados ao seu funcionamento podem interferir na percepção e/ou na resposta de estresse, nesse estudo objetivamos verificar se esses possíveis efeitos estavam presentes. Para isso, foram constituídos três grupos experimentais com três replicatas cada. O primeiro grupo (T1) consistia em aquários com seis peixes zebra cada sem a presença de bomba submersa. Os peixes ficavam nesses aquários pelo período de adaptação idêntico aos demais experimentos e depois eram coletados para determinação de cortisol corporal. O segundo grupo era idêntico ao primeiro exceto pela presença da bomba desligada e o terceiro pela presença da bomba ligada.

## PROCEDIMENTOS REALIZADOS

### 5.1 Procedimento relação presa-predador

Todos os experimentos foram realizados em uma sala isolada com condições idênticas ao ambiente de alojamento. No dia anterior aos experimentos, os peixes estímulo foram mantidos em jejum para incentivar o comportamento predatório.

Os peixes foram distribuídos nos respectivos compartimentos e permaneceram durante 15 minutos em exposição ao etanol na água. Após esse período os grupos doadores foram expostos ao contato visual com o peixe estímulo durante 60 minutos e, em seguida, ambos peixes doadores e receptores foram coletados para análise de cortisol tecidual (MOMMSEN *et al.*, 1999; BARCELLOS *et al.*, 2007; BARCELLOS *et al.*, 2011). O período de exposição ao peixe estímulo também foi de 60 minutos nos peixes não expostos ao etanol. Os grupos não expostos visualmente ao peixe estímulo foram coletados aos 75 minutos após o início do experimento, considerando 15 minutos de exposição ao etanol e 60 minutos de exposição ao peixe estímulo (Figura 3). Os peixes estímulo, predador (*A. ocellatus*) e não predador (*C. auratus*) não foram expostos ao etanol e nem utilizados para qualquer tipo de análise. Ao término de cada ciclo experimental, foram recolocados em seus aquários de origem.



**Figura 3** - Esquema da exposição ao predador.

### 5.2 Coleta e análise de cortisol

Em ambos os estudos os peixes foram capturados com o auxílio de um puçá e colocados em um recipiente contendo água gelada (1°C) para insensibilização (perda parcial da consciência e imobilização) e posterior abate por secção da medula espinhal. O tempo decorrido entre a captura e o abate foi sempre menor que 30 segundos para prevenir a resposta ao possível estresse causado por manejo.

Em seguida, os peixes foram acondicionados em envoltório adequado e imediatamente congelados em N<sub>2</sub> líquido por 10 – 30 segundos, e armazenados a - 20 °C para posterior extração e análise de cortisol tecidual utilizando o método descrito por SINK *et al.* (2007). Após os experimentos a água dos aquários foi descartada conforme descrito por KREUTZ *et al.*, (2008).

### 5.3 Análise estatística

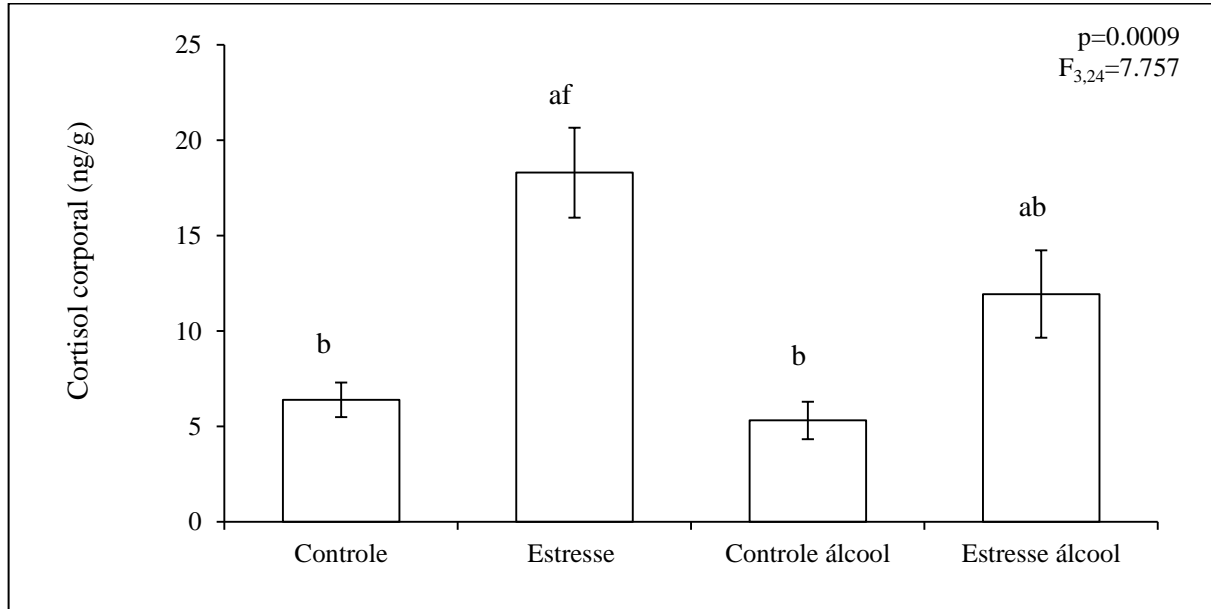
A média  $\pm$  desvio padrão de cada grupo foi calculada utilizando os valores obtidos em cada grupo de tratamento e analisados com o Graph Pad InStat 3.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Para testar a homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados foram usados os testes de Hartley e de Kolmogorov–Smirnov. Transformação log dos dados foi realizada quando necessário. Como as premissas da ANOVA foram atendidas, os valores de cortisol de corpo inteiro de todos os grupos de tratamento foram comparados por

análise de variância (ANOVA). No estudo 1, a ANOVA foi seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey e no estudo 2 por teste de comparações de Dunnet comparando cada média com a média dos valores controle. A significância estatística foi aceita quando  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### 6.1 Estudo 1 - Teste agudo de estresse

Os valores de cortisol corporal dos quatro grupos testados encontram-se na figura 4. A presença do álcool na concentração de 0,50% não interferiu na magnitude do valor de cortisol medido aos 15 minutos após o estímulo estressante nem tampouco nos valores controle sem a aplicação de estressor. O cortisol corporal dos peixes expostos a estresse sem a presença de álcool foi superior a ambos os controle e o cortisol corporal dos peixes expostos a estresse na presença de álcool foi similar a todos os demais tratamentos. Valores de P e F na figura.



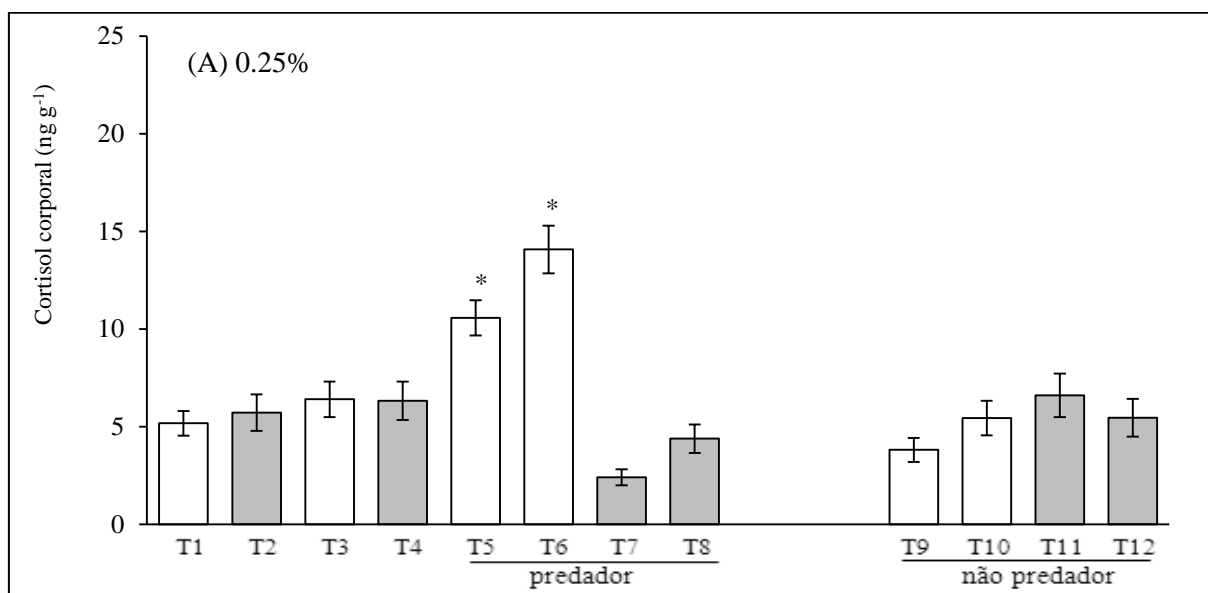
**Figura 4** - Cortisol corporal após 15 minutos da aplicação do estressor em peixes zebra expostos a 0,50% de álcool e não expostos. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Diferentes letras indicam diferença estatística (Anova seguida de Tukey, valores de p e de F na figura).



## 6.2 Estudo 2 - Relação presa-predador

### 6.2.1 Resultado para a concentração de 0,25%

Na análise de variância foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Figura 5,  $P < 0,0001$ ,  $F_{11,48} = 12,308$ ). Os peixes receptores isolados (controle) (PR) sem álcool apresentaram valores baixos de cortisol corporal ( $5,2 \pm 0,6$  ng/g) e esta concentração de álcool não provocou ativação do eixo de estresse nos peixes receptores isolados, mas com álcool (T2). Além disso, os peixes receptores recebendo água dos peixes doadores, sem (T3) ou com álcool (T4) apresentaram concentrações de cortisol corporal semelhantes ao grupo controle (T1). O cortisol corporal dos peixes doadores, quando em contato visual com o predador e não expostos ao álcool (T5) aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ). Da mesma maneira, os peixes receptores recebendo água dos peixes doadores vendo o predador mas expostos ao álcool (T6) também apresentaram elevados níveis de cortisol corporal ( $P < 0,05$ ). A presença de 0,25% de álcool parece bloquear esses efeitos verificados em T5 e T6. O cortisol corporal dos peixes doadores, quando em contato visual com um predador e na presença de álcool (T7) e dos receptores que recebem água dos doadores que enxergam o predador, mas com a presença de álcool (T8) não aumentou, mantendo-se semelhante aos valores de controle. Nos quatro tratamentos com peixe não predador, com ou sem álcool (T9 e T12), os níveis de cortisol corporal foram semelhantes aos valores do grupo controle.

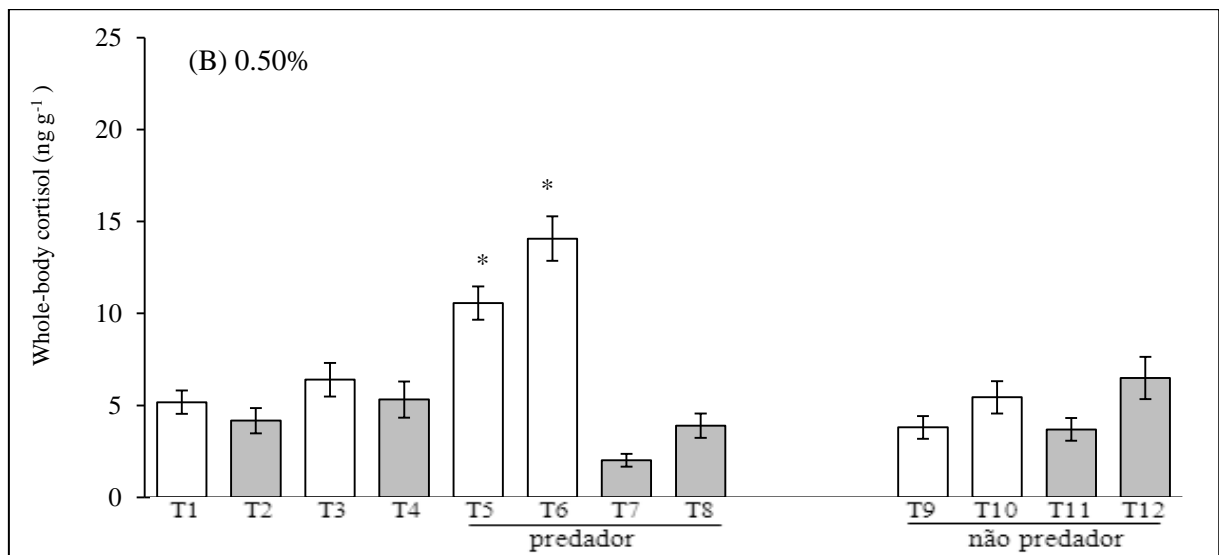


**Figura 5** - Cortisol corporal aferido nos peixes dos diferentes tratamentos. Exposição a 0,25% de álcool. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferença estatística com os valores controle (Anova seguida de Dunnet,  $P < 0,0001$ ,  $F_{11,48} =$

12,308). Barras brancas ou cinzas representam tratamentos sem ou com etanol respectivamente.

### 6.2.2 Resultado para a concentração de 0,50%

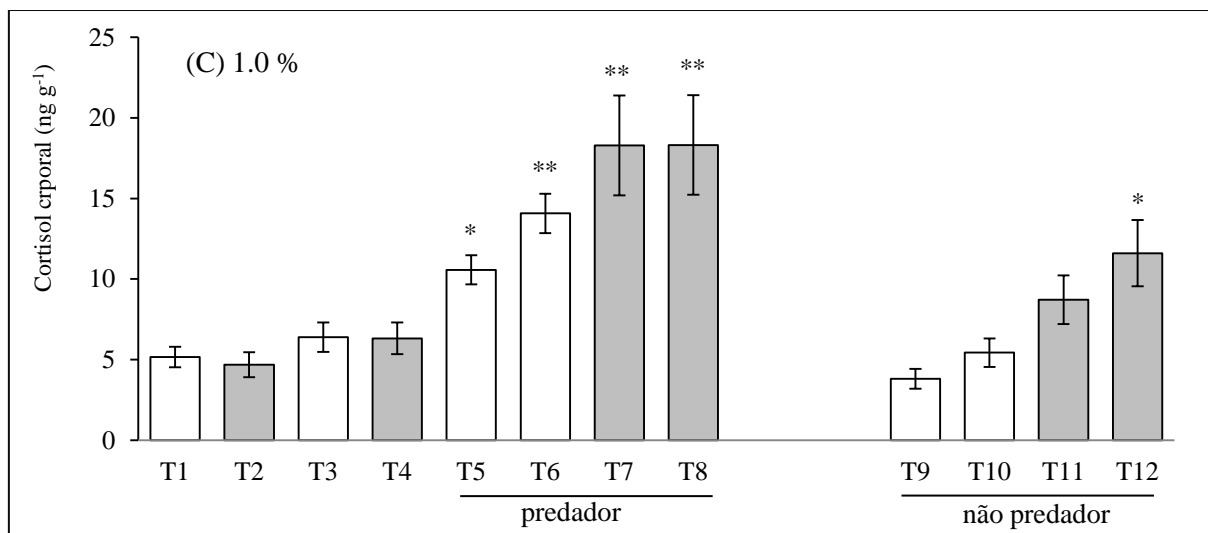
Na análise de variância foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Figura 6,  $P < 0,0001$ ,  $F_{11,48} = 17,776$ ). Como encontrado para a concentração de 0.25%, os peixes receptores isolados sem (T1) ou com etanol (T2) e também os peixes receptores recebendo água dos peixes doadores (T3 e T4) não tiveram seus níveis de cortisol corporal elevados. Padrões muito semelhantes também foram encontrados em peixes doadores que enxergam o predador e sem a presença de etanol (T5) e em peixes receptores recebendo água dos doadores com contato visual com o predador e sem etanol (T6), ambos tiveram níveis de cortisol corporal aumentados quando comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). A presença de 0,50% de etanol parece bloquear os efeitos verificados em T5 e T6 nos peixes doadores que enxergam o predador e na presença de etanol (T7) e os peixes receptores que recebem água dos doadores com contato visual com o predador, mas sem a presença de etanol (T8) que não aumentaram seus níveis de cortisol corporal. Mais uma vez, nos tratamentos com peixe não predador, com ou sem presença álcool (T9 e T12), os níveis de cortisol corporal foram semelhantes aos do grupo controle.



**Figura 6** - Cortisol corporal aferido nos peixes dos diferentes tratamentos. Exposição a 0,50% de álcool. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferença estatística com os valores controle (Anova seguida de Dunnet,  $P < 0,0001$ ,  $F_{11,48} = 17,776$ ). Barras brancas ou cinzas representam tratamentos sem ou com etanol respectivamente.

### 6.2.3 Resultado para a concentração de 1,00%

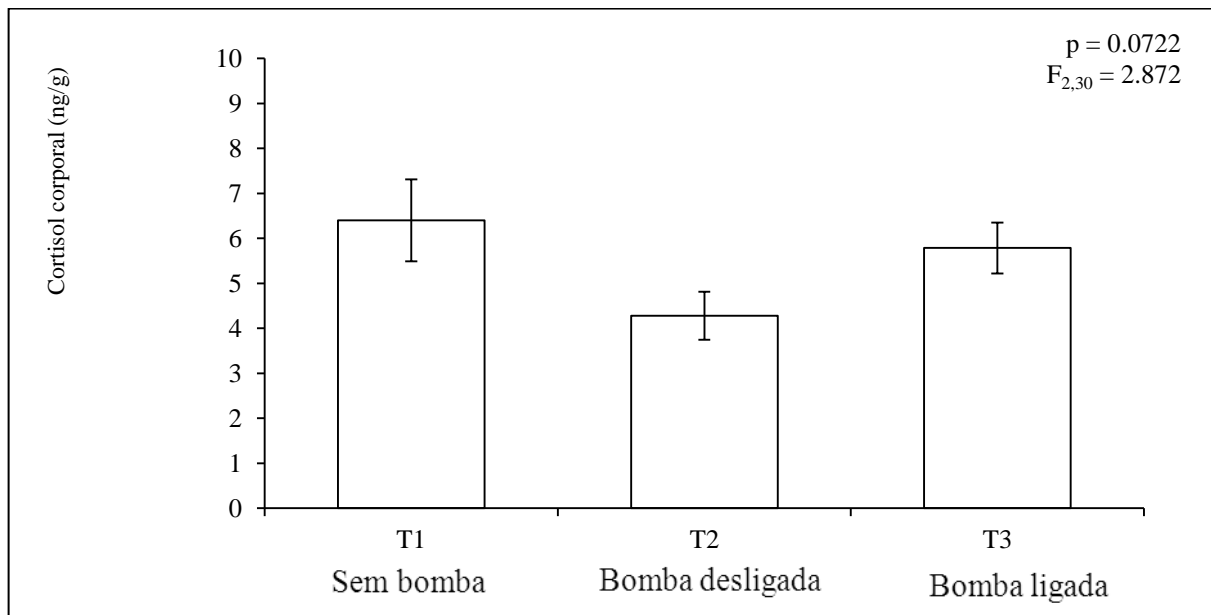
Na análise de variância foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Figura 7,  $P < 0,0001$ ,  $F_{11,48} = 11,640$ ). No experimento com a concentração de álcool de 1,00%, apesar de estreita semelhança dos quatro tratamentos iniciais (T1 a T4), os níveis de cortisol corporal foram muito distintos das concentrações menores de álcool. Conforme verificado nas concentrações de 0,25 e 0,50% de álcool, os peixes doadores, quando em contato visual com um predador e sem presença de álcool (T5) e receptores recebendo água dos doadores que enxergam o predador e não expostos ao álcool (T6) apresentaram aumento dos níveis de cortisol corporal, quando comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$  e  $0,01$  respectivamente). Diferentemente das duas concentrações menores de álcool, 1,0% parece ter estes efeitos potencializados uma vez que os peixes doadores, quando em contato visual com o predador e na presença de álcool (T7) e os receptores que receberam a água dos doadores com contato visual com o predador, mas sem presença de álcool (T8) apresentaram níveis aumentados de cortisol corporal ( $P < 0,01$ ). Curiosamente, os peixes receptores que receberam água dos doadores com contato visual com o não-predador e na presença de álcool (T12) apresentaram aumento dos níveis de cortisol corporal ( $P < 0,05$ ), apesar dos peixes doadores sem contato visual com o predador (T11) não elevarem os seus níveis de cortisol. Não houve diferenças entre peixes doadores e peixes receptores sem presença de álcool (T9 e T10).



**Figura 7** - Cortisol corporal aferido nos peixes dos diferentes tratamentos. Exposição a 1,0% de álcool. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferença estatística com os valores controle (Anova seguida de Dunnet,  $P < 0,0001$ ,  $F_{11,48} = 11,640$ ). Barras brancas ou cinzas representam tratamentos sem ou com etanol respectivamente.

### 6.3 Estudo 3 – efeitos da presença da bomba submersa

Os valores de cortisol corporal dos três grupos testados encontram-se na figura 8. A presença da bomba submersa não interferiu na magnitude do valor de cortisol medido aos 15 minutos após o estímulo estressante. O cortisol corporal dos peixes tanto na presença da bomba desligada ou ligada foi similar aos valores controle. Valores de P e F na figura.



**Figura 8** - Cortisol corporal em peixes zebra na ausência da bomba submersa e em sua presença desligada ou ligada. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Não foram verificadas diferenças estatísticas (Anova seguida de Tukey, valores de p e de F na figura).

## 7. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o contato visual com um predador provoca uma ativação do eixo de estresse nos peixes. Mostraram também uma resposta ao estresse típica de estresse nos peixes receptores que receberam água dos peixes doadores em contato visual com o predador, indicando que os peixes doadores comunicam quimicamente o risco de predação para os peixes receptores.

Estes resultados foram previamente mostrados por nossa equipe de pesquisa, tanto para a resposta ao estresse provocado por um contato visual com um predador (BARCELLOS *et al*, 2007; assim como por LUCA & GERLAI, 2012), bem como para comunicação química de risco de predação (BARCELLOS *et al*, no prelo) e/ou de estresse de manejo (BARCELLOS *et al.*, 2011).

A inovação deste trabalho é a determinação dos efeitos do álcool sobre esse tipo de interação presa-predador. Mostramos, pela primeira vez, que a exposição do álcool bloqueia completamente tanto a ativação do eixo de estresse em peixes doadores, bem como em peixes receptores.

Uma vez que a resposta ao desafio de estresse não foi alterada pelo álcool (estudo 1), a hipótese de que o álcool bloqueia a percepção de perigo em peixes doadores e, conseqüentemente, a liberação da substância química para comunicar esse perigo iminente para os peixes receptores, fica reforçada.

Esta hipótese é consistente com estudos anteriores, em que a exposição aguda ao álcool diminuiu reações de medo nos peixes (GERLAI *et al*, 2000;. LUCA & GERLAI 2012) também diminuiu comportamento aversivo ao contato com o predador (GERLAI *et al*, 2006 LUCA & GERLAI 2012.).

Além disso, o etanol foi descrito como uma substância ansiolítica que reduz a permanência de peixes em cardume (um típico comportamento de medo) (GEBAUER *et al*, 2011, MILLER *et al*, 2013). Estes efeitos ansiolíticos foram provavelmente mediados pelos receptores de GABA<sub>A</sub> (RADCLIFF *et al.*, 1999), provocando uma inibição do sistema nervoso central (KUMAR *et al.*, 2009).

Em seres humanos, padrões normais de secreção de cortisol são prejudicados pelo álcool (GIANOULAKIS *et al.*, 2003) e a exposição aguda ao etanol aumenta a secreção de cortisol, mas o “embotamento” da resposta de cortisol ao estresse é observado em alcoólatras e tóxico dependentes múltiplos, mesmo quando abstinentes (ERRICO *et al.*, 1993).

Nas concentrações de 0,25% e 0,50% de álcool, a nossa hipótese está baseada na não percepção do risco de predação pelos peixes doadores que, conseqüentemente, não comunicam esse risco eminente para os peixes receptores, e é muito reforçada pelos tratamentos com peixes não predadores. Ambos os peixes doadores e receptores desses grupos (T9 e T12) não mostraram qualquer resposta à presença do não predador *Carassius auratus*. Em nosso trabalho anterior, essas espécies de peixes não predadores também não provocaram qualquer reação nos peixes-zebra, tanto em contato direto como indireto (BARCELLOS *et al*, 2007; BARCELLOS *et al*, in press).

Diversos tipos de sinalização ligados ao risco de predação, como reconhecimento visual e de odor do predador, sinais estes liberados pelas presas coespecíficas como feromônios, por exemplo, são tipicamente utilizados como ansiogênicos em peixes (BASS & GERLAI, 2008; SPEEDIE e GERLAI, 2008).

Um aspecto intrigante que necessita de maior estudo é que a concentração de etanol de 1,0% apresentou um padrão totalmente diferente. Nesta concentração, os peixes doadores apresentaram um aumento dos níveis de cortisol. Neste caso, a exposição ao etanol parece potencializar a percepção de risco, bem como o de comunicação química deste risco de predação aos peixes doadores. Esta reação aumentada é reforçada pela resposta significativa de percepção nos peixes receptores (T12) em contato com a água de peixes doadores com um não predador (T11). Estes resultados são opostos ao esperado com base nos efeitos depressores do sistema nervoso central e ansiolíticos (GERLAI 2000 & 2006; GEBAUER 2011). Não temos uma explicação para estes resultados inesperados, mas GERLAI *et al*. (2009) e PARKER *et al*. (2012) apontam para esforços em relação a efeitos das condições da sensibilidade do etanol em peixe-zebra. Outra possível fonte de variação nos resultados de pesquisa é o tempo de vida do estoque experimental. Peixes mantidos em constantes condições homogêneas de laboratório apresentam claras diferenças ontogênicas com populações selvagens (HAZLLERIG *et al*., 2012). Nosso estoque de pesquisa os peixes foram mantidos em tanques de terra, até serem transferidos para o laboratório.

Por fim, a presença da bomba submersa, tanto pela sua presença em si (objeto novo) quanto pela vibração e pelo ruído associado ao seu funcionamento não provocaram nenhum efeito nos peixes.

## 8. ARTIGO PLUBLICADO NA REVISTA Plos ONE

OPEN ACCESS Freely available online



## Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish

Thiago Acosta Oliveira<sup>1</sup>, Gessi Koakoski<sup>1</sup>, Luiz Carlos Kreutz<sup>2</sup>, Daiane Ferreira<sup>1</sup>, João Gabriel Santos da Rosa<sup>1</sup>, Murilo Sander de Abreu<sup>1</sup>, Ana Cristina Vendrametto Giacomini<sup>1,2</sup>, Ricardo Pimentel Oliveira<sup>2</sup>, Michele Fagundes<sup>2</sup>, Angelo Luis Piato<sup>3</sup>, Rodrigo Egydio Barreto<sup>4</sup>, Leonardo José Gil Barcellos<sup>2\*</sup>

**1** Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil, **3** Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, SC, Brazil, **4** Department of Physiology, Bioscience Institute, Caunesp, Unesp, Botucatu, SP, Brazil

### Abstract

The effects of ethanol exposure on *Danio rerio* have been studied from the perspectives of developmental biology and behavior. However, little is known about the effects of ethanol on the prey-predator relationship and chemical communication of predation risk. Here, we showed that visual contact with a predator triggers stress axis activation in zebrafish. We also observed a typical stress response in zebrafish receiving water from these conspecifics, indicating that these fish chemically communicate predation risk. Our work is the first to demonstrate how alcohol affects this prey-predator interaction. We showed for the first time that alcohol exposure completely blocks stress axis activation in both fish seeing the predator and in fish that come in indirect contact with a predator by receiving water from these conspecifics. Together with other research results and with the translational relevance of this fish species, our data points to zebrafish as a promising animal model to study human alcoholism.

**Citation:** Oliveira TA, Koakoski G, Kreutz LC, Ferreira D, Rosa JGSd, et al. (2013) Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. PLoS ONE 8(10): e75780. doi:10.1371/journal.pone.0075780

**Editor:** Allan V. Kalueff, Tulane University Medical School, United States of America

**Received:** July 3, 2013; **Accepted:** August 16, 2013; **Published:** October 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** There are no funders. L.J.G.B. has a CNPq research fellowship (302073/2011-6). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lbarcellos@upf.br

## 9. Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish

Thiago Acosta Oliveira, Gessi Koakoski, Luiz Carlos Kreutz, Daiane Ferreira, João Gabriel Santos da Rosa; Murilo Sander de Abreu; Ana Cristina Vendrametto Giacomini, Ricardo Pimentel Oliveira, Michele Fagundes, Angelo Luis Piato, Rodrigo Egydio Barreto, Leonardo José Gil Barcellos

### 9.1 Abstract

The effects of ethanol exposure on *Danio rerio* have been studied from the perspectives of developmental biology and behavior. However, little is known about the effects of ethanol on the prey-predator relationship and chemical communication of predation risk. Here, we showed that visual contact with a predator triggers stress axis activation in zebrafish. We also observed a typical stress response in zebrafish receiving water from these conspecifics, indicating that these fish chemically communicate predation risk. Our work is the first to demonstrate how alcohol effects this prey-predator interaction. We showed for the first time that alcohol exposure completely blocks stress axis activation in both fish seeing the predator and in fish that come in indirect contact with a predator by receiving water from these conspecifics. Together with other research results and with the translational relevance of this fish species, our data points to zebrafish as a promising animal model to study human alcoholism.

**Citation:** Oliveira TA, Koakoski G, Kreutz LC, Ferreira D, Rosa JGSd, et al. (2013) Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. PLoS ONE 8(10): e75780. doi:10.1371/journal.pone.0075780

**Editor:** Allan V. Kalueff, Tulane University Medical School, United States of America

**Received:** July 3, 2013; **Accepted:** August 16, 2013; **Published:** October 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** There are no funders. L.J.G.B. has a CNPq research fellowship (302073/2011-6). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.



## 9.2 Materials and Methods

### 9.2.1 Ethical Note

This study was approved by the Ethics Commission for Animal Use (CEUA) of the Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil (Protocol#7/2013-CEUA), and met the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; <http://www.cobea.org.br>).

### 9.2.2 Animals

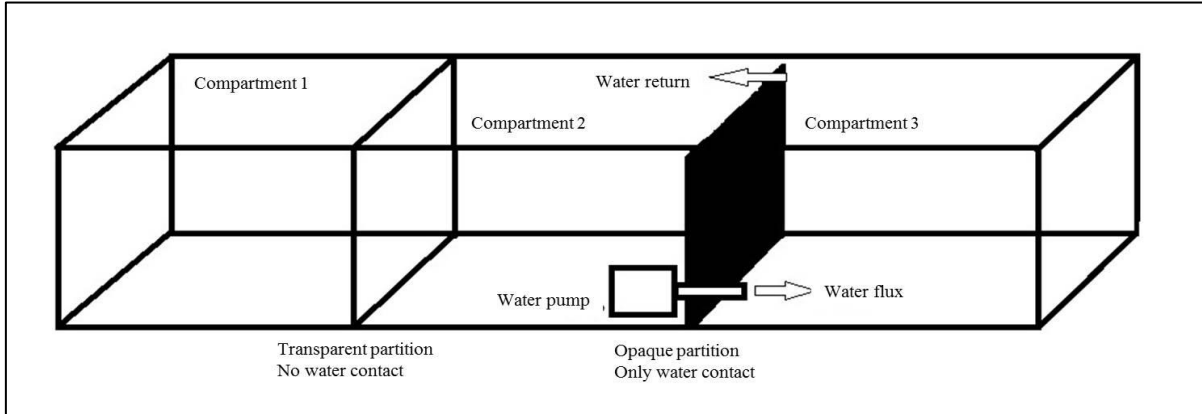
A population of 2200 mixed-sex, adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) from short-fin (SF) strain, were held under natural photoperiod (approximately 14 h light: 10 h dark). Water was maintained at  $28.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ , pH  $7.0 \pm 0.6$  units; dissolved oxygen at  $6.8 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ; total ammonia at  $<0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ; total hardness at 6 mg/L; and alkalinity at  $22 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{CaCO}_3$ .

### 9.2.3 Experimental Design – General Information

Prior to each trial, groups of 12 fish for each treatment were acclimated in the experimental aquaria for three days, kept under the 14–10 h day/night cycle and fed three times a day with commercial flakes (TetraMin®, Tetra, Melle, Germany). Twenty-four hours before experimentation, fish were transferred to the experimental room. To avoid the influence of circadian rhythm on cortisol secretion, all samples were collected at the same time of day (11:00 AM). The feeding of animals that were used as either predatory or non-predatory stimulus was suspended for 24 h before the start of the trial period to encourage possible predatory behavior.

Large glass aquaria (120×40×40 cm) were divided into three compartments of the same size (Fig. 1). The glass partitions were fixed permanently in the experimental aquaria. The first and second compartments were divided by a transparent glass partition that permitted visual prey-predator contact. The second and third compartments were divided by an opaque partition that prevented visual prey-predator contact. Chemical communication was achieved with water circulation between the compartments through a submersible pump installed in a hole (1.5 cm in diameter) near the bottom. Water circulated continuously (approximately 3 L/min); the circulation efficiency was demonstrated by dispersion of water

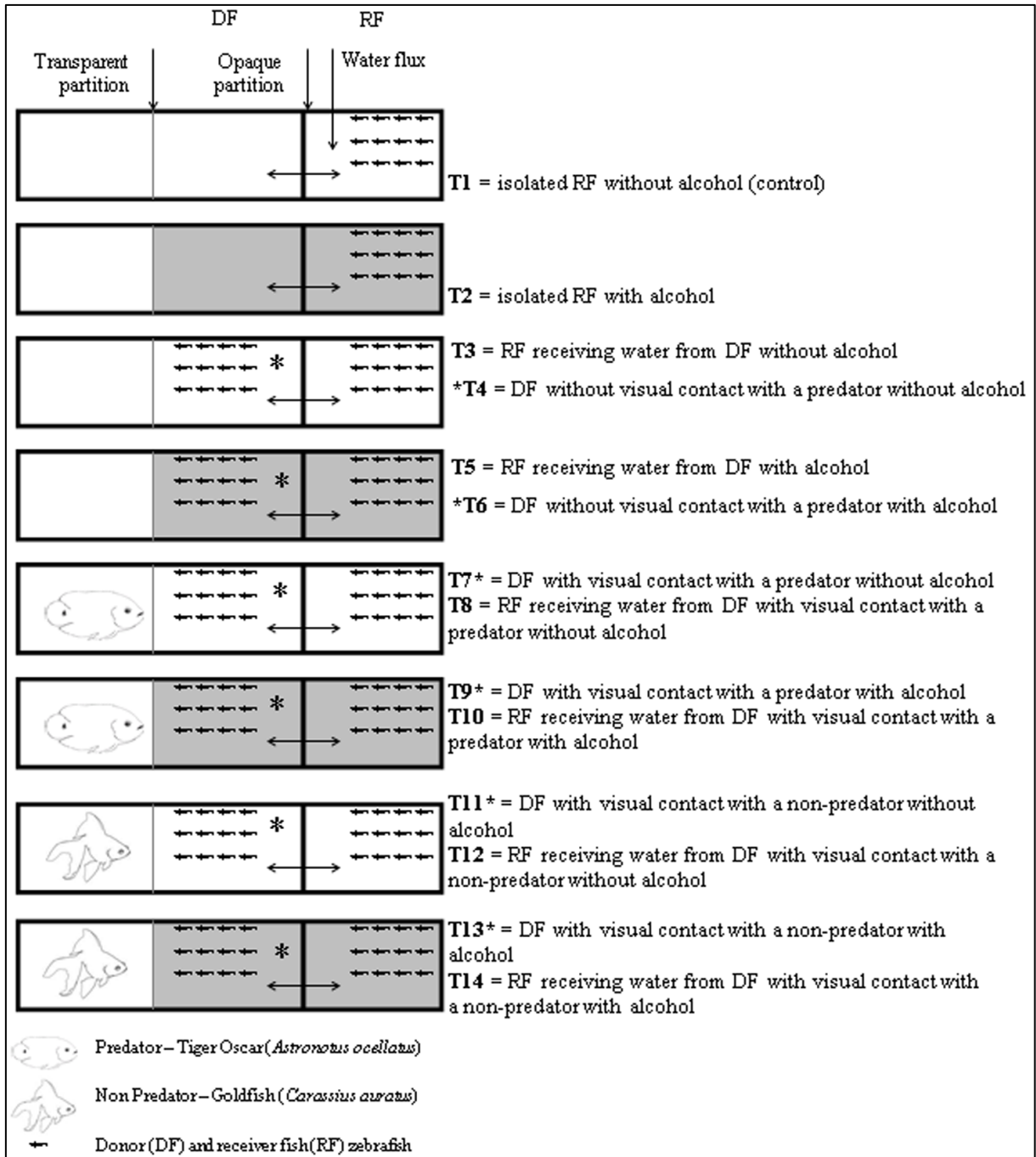
mixed with methylene blue from one compartment to the other. During each experimental trial, the aquaria were not cleaned, the water was not changed, and the fish were not fed to avoid undesirable chemical factors.



**Figure 1.** Schematic view of the experimental aquaria.

#### 9.2.4 Study 1 - Communication of Predation Risk in Fish Exposed to Alcohol

We measured the effects of alcohol on stress response in a fish group subjected to visual contact with both a predatory and a non-predatory fish (stimuli fish, SF). After visual contact was established, the water from stimuli-exposed zebrafish (donor fish, DF) was transferred to conspecifics (receiver fish, RF). A total of 14 experimental groups were used to allow for repeated testing of three alcohol concentrations (0.25%, 0.50% and 1.00%) (Fig. 2).



**Figure 2.** Schematic view of the experimental groups to study the effect of alcohol exposure on the communication of predation risk. White and gray represent treatments without or with alcohol, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0075780.g002

Briefly, T1 and T2 testing only if the maintenance in the compartment 3 might cause stress in zebrafish with or without alcohol. T3 to T6 testing the presence of both DF and RF fish in the aquaria without SF in the presence or not of alcohol. The treatments T7 to T10 testing both DF and RF fish in the presence of predatory SF in the presence or not of alcohol. Groups T11 to T14 reproduces groups T7 to T10 but with a non-predatory SF.

Each zebrafish group (12 fish per group) were introduced into compartments 2 and 3 and habituated for at least three days. At the beginning of the experimental trial, fish of both compartments 2 and 3 were exposed to alcohol for 15 minutes (both the alcohol concentration and exposure time were based on previous studies [2]). The alcohol introduction was made in compartments 2 and 3 at the same moment using two glass pipettes. The water flux promoted by the pump rapidly disperses and homogenizes the alcohol introduced. In non-exposed groups we repeat exactly the same procedure but using only water.

After treatment, DF groups were exposed to visual contact with the SF for 60 minutes. At the end of this period, both the DF and RF were sampled to whole-body cortisol analysis [9], [11]. Three replicates for each experimental trial were done.

The tiger Oscar (*Astronotus ocellatus*), a Cichlid fish with strong predatory behavior [16], was used as the predator for the SF, and goldfish (*Carassius auratus*) were used as the non-predator fish due to its peaceful and friendly temperament [17]. The SF fish were not exposed to alcohol and not used in any analyses. After each trial, they were returned to their original aquarium.

### **9.2.5 Study 2 – Alcohol Effects on Stress Response**

Because some studies have reported that alcohol may affect directly the stress response in animals and humans [18]–[24] and considering that the cortisol was used here as an indicator of chemical communication between DF and RF, we also evaluated the peak cortisol levels in zebrafish acutely exposed to physical stress and/or alcohol.

For this experiment, 144 zebrafish were distributed in 24 glass aquaria (30×30×30 cm, 27 L, 6 fish per aquarium). The control and stressed groups were either exposed to 0.50% alcohol for 15 minutes or untreated. Immediately after alcohol exposure, a standard acute stressor consisting of chasing fish with a net for two minutes was applied. Fifteen minutes after the stressor was removed, fish were sampled for whole-body cortisol analysis. The time periods used were established by Ramsay et al. [25], who determined the interval between the stressor and peak cortisol concentrations.

### **9.2.6 Study 3 – Effects of a Submersible Pump**

Because both the presence of the pump and the noise and vibration associated with its function could interfere with the stress response, the potential effects of these components

were evaluated. The following three experimental groups were tested in triplicate: no pump, pump off and pump on. Each group consisted of six glass aquaria containing six zebrafish (36 fish total). Fish were habituated to aquaria for at least three days; after this period, they were sampled to measure whole-body cortisol levels.

### 9.2.7 Procedures and Techniques – Cortisol Extraction and Analysis

Tissue cortisol levels were used as an indicator of stress response. Fish were captured and immediately frozen in liquid nitrogen for 10–30 s, followed by storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  until cortisol extraction. To prevent any handling-induced stress response, the time period between their capture and killing was  $<30$  s.

Whole-body cortisol was extracted using the method described by Sink et al. [26]. Each fish was weighed, minced and placed in a disposable stomacher bag with 2 mL phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 6 min. The contents were then transferred to a 10-mL screw top disposable test tube, to which 5 mL of laboratory grade ethyl ether was added. The tube was vortexed for 1 min and centrifuged for 10 min at 3000 rpm, after which the sample was immediately frozen in liquid nitrogen. The unfrozen portion (ethyl ether containing cortisol) was decanted and transferred to a new tube and completely evaporated under a gentle stream of nitrogen for 2 h, yielding a lipid extract containing the cortisol, which was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

The accuracy of cortisol detection was tested by calculating the recoveries from samples spiked with known amounts of cortisol (50, 25 and  $12.5\text{ ng mL}^{-1}$ ). The mean detection accuracy of spiked samples was 94.3%. All of the cortisol values were adjusted for recovery with the following equation: cortisol value = measured value $\times 1.0604$ .

Tissue extracts were re-suspended in 1 mL PBS, and whole-body cortisol levels were measured in duplicate samples of each extract using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (EIAgen<sup>TM</sup>CORTISOL test, BioChem ImmunoSystems). This kit was fully validated for *Nile tilapia* tissue extracts using methodology proposed by Sink et al. [26]. Precision was tested by performing 12 repeated assays on seven randomly chosen samples on the same plate and calculating the intra-assay coefficient of variation (CV). Reproducibility was tested by assaying the same samples on different plates and calculating the inter-assay CV. To test for linearity and parallelism, the tissue extracts underwent serial dilutions in the buffer provided with the kit. A strong positive correlation between the curves

was observed ( $R^2 = 0.8918$ ), and the samples had low inter- and intra-assay CV values (7–10% and 5–9%, respectively).

### 9.2.8 Statistical Analysis

Hartley's tests and Kolmogorov–Smirnov tests were used to determine the homogeneity of variance and normality, respectively. Log-transformation was carried out when necessary. Because the standards for using parametric tests were met, an analysis of variance complemented by Tukey's multiple range test was performed, and this analysis was used to compare all of means. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## 9.3 Results

### 9.3.1 Study 1 – Alcohol Concentration of 0.25%

An ANOVA indicated differences between the groups ( $F_{13,56} = 9.825$ ,  $P < 0.0001$ , [Fig. 3A](#)). Control DF (T3) and RF (T4) without predator SF presented low basal values of whole-body cortisol. Alcohol exposure (RF, T5 and DF, T6) did not affect these levels under these conditions. In the situations without stimuli fish (T3 to T6), both DF and RF fish presented similar levels of whole-body cortisol. The presence of the predatory SF significantly increased cortisol levels in both the DF and RF groups (T7 and T8). Exposure to 0.25% alcohol blocked the stress response in the DF and RF because the observed cortisol levels were similar to those from fish exposed to basal conditions (T9 and T10). In the presence of the non-predatory fish, the cortisol levels were similar to the control values in the DF and RF groups, regardless of alcohol exposure (T11 to T14).

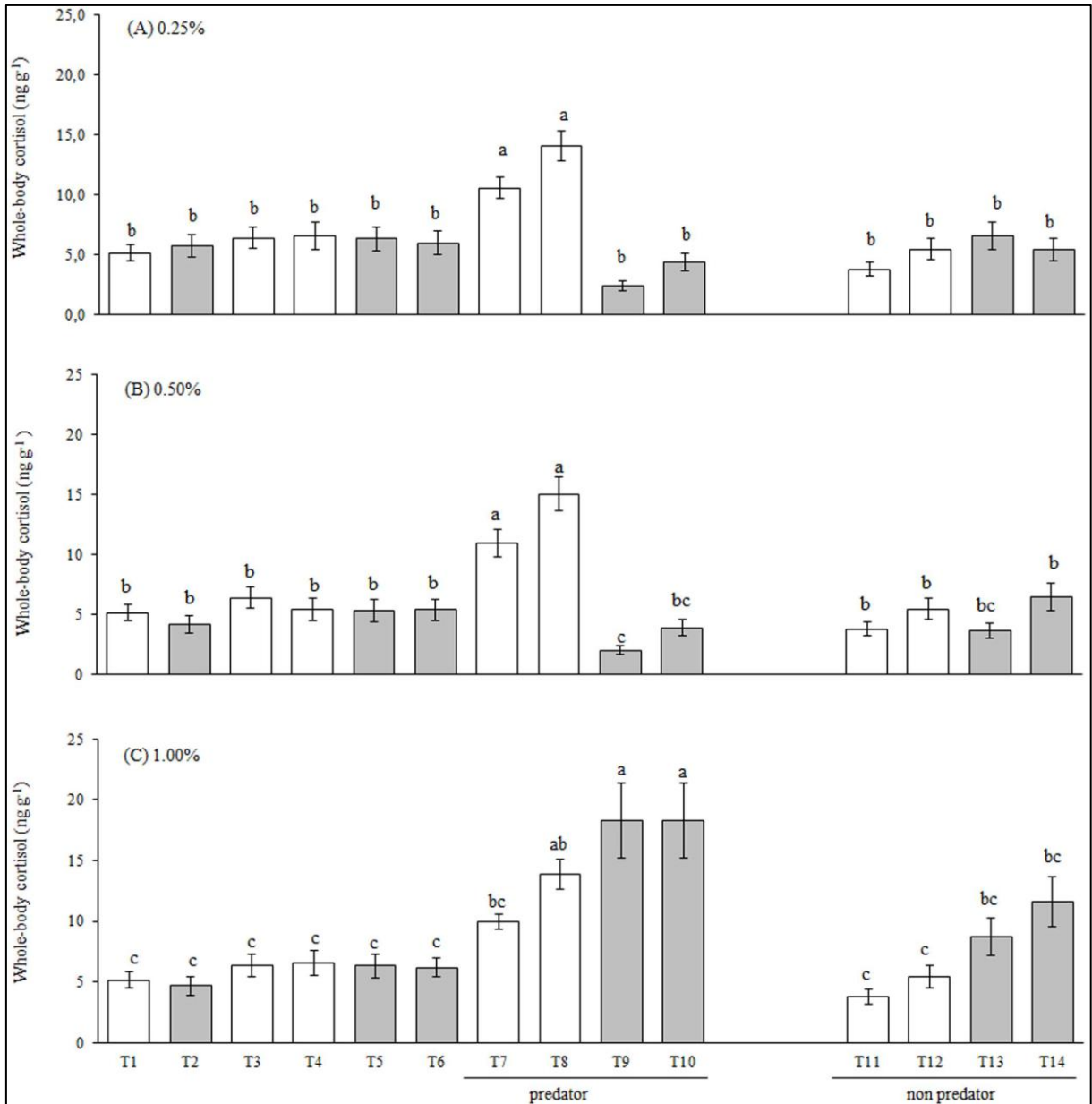
### 9.3.2 Study 1 – Alcohol Concentration of 0.50%

An ANOVA indicated differences between the groups ( $F_{13,56} = 13.776$ ,  $P < 0.0001$ , [Fig. 3B](#)). Control DF (T3) and RF (T4) without predator stimuli fish presented lower basal values of whole-body cortisol. Alcohol exposure did not affect these cortisol concentrations under these conditions. As verified in the experiment with alcohol concentration of 0.25%, in the situations without stimuli fish (T3 to T6), both DF and RF fish presented similar levels of whole-body cortisol. Similarly to the previous experiment, the presence of a predatory fish

significantly increased cortisol levels in both the DF and RF groups (T7 and T8). Exposure to 0.50% alcohol blocked the stress response in the DF and RF, as suggested by cortisol levels that were similar or lower to the basal condition (T9 and T10). In the presence of the non-predatory fish, the cortisol levels were similar to the control values in the DF and RF groups, regardless of alcohol exposure (T11 to T14). None of the comparisons, by Student's "t" test, between the means DF and RF fish in each condition showed statistically significant differences.

### **9.3.3 Study 1 – Alcohol Concentration of 1.00%**

An ANOVA indicated differences between the groups ( $F_{13,56} = 9.878$ ,  $P < 0.0001$ ). [Fig. 3C](#)). Control DF and RF without predator SF presented low basal concentrations of whole-body cortisol. Alcohol exposure did not affect cortisol concentrations. As verified in the other experiments fish from situations without stimuli (T3 to T6), both DF and RF fish presented similar levels of whole-body cortisol. The presence of the predatory fish significantly increased cortisol levels in the RF group (T8) in relation to basal situations (T1 and T2). Contrary to the lower alcohol concentrations, exposure to 1.00% alcohol potentiates the stress response in the DF and RF groups (T9 and T10), as the cortisol levels were higher than the control values. None of the comparisons, by Student's "t" test, between the means DF and RF fish in each condition showed statistically significant differences.

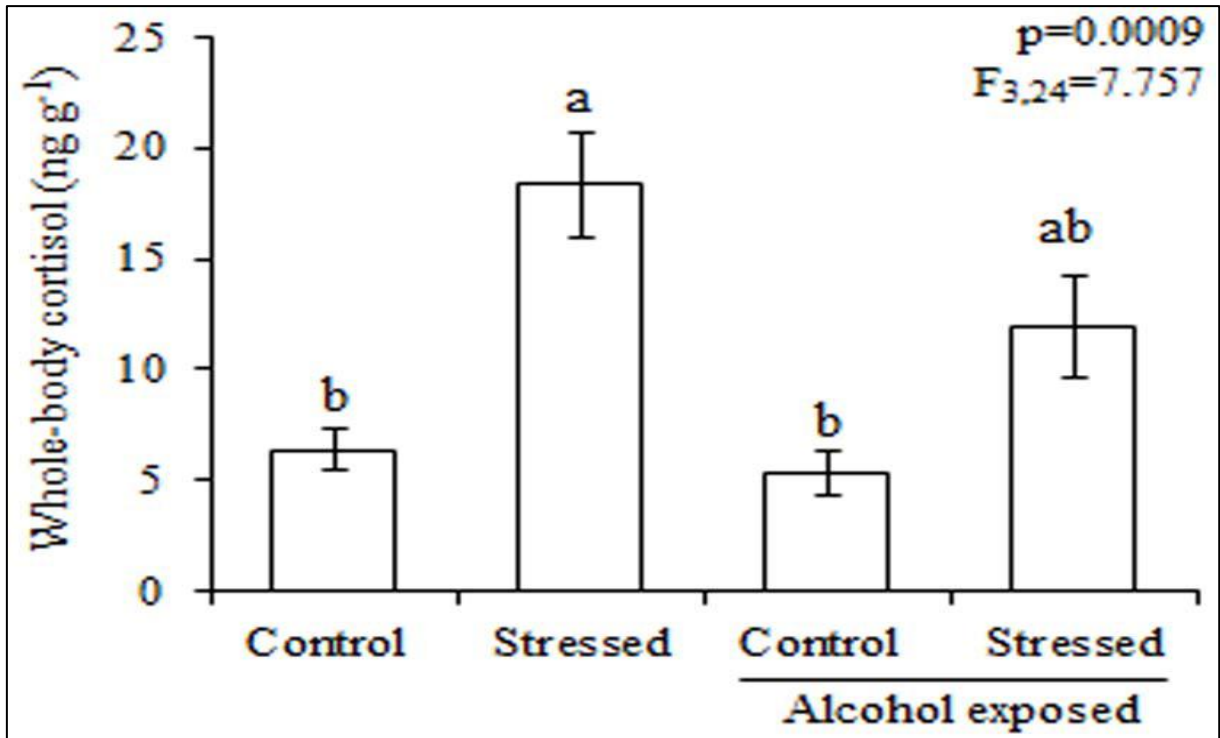


**Figure 3.** Whole-body cortisol concentrations measured in fish from different experimental groups. Animals were exposed to 0.25% (A), 0.50% (B) or 1.00% (C) alcohol. The values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean. The different small letters after each mean indicate significant differences ( $P < 0.0001$ , ANOVA, followed by Tukey's multiple range test, see details in the text). White and gray bars represent treatments without or with alcohol, respectively. See the Fig. 2 for treatment descriptions. doi:10.1371/journal.pone.0075780.g003



### 9.3.4 Study 2 – Effect of Alcohol on Stress Response

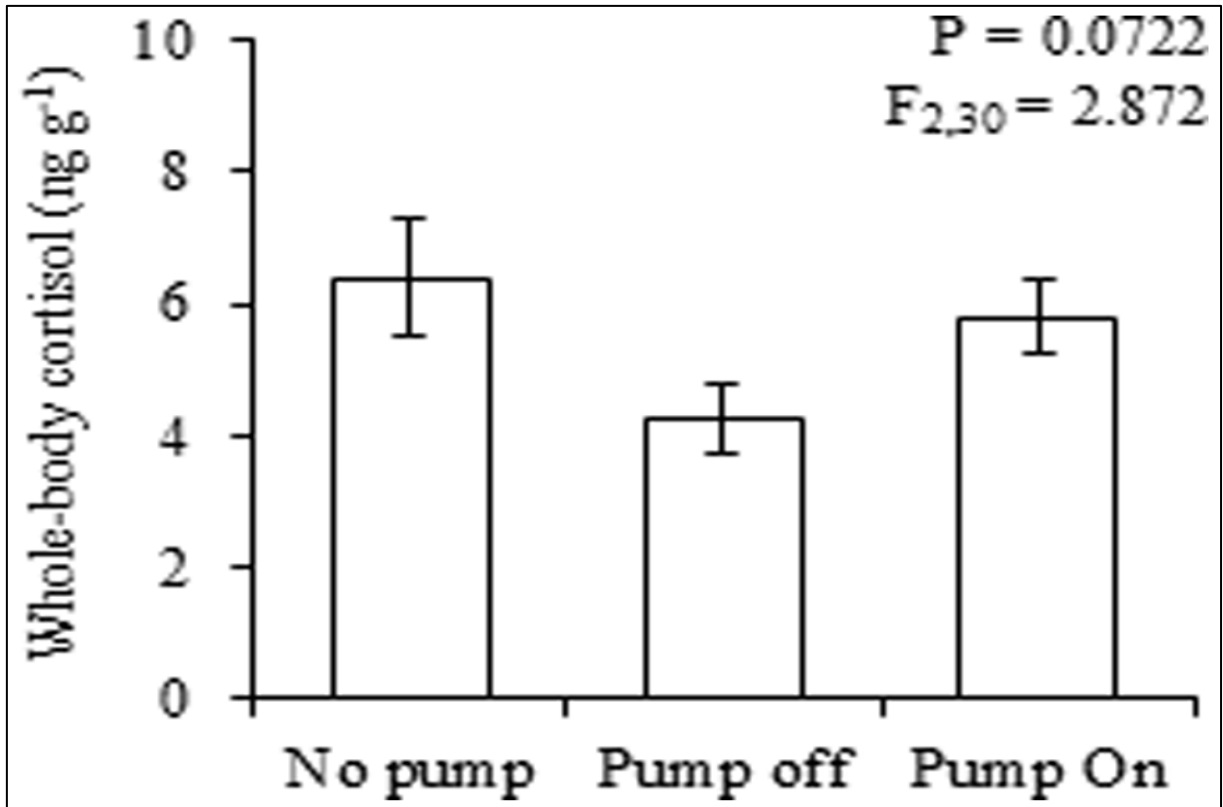
An ANOVA indicated differences between the groups ( $F_{3,24} = 7.1$ ,  $P = 0.0009$ , [Fig. 4](#)). As expected, acute stress significantly increased the cortisol levels; however, exposure to 0.50% alcohol attenuated the magnitude of whole-body cortisol after acute stress.



**Figure 4.** Whole-body cortisol measured in control and stressed fish that were either untreated or exposed to 0.50% alcohol. The values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean. Different letters above the histograms indicate significant differences between means (ANOVA, followed by Tukey's multiple range test, see details in the text). doi:10.1371/journal.pone.0075780.g004.

### 9.3.5 Study 3 – Effect of the Submersible Pump

The presence of the submersible pump has no effect on the resting whole-body cortisol levels ([Fig. 5](#)). The cortisol levels in fish in the presence of the pump was similar to control fish without a pump, regardless of whether the pump was turned off or on ( $F_{2,30} = 2.9$ ,  $P = 0.0722$ ).



**Figure 5.** Effect of the presence or absence of the submersible pump on zebrafish cortisol levels. The values are expressed as the mean  $\pm$  6 standard error of mean. No significant differences were observed between the experimental groups (ANOVA, followed by Tukey's multiple range test, see details in the text). doi:10.1371/journal.pone.0075780.g005.

#### 9.4 Discussion

We demonstrated that visual contact with a predator triggers activation of the stress axis in zebrafish (T7). We also observed the typical stress response in zebrafish receiving water (RF) from conspecifics after visual contact with a predator (DF), indicating that DF fish chemically communicate the predation risk to RF (T8). These results are in agreement with previous studies investigating both the stress response triggered by visual contact with a predator [12], [27] and the chemical communication of predation risk [10] and/or handling stress [9].

Despite the fact that the Tiger Oscar is an allopatric predator in relation to zebrafish, we previously show that *D. rerio* could recognize certain fish characteristic and behaviors that indicated Tiger Oscar as possible predator. Also, zebrafish did not recognize goldfish as a possible predator [12], [13]. The present study confirms these situations based on data from

T7 and T11 groups, validating the use of these species as a predator and non-predator stimuli fish.

We show, for the first time, that exposure to low alcohol concentrations impairs stress axis activation (i.e. values similar or lower than those measured in fish from control situations T1 and T2) in fish visually exposed to a predator (DF, T9) and also in fish receiving water (RF, T10) from the visually exposed fish.

Because the response to stress challenges was not blocked by alcohol exposure in the study 2 (physical stress), we hypothesized that alcohol interferes with the axis by decreasing the danger perception of DF and subsequently reducing the release of the chemical disturbance substance to communicate this imminent threat to RF. This hypothesis is consistent with previous studies in which acute alcohol exposure decreased fear reactions in zebrafish [1], [27] and avoidance behavior to a predator [2], [27]. Additionally, ethanol was described as an anxiolytic-like substance that reduces shoal cohesion in zebrafish [3], [15]. The specific mechanism related to these effects is unclear but is likely mediated by GABA<sub>A</sub> receptors [28], [29]. GABA<sub>A</sub> receptors may be involved in HPA axis modulation because the increase in ethanol consumption was associated with reduced blood corticosterone levels, which is indicative of a dampened HPA activation and can be reversed by administration of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin into the paraventricular nucleus in rats [30].

At alcohol concentrations of 0.25 and 0.50%, our hypothesis that alcohol reduces the perception of the predation risk by the DF, which consequently prevents communication of this imminent risk to RF, is reinforced by the treatments in the presence of a non-predatory fish that did not elicit any hormonal response in both DF and RF. Both the DF and RF groups (T11 to T14) had no reaction in the presence of a large *C. auratus*.

The absence of differences between DF and RF fish without stimuli fish (T3 to T6) also reinforce our main hypothesis.

A possible effect of alcohol on the capacity of the adrenal gland to synthesize cortisol was ruled out based on the results of Study 2, which shows no direct effect of ethanol exposure on stress reactivity. However, because both DF and RF were exposed to alcohol, the effect of alcohol on the ability of the RF to perceive the substance released by the DF cannot be discarded.

Interestingly, treatment with 1.0% alcohol showed different results compared with treatment with the lower alcohol concentrations. At this higher concentration, both the DF and RF groups had increased cortisol levels in the presence of a predator. The alcohol exposure

appears to potentiate the risk perception and chemical communication of this predation risk. These results were unexpected because alcohol has anxiolytic and central nervous system depressor effects [1], [2], [15]. Despite this U-shaped response in this exact dose range was already known, at least behaviorally [1] (i.e. 0.25 and 0.50% dosages induces hyperactivity that shifts to hypoactivity at 1.00%), for hormonal concentrations there is still no explanation.

The augmented reactivity induced by the higher alcohol concentration is reinforced by the significant cortisol elevation in fish receiving (T14) water from the DF in contact with a non-predator (T13). The cortisol levels were not significantly elevated in the DF group, suggesting that the chemical communication of a perceived threat does not require full HPI axis activation. The nature of the molecules used for this communication has yet to be elucidated.

This study shows that visual contact with a predator triggers the stress axis activation in zebrafish and that fish chemically communicate predation risk, as indicated by the stress response in zebrafish receiving water from these conspecifics. The novelty of this work is that exposure to low concentrations of alcohol blocks both stress axis activation and chemical communication of predation risk. Our primary hypothesis is that alcohol interferes with the perception of danger by DF fish and the consequent release of the chemical disturbance substance to communicate this imminent threat to RF.

Despite the yet unknown mechanism underlying this impaired risk perception in zebrafish, we can trace a parallel with the effects of alcohol in humans, since people exposed to alcohol present an impaired ability to discriminate threatening from non-threatening cues [31], [32]. Together with other research results and with the translational relevance of this fish species, our data points to zebrafish as a promising animal model to study alcoholism.

## 9.5 Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LJGB GK TAO. Performed the experiments: DF MSdA MF RPO. Analyzed the data: LJGB. Contributed reagents/materials/analysis tools: LJGB REB. Wrote the paper: LJGB REB. Assisted in revise and writing the paper: LCK JGSdR ALP ACVG.

## 9.6 References

1. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 773–782.
2. Gerlai R, Lee V, Blaser R (2006) Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav* 85: 752–761.
3. Miller N, Greene K, Dydinski A, Gerlai R (2013) Effects of nicotine and alcohol on zebrafish (*Danio rerio*) shoaling. *Behav Brain Res* 240: 192–196.
4. Chivers DP, Smith RJF (1998) Chemical alarm signaling in aquatic predator-prey systems: a review and prospectus. *Ecoscience* 5: 338–352.
5. Korpi NL, Wisenden BD (2001) Learned recognition of novel predator odour by zebra danio, *Danio rerio*, following time-shifted presentation of alarm cue and predator odour. *Environ Biol Fishes* 61: 205–211.
6. Wisenden BD, Lanfranconi-Izawa I, Keenleyside MHA (1995) Fin digging and leaf lifting by the convict cichlid, *Cichlasoma nigrofasciatum*: Examples of parental food provisioning. *Anim Behav* 49: 623–631.
7. Jordão LC, Volpato GL (2000) Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behavior* 137: 681–690.
8. Bryer PJ, Mirza RS, Chivers DP (2001) Chemosensory assessment of predation risk by slimy sculpins (*Cottus cognatus*): responses to alarm, disturbance, and predator cues. *J Chem Ecol* 27: 533–546.
9. Barcellos LJG, Volpato GL, Barreto RE, Coldebella I, Ferreira D (2011) Chemical communication of handling stress in fish. *Phys Behav* 103: 372–375.
10. Koakoski G, Rosa JGS, Ferreira D, Oliveira TA, Abreu MS et al.. (2013) Zebrafish chemically inform conspecifics of predator presence. *In preparation*.
11. Bell AM, Backstrom T, Huntingford FA, Pottinger TG, Winberg S (2007) Variable neuroendocrine responses to ecologically-relevant challenges in sticklebacks. *Phys Behav* 91: 15–25.
12. Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, Silva LB, et al. (2007) Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 272: 774–778.

13. Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Cericato L (2010) Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *J Fish Biol* 76: 1032–1038.
14. Barreto RE, Luchiari AC, Marcondes AL (2003) Ventilatory frequency indicates visual recognition of an allopatric predator in naïve Nile tilapia. *Behav Proces* 60: 235–239.
15. Gebauer DL, Pagnussat N, Piato AL, Schaefer IC, Bonan CD, et al. (2011) Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 480–486.
16. Smith NJH (1981) *Man, fishes, and the Amazon*. Columbia Univ. Press, New York. 180 pp.
17. Kottelat M, Whitten AJ, Kartikasari SN, Wirjoatmodjo S (1993) *Freshwater Fishes of Western Indonesia and Sulawesi*. Hong Kong: Periplus Editions. ]
18. Kalant H (1990) Stress-related effects of ethanol in mammals. *Crit Rev Biotechnol* 9: 265–272.
19. Spencer RL, McEwen BS (1990) Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic ethanol stress. *Neuroendocrinology* 52: 481–489.
20. Wand GS, Dobs AS (1991) Alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. *J Clin Endocrinol Metabol* 72: 1290–1295.
21. Eskay RL, Chautard T, Torda T, Hwang D (1993) The effects of alcohol on selected regulatory aspects of the stress axis. In: Zakhari S, ed. *Alcohol and the Endocrine System*. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Research Monograph No. 23. Bethesda, MD: the Institute, 1993.
22. Waltman C, Blevins Jr LS, Boyd G, Wand GS (1993) The effects of mild ethanol intoxication on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in nonalcoholic men. *J Clin Endocrinol Metabol* 77: 518–522.
23. Dai X, Thavundayil J, Santella S, Gianoulakis C (2007) Response of the HPA-axis to alcohol and stress as a function of alcohol dependence and family history of alcoholism. *Psychoneuroendocrinology* 32: 293–305.
24. Croissant B, Demmel R, Rist F, Olbrich R (2008) Exploring the link between gender, sensation seeking, and family history of alcoholism in cortisol stress response dampening. *Biol Psychol* 79: 268–274.

25. Ramsay JM, Feist GW, Varga ZM, Westerfield M, Kent ML, et al. (2006) Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 258: 565–574.
26. Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA (2007) Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners. *Fish Physiol Biochem* 75: 165–171.
27. Luca MR, Gerlai R (2012) In search of optimal fear inducing stimuli: differential behavioral responses to computer animated images in zebrafish. *Behav Brain Res* 229: 194–201.
28. Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA (1999) Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann New York Acad Sci* 868: 591–610.
29. Kumar S, Porcu P, Werner DF, Matthews DB, Diaz-Granados JL, et al. (2009) The role of GABA<sub>A</sub> receptor in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology* 205: 529–564.
30. Li J, Bian W, Dave V, Ye JH (2011) Blockade of GABA(A) receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus attenuates voluntary ethanol intake and activates the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Addict Biol* 16: 600–614.
31. Gilman J, Ramchandani V, Davis M, Bjork J, Hommer D (2008) Why we like to drink: a functional magnetic resonance imaging study of the rewarding and anxiolytic effects of alcohol. *J Neurosci* 28: 4583–4591.
32. Sripada CS, Angstadt M, McNamara P, King AC, Phan KL (2011) Effects of alcohol on brain responses to social signals of threat in humans. *Neuroimage* 55: 371–380.

## **10. CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostraram que o contato visual com um predador provoca uma ativação do eixo de estresse nos peixes. Mostraram também uma resposta ao estresse típica de estresse nos peixes receptores de água dos peixes doadores em contato visual com o predador, indicando que os peixes doadores comunicam quimicamente o risco de predação para os peixes receptores.



## 11. REFERÊNCIAS

- ALSOP, D.; VIJAYAN, M.; 2008. **Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish.** Am. J physiol Regul Integr Comp Physiol, 294, 711-719.
- ALSOP, D; VIJAYAN, M.; 2009. **The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost specific genome duplication event.** Gen Comp Endocrinol, 161, 62-66.
- BARCELLOS, L.J.G.; VOLPATO, G.L.; BARRETO, R.E.; COLDEBELLA, I.; FERREIRA, D.; 2011. **Chemical communication of handling stress in fish.** Physiology & Behavior, 103, 372-375.
- BARCELLOS, L.J.G.; RITTER, F.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; DA SILVA, L.B.; BEDIN, A.C.; FINCO, J.; CERICATO, L.; 2007. **Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*.** Aquaculture, 272, 774-778.
- BARCELLOS, L.J.G.; RITTER, F.; KREUTZ, L.C.; CERICATO, L.; 2010. **Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator.** Journal of Fish Biology, 76, 1032-1038.
- BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; DA ROSA, J. G. S.; FAGUNDES, M.; 2012. **Fish age, instead of weight and size, as a determining factor for time course differences in cortisol response to stress.** Physiology & Behavior, 107, 397-400.
- BARRETO, R.E.; BARBOSA, A.; GIASSI, A.C.C.; HOFFMANN, A.; 2010. **The “club” cell and behavioural and physiological responses to chemical alarm cues in the Nile Tilapia.** Mar Fresh Behav Physiol, 43, 75-81.
- BARRETO, R. E.; MIYAI, C. A.; SANCHES, F. H. C.; GIAQUINTO, P. C.; DELICIO, H. C.; VOLPATO, G. L.; 2013. **Blood cues induce anipredator behavior in Nile Tilapia conspecifics.** Plos One, 8, e54642.
- BARTON, B.A.; 2002. **Stress in Fishes: A Diversity of Responses With Particular References to Changes in Circulating Corticosteroids.** Integ. And Comp. Biol., 42, 517-525.

BASS, S. L.; GERLAI, R.; 2008. **Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish.** Behavioral brain research, 186, 107-117.

BELL, A.M.; BACKSTROM, T.; HUNTINGFORD, F.A.; POTTINGER, T.G.; WINBERG, S.; 2007. **Variable neuroendocrine responses to ecologically-relevant challenges in sticklebacks.** Physiology and Behavior, 91, 15-25.

BRADBURY, J.; 2004. **Small Fish, Big Science.** Plos biology, 2(5), e148.

BRONMARK, C.; HANSSON, L.; 2000. **Chemical communication in aquatic systems: an introduction.** Oikos, 88, 103-109.

BRYER, P. J.; MIRZA, R. S.; CHIVERS, D. P.; 2001. **Chemosensory assesment of predation risk by slimy sculpins (*Cottus cognatus*): responses to alarm, disturbance, and predator cues.** Journal of Chemical Echology. 27, 533-546.

BONGA, W. S. E.; 1997. **The stress response in fishes.** Physiol. Rev. 77, 591-625.

CACHAT, J.; CAVANELLO, P.; ELEGANTE, M.; BARTELS, B.; HART, P.; BERGNER, C.; EGAN, R.; DUNCAN, A.; TIEN, D.; CHUNG, A.; WONG, K.; GOODSPEED, J.; TAN, J.; GRIMES, C.; ELKHAYAT, S.; SUCIU, C.; ROSENBERG, M.; CHUNG, K.M.; KADRI, F.K.; ROY, S.; GAIKWAD, S.; STEWART, A.; ZAPOLSKY, I.; GILDER, T.; MOHNOT, S.; BEESON, E.; AMRI, H.; ZUKOWSKA, Z.; SOIGNIER, R.D.; KALLUEF, A.V.; 2009. **Modeling withdrawl syndrome in zebrafish.** Behavioral Brain Research. 208, 371-376.

CANAVELLO, P. R.; CACHAT, J. M.; BEESON, E. C.; LAFFON, A. L.; GRIMES, L.; HAYMORE, W.A.M.; ELEGANTE, M. F.; BARTELS, B.K.; HART, P.C.; ELKHAYAT, S.I.; 2011. **Measuring Endocrine (Cortisol) Responses of Zebra fish to Stress.** Zebrafish Neurobehavioral Protocols, 51, 135-142.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M.; 1997. **Contaminação de águas subterrâneas pelo derramamento de gasolina: O problema é grave?.** Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, 2, 50-54.

DUGLOS, C. A.; RABIN, R. A.; 2003. **Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations.** Pharm, Biochem. Behaviour, 74, 471-480.

DULAWA, S. C.; HOLICK, K. A.; GUNDERSEN, B.; HEN, R.; 2004. **Effects off chronic fluoxetine in animal models of anxiet and depression.** *Neuropsychopharmacology*, 29, 22-30.

EGAN, R. J.; BERGNER, C. L.; HART, P. C.; CACHAT, J. M.; CANAVELLO, P. R.; ELEGANTE, M. F.; ELKHAYAT, S. L.; BARTELS, B. K.; TIEN, A. K.; TIEN, D. H.; MOHNOT, S.; BEESON, E.; GLASGOW, E.; AMRT, H.; ZUKOWSKA, Z.; KALUEFF, A. V.; 2009. **Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish.** *Behavioral Brain Research*, 205, 38-44.

ERRICO, A.L.; PARSONS, O.A.; KING, A.C.; LOVALLO, W.R.; 1993. **Attenuated response to biobehavioral stressors in sober alcoholics.** *Journal of Studies on Alcohol*, 54, 393-398.

FERREIRA, S. M.; 2007. **Água, etanol e gasolina.** *Revista Águas subterrâneas*, 1º ed.; ano 1; outubro. 23-24.

GALDURÓZ, J.C.F.; CAETANO, R.; 2004. **Epidemiologia do uso de álcool no Brasil.** *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 26, 3-6.

GALLASSI, A.D.; ALVARENGA, P.G.; ANDRADE, A.G.; COUTTOLENC, B.F.; 2008. **Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool.** *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 35, 25-30.

GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R.; 2011. **Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 99, 480-486.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S., ROSENTHAL, A.; 2000. **Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 67, 773-782.

GERLAI, R.; 2010. **Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research?.** *Behavior Brain Research*, 207 (2), 223-231.

GERLAI, R.; 2003. **An uncharted behavior genetic model.** *Behavior Genetics*, 33, 461-468.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R.; 2006. **Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*).** *Pharmacol Biochem Behav*, 85, 752-761.

GIANOULAKIS, C.; DAI, X.; BROWN, T.; 2003. **Effect of chronic alcohol consumption on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and pituitary  $\beta$ -endorphin as a function of alcohol intake, age, and gender.** *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 27, 410-423.

HAZLERIGG, C. R. E.; LORENZEN, K; THORBEEK, P.; WHEELER, J. R.; TYLER, C. R.; 2012. **Density-Dependent Processes in the Life History of Fishes: Evidence from Laboratory Populations of Zebrafish *Danio rerio*.** *Plos one*. 37550

HONDA, R.T.; FERNANDES-DE-CASTILHOS, M.; VAL, L.A.; 2008. **Cadmium-induced disruption of environmental exploration and chemical communication in matrinxã, *Brycon amazonicus*.** *Aquatic toxicology*, 89, 204-206.

JORDÃO, L.C.; VOLPATO, G. L.; 2000. **Chemical transfer of warning information in non-injured fish.** *Behavior*, 137, 681-690.

KIESECKER, J. M.; CHIVERS, D. P.; MARCO, A.; QUILCHANOS, C.; ANDERSON, M. T.; BLAUSTEIN, A.; 1999. **Identification of a disturbance signal in larval red-legged frogs, *Rana aurora*.** *Animal Behaviour*, 57, 1295-1300.

KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G., SILVA, T.O., ANZILIERO, D., MARTINS, D., LORENSON, M., MARTENINGHE, A., SILVA, L. B., 2008. **Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfishes (*Rhamdia quelen*), fingerlings.** *C. Rural* 38, 1050–1055.

KORPI, N. L.; WISENDEN, B. D.; 2001. **Learned recognition of novel predator odour by zebra danio, *Danio rerio*, following time-shifted presentation of alarm cue and predator odour.** *Environ Biol. Fishes*, 61, 205-211.

KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T.A.; DA ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.; BARCELLOS, L.J.G.; 2012. **Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages.** *Physiology & Behavior*, 106, 129-132.

KUMAR, S.; PORCU, P.; WERNER, D. F.; MATTHEWS, D. B.; DIAZ-GRANADOS. J. L.; HELFAND, R. S.; MORROW, A. L.; 2009. **The role of GABA<sub>A</sub> receptor in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress.** *Psychopharmacology*, 205, 529-564.

LUCA, M. R.; GERLAI, R.; 2012. **Animated bird silhouette above the tank: Acute alcohol diminishes fear responses in zebra fish.** *Behavioural Brain Research*, 229, 194-201.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD J. C.; 2003. **The concept of allostasis in biology and biomedicine.** *Horm Behav*, 4, 2–15.

MILLER, N.; GREENE, K.; DYDINSKI, A.; GERLAI, R.; 2013. **Effects of nicotine and alcohol on zebrafish (*Danio rerio*) shoaling.** *Behavioural Brain Research*, 240, 192-196.

MIKLÓSI, A.; ANDREW, R.J.; 2006. **The Zebra fish as a model for behavioral studies.** *Zebrafish*, 3, 227-234.

MOHNOT, S.; BEESON, E.; GLASGOW, E.; AMRI, H.; ZUKOWSKA, Z.; KALUEFF, A. V.; 2009. **Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish.** *Behavioral Brain Research*, 205, 38-44.

MOMMSE, T. P., VIJAYAN, M. M., MOON, T. W., 1999. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Rev. Fish Biol. Fish*, 9, 211-268.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. 2001. **Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla Anguilla L.*)** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53:331-347.

PAN, Y.; KAIGUO, M.; WESTWOOD, T. J.; GERLAI, R.; 2011. **Chronic alcohol exposure induced gene expression changes in the zebrafish brain.** *Behavioural Brain Research*, 216, 66-76.

PARKER, M. O.; MILLINGTON, M. E.; COMBE, F. J.; BRENNAN, C. H.; 2012. **Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics.** *Plos one*, 7, 1-9.

RADCLIFFE, K. A.; FISHER, J. L.; GRAY, R.; DANI, J. A. 1999. **Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 868, 591–610.

RAMSAY, J.M.; FEIST, G.W.; VARGA, Z.M.; WESTERFIELD, M.; KENT. M.L.; SCHRECK, C.B.; 2009. **Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress.** *Aquaculture*, 297, 157-162.

RANG, P. H.; DALE, M. M.; RITTER, M. J.; FLOWER, J.; **Farmacologia.** 2007 Elsevier, 6ª edição, p 628.

SCHMIDT, C.A.B.; 2010. **Remediação in situ de solos e águas subterrâneas contaminados por líquidos orgânicos não miscíveis em água (NAPLs)**. Coletânea em Saneamento ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.1, p8.

SINK, T. D., LOCHMANN, R.T., FECTEAU, K.A.;2007. **Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners**. Fish Physiol. Biochem,75, 165-171.

SMITH, L. S.; 1982. **Introduction of Fish Physiology**. Los Angeles: T. H. F., 1982. 353p.  
In: BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G; WOEHL, V. M; Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse: causas e consequências (Revisão), Boletim do Instituto da Pesca, São Paulo, 200, 26, 99-111

SPEEDIE, N.; GERLAI, R.; 2008. **Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*)**. Behav Brain Res, 188, 168-177.

STEPHANIE, L. S. B.; GERLAI, R.;2008. **Zebra fish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish**. Behav. Brain Research. 186, 107-117.

SUMPTER, J. P.; PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G.; 1985. **Stress-Induced Elevation of Plasma  $\alpha$ -MSH and Endorphin in Brown Trout, *Salmo trutta* L**. General and Comparative Endocrinology, 59, 257-265

TOA, D.G.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.;2004. **Stress response of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to chemical cues released from stressed conspecifics**. Fish Physiology and Biochemistry, 30, 103-108.

TUDORRACHE, C.; BLUST, R.; BOECK, G.; 2008. **Social interactions, predation behavior and fast start performance are affected by ammonia exposure in brown trout (*Salmo trutta*)**. Aquatic toxicology, 90, 145-153. In: WEBER, P.; LANG, C.; BALDISSEROTTO, B.; 2012. Antipredator and alarm reaction responses of silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to waterborne ammonia. Neotropical Ichthyology, 10, 445-450.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-USEPA (2000) **Water Quality Inventory**. In: Estudo de caso de atenuação natural de pluma de gasolina e etanol. Acesso: 17 de março de 2012. Disponível em:<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/asubterraneas/index>.

WINSENDEN, B. D.; CHIVERS, D. P.; SMITH, R. J. F.; 1995. **Early warning in the predation sequence: a disturbance pheromone in Iowa Darters (*Etheostoma exile*).** Journal of Chemical Ecology, 21, 1469-1480.

WINSENDEN, B. D.; 2000. **Olfactory assessment of predation risk in aquatic environment.** The Royal Society, 355, 1205-1208.

WISSENDEN, B. D.; VOLLBRECHT, K. A.; BROWN, J. L.; 2004. **Is there a fish alarm cue? Affirming evidence from a wild study.** Anim. Behav., 67, 59-67.a