

FRANCIELE MACEDO DA CRUZ

**INTERAÇÃO INSETO-PEIXE NO PROCESSO DE REVERSÃO SEXUAL
DA TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C957i Cruz, Franciele Macedo da, 1991-
2017 Interação inseto-peixe no processo de reversão sexual da
tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* / Franciele Macedo da
Cruz. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tilápia (Peixe) - Reprodução. 2. Tilápia - Hormônios sexuais. 3. 17 β -metiltestosterona. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 639.3774

FRANCIELE MACEDO DA CRUZ

**INTERAÇÃO INSETO-PEIXE NO PROCESSO DE REVERSÃO SEXUAL
DA TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2017.

Gislaine Aparecida Carvalho

Ana Lúcia Salaro
(Coorientadora)

Eugênio Eduardo de Oliveira
(Orientador)

Agradecimentos

À Deus, por me guiar e proteger, eбенézer: até aqui nos ajudou o senhor!

Agradeço aos meus pais Irani M.^a Macedo da Cruz e Armando Urbano da Cruz por serem o melhor de mim, sem vocês eu não seria nada! Obrigada por tudo!

Ao meu irmão Cassiano A. Macedo da Cruz pelo apoio e incentivo.

A todos os meus familiares, amigos de Viçosa, Araponga e de República, que sempre torceram pelas minhas conquistas, obrigada do fundo do meu coração!

Agradeço ao Professor Eugênio E. Oliveira pela orientação e amizade, mesmo nos dias mais difíceis.

Agradeço a minha Coorientadora Ana Lúcia Salaro pela orientação, amizade e pelo espaço cedido para realização deste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Invertebrados, a amizade de vocês foram essenciais durante este tempo de convívio, em especial ao “Entomogatas” pelos encontros que proporcionaram muitos risos e descontrações.

Agradeço aos meus estagiários, Gabryele Ramos, Shaiene Silva, Ryan Souza e Alessandra Lopes por serem persistentes e por todo apoio na criação e nos experimentos.

Agradeço aos amigos da Piscicultura, Cristiana L. S. Carneiro, José Francisco Luciano (Teté) e William Chaves, obrigada por dividirem horas do dia de vocês, me auxiliando nos experimentos e pela amizade.

Agradeço em especial ao Ryan Souza e a Sarah Miranda por toda ajuda também na condução destes experimentos.

Agradeço em especial ao Wilson R. Valbon e Felipe Andreazza por todo ensinamento e paciência com os experimentos, dissertação e as dúvidas frequentes.

Agradeço ao Sr. Zé, técnico da Piscicultura pela disposição e auxílio na captura dos peixes.

Agradeço a Professora Mariella B. D. Freitas e Reggiani V. Gonçalves pelo espaço cedido para realização das análises deste trabalho, como também a Dr. Jerusa Oliveira por todo ensinamento e apoio.

Agradeço a Dr. Gislaíne A. Carvalho, pelo auxílio nas análises, amizade e por aceitar compor minha banca de defesa.

Agradeço ao Professor Jener A. S. Zuanon pelo empréstimo de equipamentos.

Agradeço ao Departamento de Entomologia e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de cursar meu mestrado e realizar este trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Gratidão... Que Deus abençoe ricamente a vida de cada um de vocês!

Resumo

CRUZ, Franciele Macedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Interação inseto-peixe no processo de reversão sexual da tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus***. Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientadora: Ana Lúcia Salaro.

Nos ecossistemas aquáticos, coabitam uma infinidade de organismos, incluindo insetos e peixes. A barata d'água, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae), é uma importante predadora generalista que vive em ambientes de água doce, consumindo outros invertebrados e até mesmo pequenos vertebrados. Uma das presas potenciais das baratas d'água são as fases imaturas (e.g., larvas) da tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*. A tilápia-do-nylo é uma das espécies mais cultivadas no mundo e sua fase de larva pode ser muito prejudicada pela presença de seus predadores e por outros agentes estressores (e.g., temperatura, pH, amônia e xenobióticos). Para garantir uma melhor produtividade destes peixes, tem se utilizado a técnica para reversão sexual de larvas com a utilização do hormônio 17 α -metiltestosterona, o que resulta na obtenção de animais monosexos (machos), garante maiores taxas de crescimento e evita superpopulação nos tanques de cultivo. Entretanto, pouco se sabe dos potenciais efeitos deste hormônio em organismos aquáticos não-alvos. Em vista disso, esta dissertação foi conduzida com objetivo de avaliar os efeitos do hormônio 17 α -metiltestosterona no desenvolvimento biológico e nas habilidades predadoras de ninfas de *B. anurum*, bem como averiguar se a presença de *B. anurum* interfere na fisiologia oxidativa de larvas de *O. niloticus*. Para se avaliar os efeitos da exposição de *B. anurum* ao 17 α -metiltestosterona, foram avaliados o desenvolvimento biológico (i.e., do terceiro ínstar até a fase adulta), a razão sexual e as habilidades predatórias (i.e., consumo diário de larvas), durante o processo de reversão sexual das larvas de *O. niloticus*. Além disto, bioensaios de sobrevivência foram conduzidos em ninfas de terceiro ínstar de *B. anurum* expostas a diferentes concentrações (i.e., 0,01; 0,1; 1,0; 3,0; 10 e 30 mg/L) do hormônio. Observou-se que nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L houve aumento no tempo de sobrevivência em relação ao controle. Em apenas 24 h de exposição, as maiores concentrações (10 e 30 mg/L) foram letais para todos os insetos testados. Já para avaliar os efeitos de *B. anurum* nos peixes, os insetos foram acondicionados em

potes plásticos flutuantes para manter contato indireto com os peixes que se encontravam em aquários. Nestes experimentos, foram averiguados se o crescimento produtivo, resposta ao estresse e a capacidade antioxidante das larvas foram comprometidas pelo potencial estresse desencadeado pela presença das baratas d'água. Os resultados apontaram que a exposição subletal de *B. anurum* ao $17\ \alpha$ -metiltestosterona resultou em benefícios (e.g., maiores habilidades de sobrevivência como também menor duração do quinto ínstar) ao inseto aquático e que na presença do inseto aumentou-se a quantidade de glicose, lactato e a produção de SOD (superóxido dismutase) dos peixes. Portanto, com base nos resultados aqui descritos, conclui-se que larvas de tilápias-do-nylo é afetada quando em situação de risco predatório. Entretanto, novas experimentações precisam ser conduzidas para se averiguar se estas respostas benéficas ao inseto não poderiam por torná-los uma maior ameaça a produção de larvas revertidas sexualmente, uma vez que eles poderão permanecer por mais tempo nos ambientes contendo concentrações subletais do hormônio $17\ \alpha$ -metiltestosterona.

Abstract

CRUZ, Franciele Macedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Fish-insect interaction in the sexual reversal process of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus***. Advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-Advisor: Ana Lúcia Salaro.

The water bug, *Belostoma anurum* (Hemiptera: Belostomatidae) is an important generalist predator living in freshwater environments consuming other invertebrates and even small vertebrates. One of the potential prey of water bugs is the immature stages (e.g., larvae) of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The Nile tilapia is one of the most cultivated species in the world and its larva stage can be greatly impaired by the presence of its predators and other stresses (e.g., temperature, pH, ammonia and xenobiotics). To ensure a better productivity of this fish, it has been used a technique for sexual reversion of larvae using the hormone 17 α -methyltestosterone which results in monosex (male) animals, in order to guarantee higher growth rates and avoid overpopulation in the tanks of cultivation. However, little is known about the potential effects of this hormone in non-target aquatic organisms. Therefore, the present study was conducted with the objective of evaluating the effects of the hormone 17 α -methyltestosterone on the biological development of *B. anurum* and its predatory abilities, as well as to determine if the presence of *B. anurum* interferes in oxidative physiology of *O. niloticus* larvae. In order to evaluate the effects of exposure of *B. anurum* to 17 α -methyltestosterone, it was evaluated the biological development (i.e., from third stage to adulthood), sex ratio and predatory skills (i.e., daily consumption of larvae) during the process of sexual reversal of *O. niloticus* larvae. In addition, survival bioassays were conducted in third-instar nymphs of *B. anurum* exposed to different concentrations (i.e., 0,01; 0,1; 1,0; 3,0; 10 and 30 mg / L) of the hormone. It was observed that at concentrations of 0,01 and 0,1 mg / L there was an increase in the survival time compared to the control. In only 24 h of exposure, the higher concentrations (10 and 30 mg / L) were lethal for all insects tested. So as to evaluate the effects of *B. anurum* on the fishes, the insects were conditioned in floating plastic pots kept in indirect contact with the fishes found in the aquarium. In those experiments, it was investigated whether the productive growth, stress response and antioxidant capacity of the larvae were compromised by the potential stress triggered by the presence of water bugs. The results indicated that the sub lethal exposure of

B. anurum to 17 α -methyltestosterone resulted in benefits (eg, higher survival skills as well as lower duration of the fifth instar) to the aquatic insect and, in the presence of insect, it was increased the amount of glucose, lactate and the production of SOD (superoxide dismutase) of the fishes. Therefore, based on the results described here, it is concluded that the larvae stage of Nile tilapia is affected when in predatory risk. However, new experiments need to be conducted to see if these beneficial responses of the insect could not make them a greater threat to the production of sexually reverted larvae, since they may remain for a longer time in environments containing sub lethal concentrations of 17 α -methyltestosterone.

Sumário

Introdução geral	1
Referências	3
Efeito do hormônio 17 α-metiltestosterona no desenvolvimento da barata d'água, <i>Belostoma anurum</i>	6
Resumo	7
Abstract	8
1.1 Introdução	9
1.2 Material e Métodos	10
1.2.1 Obtenção e criação dos insetos	10
1.2.2 Obtenção dos peixes	11
1.2.3 Desenvolvimento de ínstar em laboratório	11
1.2.4 Desenvolvimento de ínstar - hormônio presente na alimentação dos peixes	12
1.2.5 Desenvolvimento de ínstar - hormônio presente na água e na alimentação	14
1.2.6 Razão sexual das baratas d'água	15
1.2.7 Consumo de peixes pelas baratas d'água	15
1.2.8 Sobrevivência	15
1.2.9 Análises estatísticas	16
1.3 Resultados	16
1.4 Discussão	26
1.5 Agradecimentos	28
1.6 Referências	28
Efeito do predador <i>Belostoma anurum</i> no desenvolvimento das larvas de tilápia-do-nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	32
Resumo	33
Abstract	33
2.1 Introdução	34
2.2 Material e Métodos	36
2.2.1 Ética experimental	36
2.2.2 Obtenção e criação dos insetos	36
2.2.3 Obtenção dos peixes	36
2.2.4 Primeiro bioensaio: crescimento produtivo	37
2.2.5 Segundo bioensaio: crescimento produtivo e fisiologia oxidativa	39
2.2.5.1 Crescimento produtivo	40

Sumário

2.2.5.2	<i>Resposta ao estresse</i>	40
2.2.5.3	<i>Estresse oxidativo</i>	41
2.2.6	<i>Análises estatísticas</i>	43
2.3	Resultados	43
2.3.1	<i>Primeiro bioensaio: crescimento produtivo</i>	43
2.3.2	<i>Segundo bioensaio: crescimento produtivo e fisiologia oxidativa</i>	43
2.3.2.1	<i>Crescimento produtivo</i>	43
2.3.2.2	<i>Resposta ao estresse</i>	46
2.3.2.3	<i>Estresse oxidativo</i>	47
2.4	Discussão	48
2.5	Agradecimentos	51
2.6	Referências	51
	Conclusões gerais	57

Introdução geral

É cada vez mais evidente que o impacto dos predadores não está apenas associado com a morte de suas presas, mas pode acarretar em alterações no comportamento, fisiologia e na morfologia delas (Fordyce 2006; Creel and Christianson 2008; Berg and Ellers 2010; Boonstra 2013; Zanette et al. 2014). Conseqüentemente, uma série de fatores hormonais estão associados a estas respostas do organismo (Fraker 2009; Preisser 2009; Sheriff et al. 2009) e podem ser divididos em primários, secundários e terciários (Iwama 1998; Brandão et al. 2006). Nas respostas primárias, há o aumento dos hormônios adrenalina, noradrenalina e cortisol no plasma. Em virtude da ação desses hormônios, ocorre os de ações secundárias, aumento na glicemia, no ácido láctico plasmático, redução no glicogênio hepático e muscular, alterações no hematócrito, proteínas plasmáticas e no número de linfócitos. Por fim, os terciários, levam a redução no desempenho produtivo e reprodutivo e a diminuição na capacidade imunológica, aumentando a suscetibilidade a doenças do organismo que está passando por um processo de estresse (Iwama 1998; Brandão et al. 2006).

No ecossistema aquático, há uma imensa diversidade de interações entre os invertebrados e os vertebrados, vivendo numa constante luta para sobreviver. Toma-se como exemplo, a baratas d'água, *Belostoma anurum* (Herrich-Schaeffer 1848) (Hemiptera: Belostomatidae), importante predadora generalista que coexiste no ambiente aquático com suas presas, consumindo pequenos invertebrados e vertebrados (Consoli et al. 1989; Pereira et al. 1993; Toledo 2003; Shaalan and Canyon 2009; Kweka et al. 2011). Uma dessas presas, é a tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) (Perciformes: Cichlidae), estes peixes estão entre um dos mais cultivados em todo o mundo (FAO 2016), e em sua fase de larva podem ser muito prejudicados pela presença de seus predadores. Além do risco de predação (Bae et al. 2012; Bae and Park 2014), passam por outros tipos de estresses, como do ambiente em geral (e.g., temperatura, pH, amônia e xenobióticos) (Hawlena and Schmitz 2010a).

Como as tilápias-do-nilo são muito comercializadas, muitos piscicultores utilizam

da técnica de reversão sexual, através do hormônio 17 α -metiltestosterona na dieta para que a população seja revertida em machos (Chakraborty et al. 2011; Rivero-Wendt et al. 2014). Isto implica em maior taxa de crescimento dos machos em relação as fêmeas (El-Sayed 2006; Rivero-Wendt et al. 2013; Golan and Levavi-Sivan 2014; Ma-teen et al. 2015) e evita a superpopulação nos tanques. Desta forma, nesta fase inicial da reversão a presença do predador pode interferir na resposta ao estresse, na taxa de crescimento produtivo e no estresse oxidativo, comprometendo a saúde dos peixes (e.g., os peixes ficam susceptíveis a doenças).

Outro fator importante desta técnica é com relação ao efeito que o hormônio 17 α -metiltestosterona pode acarretar aos organismos não-alvo e ao ambiente (Gall et al. 2011; Ong et al. 2012; Abo-Al-Ela et al. 2017). A exposição a contaminantes, como metais pesados, pesticidas, fármacos, podem causar vários efeitos tóxicos (e.g., afetar a reprodução, natação e alimentação), e mais estudos destes efeitos sobre um organismo exposto é essencial para a compreensão das diferentes respostas biológicas e os mecanismos de toxicidade dos poluentes (Rivadeneira et al. 2013). Quando os organismos não-alvo estão sob condições de estresse ambientais, os primeiros efeitos estão no nível subcelular causando a interrupção de vias metabólicas normais (Ansaldò et al. 2006) e aumentando a produção de radicais livres, levando ao estresse oxidativo, e consequentemente, os radicais livres podem causar danos as células do organismo.

Muitos invertebrados aquáticos são também usados como bioindicadores de qualidade de água, o que lhes tornam excelentes modelos para avaliação da contaminação de corpos d'água por xenobióticos (Mogren et al. 2013; Halstead et al. 2015), além de terem um importante papel na cadeia alimentar (Belgrad and Griffen 2016). Percebe-se que há poucos estudos realizados com esse grupo de animais e sua interação com os vertebrados. A par dessas informações, a presente dissertação foi conduzida a fim de verificar a interação inseto-peixe, com os seguintes objetivos: (I) averiguar as alterações nos parâmetros biológicos e comportamentais de *B. anurum* sob exposição subletal do hormônio 17 α -metiltestosterona e (II) avaliar o efeito do predador *B. anurum* considerado um agente estressor para suas presas, as tilápias-do-nilo, durante o processo de reversão sexual.

Referências

- Abo-Al-Ela, H. G., A. F. El-Nahas, S. Mahmoud, and E. M. Ibrahim (2017). The extent to which immunity, apoptosis and detoxification gene expression interact with 17 α -methyltestosterone. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 289–298.
- Ansaldo, M., D. E. Nahabedian, E. Holmes-Brown, M. Agote, C. V. Ansay, N. R. V. Guerrero, and E. A. Wider (2006). Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology* 224(1), 119–127.
- Bae, M.-J., J.-S. Kim, and Y.-S. Park (2012). Evaluation of changes in effluent quality from industrial complexes on the Korean nationwide scale using a self-organizing map. *International journal of environmental research and public health* 9(4), 1182–1200.
- Bae, M.-J. and Y.-S. Park (2014). Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review. *Science of the Total Environment* 466, 635–649.
- Belgrad, B. A. and B. D. Griffen (2016). Predator–prey interactions mediated by prey personality and predator hunting mode. In *Proc. R. Soc. B*, Volume 283, pp. 20160408. The Royal Society.
- Berg, M. P. and J. Ellers (2010). Trait plasticity in species interactions: a driving force of community dynamics. *Evolutionary Ecology* 24(3), 617–629.
- Boonstra, R. (2013). Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology* 27(1), 11–23.
- Brandão, F. R., L. de Carvalho Gomes, and E. C. Chagas (2006). Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica* 36(3), 349.
- Chakraborty, S. B., S. Banerjee, and S. Chatterjee (2011). Increased androgen receptor expression in muscle tissue contributing to growth increase in androgen-treated Nile tilapia. *Aquaculture International* 19(6), 1119–1137.
- Consoli, R. A., M. H. Pereira, A. L. Melo, and L. H. Pereira (1989). *Belostoma micantulum* Stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(4), 577–578.
- Creel, S. and D. Christianson (2008). Relationships between direct predation and risk effects. *Trends in Ecology & Evolution* 23(4), 194–201.
- El-Sayed, A.-F. M. (2006). *Tilapia culture*. CABI.
- FAO (2016). Food and agriculture organization of the United Nations.
- Fordyce, J. A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology* 209(12), 2377–2383.

- Fraker, M. E. (2009). Predation risk assessment by green frog (*Rana clamitans*) tadpoles through chemical cues produced by multiple prey. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63(10), 1397–1402.
- Gall, H. E., S. A. Sassman, L. S. Lee, and C. T. Jafvert (2011). Hormone discharges from a midwest tile-drained agroecosystem receiving animal wastes. *Environmental science & technology* 45(20), 8755–8764.
- Golan, M. and B. Levavi-Sivan (2014). Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *General and comparative endocrinology* 207, 50–55.
- Halstead, N. T., D. J. Civitello, and J. R. Rohr (2015). Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. *Chemosphere* 135, 265–271.
- Hawlena, D. and O. J. Schmitz (2010a). Physiological stress as a fundamental mechanism linking predation to ecosystem functioning. *The American Naturalist* 176(5), 537–556.
- Herrich-Schaeffer, G. A. W. (1848). Die wanzenartigen insecten. *Nuremberg: Lotzbeck, J.R.* 8, 28.
- Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851(1), 304–310.
- Kweka, E. J., G. Zhou, T. M. Gilbreath, Y. Afrane, M. Nyindo, A. K. Githeko, and G. Yan (2011). Predation efficiency of *Anopheles gambiae* larvae by aquatic predators in western Kenya highlands. *Parasites & vectors* 4(1), 128.
- Mateen, A., I. Ahmed, et al. (2015). Androgen sex reversal, subsequent growth and meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pak. J. Agri. Sci* 52(1), 199–202.
- Mogren, C. L., W. E. Walton, D. R. Parker, and J. T. Trumble (2013). Trophic transfer of arsenic from an aquatic insect to terrestrial insect predators. *PloS one* 8(6), e67817.
- Ong, S. K., P. Chotisukarn, and T. Limpiyakorn (2012). Sorption of 17 α -methyltestosterone onto soils and sediment. *Water, Air, & Soil Pollution* 223(7), 3869–3875.
- Pereira, M., R. Silva, A. Azevedo, A. Melo, and L. Pereira (1993). Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 35(5), 405–409.
- Preisser, E. L. (2009). The physiology of predator stress in free-ranging prey. *Journal of Animal Ecology* 78(6), 1103–1105.
- Rivadeneira, P. R., M. Agrelo, S. Otero, and G. Kristoff (2013). Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. *Ecotoxicology and environmental safety* 90, 82–88.

- Rivero-Wendt, C., A. Borges, E. Oliveira-Filho, A. Miranda-Vilela, M. Ferreira, and C. Grisolia (2014). Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Genet Mol Res* 13, 605–615.
- Rivero-Wendt, C. L., A. L. Miranda-Vilela, M. F. Ferreira, A. M. Borges, and C. K. Grisolia (2013). Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Genet Mol Res* 12(3), 3862–3870.
- Shalan, E. A.-S. and D. V. Canyon (2009). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical biomedicine* 26, 223–261.
- Sheriff, M. J., C. J. Krebs, and R. Boonstra (2009). The sensitive hare: sublethal effects of predator stress on reproduction in snowshoe hares. *Journal of Animal Ecology* 78(6), 1249–1258.
- Toledo, L. F. (2003). Predation on seven South American anuran species by water bugs (Belostomatidae). *Phyllomedusa* 2(2), 105–108.
- Zanette, L. Y., M. Clinchy, and J. P. Suraci (2014). Diagnosing predation risk effects on demography: can measuring physiology provide the means? *Oecologia* 176(3), 637–651.

**Efeito do hormônio 17 α -metiltestosterona
no desenvolvimento da barata d'água,
*Belostoma anurum***

Efeito do hormônio 17 α -metiltestosterona no desenvolvimento da barata d'água, *Belostoma anurum*

Resumo

Os xenobióticos em geral, tem o potencial para entrar nos habitats aquáticos, seja pela aplicação direta, escoamento terrestre ou trazidos pelo vento. Mesmo baixas concentrações destes agentes estressores (xenobióticos) podem interferir e alterar uma vasta gama de características nos indivíduos (crescimento, fecundidade e comportamento). Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos na biologia e sobrevivência da barata d'água, *Belostoma anurum*, expostas ao hormônio 17 α -metiltestosterona. Em condições normais de alimentação com larvas de *Aedes aegypti* e ninfas e adultos de *Martarega* spp. e *Buenoa* spp. (Hemiptera: Notonectidae), foi avaliado a duração do ciclo de vida em condições laboratoriais. Também foram avaliados o desenvolvimento biológico (i.e., do terceiro ínstar até a fase adulta), a razão sexual e as habilidades predatórias (i.e., consumo diário de larvas de peixes) destas baratas d'água, quando expostas indiretamente a larvas de *Oreochromis niloticus*, durante o processo de reversão sexual. Além disto, bioensaios de sobrevivência foram conduzidos em ninfas de terceiro ínstar de *B. anurum* expostas a diferentes concentrações (i.e., 0,01; 0,1; 1,0; 3,0; 10 e 30 mg/L) do hormônio 17 α -metiltestosterona. As baratas d'água que se alimentaram de peixes obtiveram menor tempo de desenvolvimento. Quando os insetos foram expostos em água contendo ração com hormônio, não houve efeito significativo no seu ciclo de vida, entretanto quando consumiram peixes revertidos (peixes que estavam passando pelo processo de reversão sexual), o quinto ínstar antecipou seu desenvolvimento. O hormônio não interferiu na proporção de machos adultos resultante. Menores concentrações do hormônio (0,01 e 0,1 mg/L) aumentaram o tempo de sobrevivência dos insetos em relação ao controle. No geral as fêmeas (i.e., terceiro e quarto ínstar) consumiram mais do que os machos, porém ao atingirem o quinto ínstar os machos que consumiram peixes com hormônio se alimentaram mais. Já as baratas d'água do quinto ínstar que consumiram peixes não revertidos, diminuíram sua alimentação ao longo do tempo. Desta forma, este estudo sugere que a exposição subletal de ninfas de *B. anurum* ao 17 α -metiltestosterona resultou em benefícios (e.g., maiores habilidades de sobrevivência como também menor duração do

quinto ínstar) ao inseto aquático.

Palavras-chave: Percevejo aquático, Xenobiótico, Hormese

Abstract

Xenobiotics in general have the potential to enter in aquatic habitats, either by direct application, land flow or when it is carried by the wind. Even low concentrations of these stressors (xenobiotics) can interfere and alter a wide variety of characteristics in the individuals (growth, fertility and behavior). Thus, this study was conducted aiming to evaluate the effects on the biology and survival of water bugs, *Belostoma anurum*, exposed to the hormone 17 α -methyltestosterone. Under normal feeding conditions with *Aedes aegypti* larvae (L4), nymphs and adults of *Martarega* spp. and *Buenoa* spp. (Hemiptera: Notonectidae), the water bug life cycle duration was evaluated under laboratory conditions. It was also evaluated the biological development (i.e., from the third instar to the adult stage), sex ratio and predatory abilities (i.e., daily consumption of fish larvae) of these water bugs, when exposed indirectly to larvae of *Oreochromis niloticus* during the sexual reversal process. In addition, survival bioassays were conducted on third instar nymphs of *B. anurum* exposed to different concentrations (i.e., 0,01; 0,1; 1,0; 3,0; 10 and 30 mg / L) of the hormone 17 α -methyltestosterone. The water bugs fed with fishes obtained less development time. When the insects were exposed in water containing feed with hormone, there was no significant effect on their life cycle, however when they consumed reversed fishes (fishes that were going through the process of sexual reversion), the fifth instar anticipated its development. The hormone did not interfere with the resulting adult male ratio. Lower concentrations of the hormone (0.01 and 0.1 mg / L) increased the survival time of the insects in relation to the control. In general, females (i.e., third and fourth instar) consumed more than males, but when they reached the fifth instar, the males that consumed fishes with the hormone fed more. The water bugs of the fifth instar that consumed non-reversed fishes decreased their feeding over time. Thus, this study suggests that the sub lethal exposure of *B. anurum* nymphs to 17 α -methyltestosterone resulted in benefits (e.g., higher survival skills as well as lower duration of the fifth instar) to the aquatic insects.

Key words: Water bug, Xenobiotic, Hormesis

1.1 Introdução

Muitos estudos em laboratório tem sido capazes de demonstrar os mecanismos por meio dos quais os xenobióticos podem afetar os ecossistemas aquáticos (Relyea and Hoverman 2006). Para que haja a contaminação, eles chegam até o meio aquático pela aplicação direta, escoamento terrestre ou trazidos pelo vento (Norum et al. 2010; Relyea and Hoverman 2006). Conseqüentemente, muitos organismos não-alvo são afetados (Halstead et al. 2015; Gutiérrez et al. 2016) por baixas concentrações destes contaminantes, causando efeitos subletais, que podem alterar o desenvolvimento, fisiologia e comportamento (reprodutivo, natatório e predatório) (Relyea 2004; Relyea and Hoverman 2006; Halstead et al. 2014).

Uma forma de contaminação por xenobióticos, é o uso intensivo de hormônios (andrógenos) na aquicultura, que tem sido preocupante, não só em relação à imunidade dos peixes, como também em relação ao meio ambiente (Abo-Al-Ela et al. 2017). Para a produção de monosexos de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) (Perciformes: Cichlidae), é utilizado o hormônio 17 α -metiltestosterona, que produz mais de 90% de peixes masculinos (Chakraborty et al. 2011) e melhora o desempenho produtivo das larvas, sendo um ótimo benefício para o piscicultor. Com isso, resíduos deste hormônio já foram encontrados na água (Barbosa et al. 2013; Rivero-Wendt et al. 2013; Megbowon and Mojekwu 2014), podendo afetar organismos não-alvo (Gall et al. 2011; Rivero-Wendt et al. 2016; Abo-Al-Ela et al. 2017). Além do mais, o uso da dieta artificial com ou sem hormônio favorece a proliferação de agentes patogênicos, uma vez que, maior quantidade de peixes e alimentação artificial depositada no fundo do ambiente aquático gera aumento da matéria orgânica (Garcia et al. 2013; Dias-Neto et al. 2016).

Existe uma carência de informações voltadas aos efeitos desse hormônio em organismos aquáticos não-alvo. Mais estudos precisam ser desenvolvidos, pois há muitos fármacos sendo despejados no meio aquático (Relyea and Hoverman 2006; Contardo-Jara et al. 2010) que podem até causar efeito hormético. Que é o comportamento de duas respostas quando o organismo é exposto a um agente estressor (pesticidas e fármacos) sendo uma de efeito positivo quando expostos a baixas concentrações e outra

negativa para altas concentrações (Calabrese and Blain 2005; Mattson 2008; Murado and Vázquez 2010).

Os invertebrados aquáticos são modelos na avaliação de risco toxicológico por estarem em contato com poluentes durante seu ciclo de vida. A espécie *Belostoma anurum* (Herrich-Schaeffer 1848) (Hemiptera: Belostomatidae), conhecida popularmente como barata d'água, são encontradas em água doce (riachos, lagoas e tanques de piscicultura) associadas a vegetação de áreas tropicais, subtropicais e temperadas (Haddad et al. 2010; Tara and Kour 2014). São predadoras de pequenos peixes, girinos, caracóis e algumas larvas de insetos vetores de doenças (Consoli et al. 1989; Pereira et al. 1993; Toledo 2003; Shaalan and Canyon 2009; Kweka et al. 2011). Toda a sua fase de desenvolvimento ocorre na água, desta forma, estes insetos podem está em contato direto com o xenobiótico (e.g., o hormônio 17 α -metiltestosterona). Mediante a isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do hormônio 17 α -metiltestosterona na barata d'água, *B. anurum*, considerado um organismo não-alvo.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Obtenção e criação dos insetos

Insetos adultos de *B. anurum* foram coletados em tanques do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal (DBA) utilizando rede entomológica (D-net). Posteriormente, eles foram levados para o Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Insetos do Departamento de Entomologia (DDE), ambos da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG, Brasil, 20°45' S, 42°52' W).

No laboratório, os insetos adultos foram mantidos em aquário (30 x 40 x 60 cm) com água proveniente dos tanques de piscicultura em temperatura de 28 ± 2 °C até a postura dos ovos. Após a postura, machos contendo os ovos no dorso, foram transferidos individualmente para um pote de plástico (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) onde permaneceram até a eclosão dos ovos. As ninfas do primeiro ao segundo ínstar foram individualizadas em vidros (5,0 x 2,6 x 2,0 cm) para evitar o canibalismo e alimentadas diariamente com uma larva de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae), até atingirem o terceiro ínstar, que foram utilizadas no experimento.

1.2.2 Obtenção dos peixes

Alevinos de tilápias-do-nylo com quatro dias de idade foram coletadas dos tanques de piscicultura do Setor de Piscicultura e transferidos para o Laboratório de Comportamento e Nutrição de Peixes do Departamento de Biologia Animal da UFV. Permaneceram em aquários de 100 L, contendo água declorada, aeração constante e temperatura de 28 °C.

1.2.3 Desenvolvimento de ínstar em laboratório

Os insetos adultos oriundos do Setor de Piscicultura da UFV eram mantidos em aquários (30 x 40 x 60 cm) para que ocorresse a cópula. Os machos que continham os ovos foram individualizados em potes de plásticos (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) e alimentados diariamente com *Martarega* spp. e *Buenoa* spp. (Hemiptera: Notonectidae) até a emergência das ninfas.

Ninfas do primeiro ao terceiro ínstar foram alimentadas diariamente com larvas de quarto ínstar (L4) de *A. aegypti* e individualizadas em frascos de vidros (5,0 x 2,6 x 2,0 cm). A partir do quarto ínstar, as ninfas foram transferidas para recipientes de vidro maiores (100 mL). Ninfas de quarto e quinto ínstar, foram alimentadas com *Martarega* spp. e *Buenoa* spp. Todos os ínstars foram mantidos em água proveniente dos tanques de piscicultura à 28 ± 2 °C e 12 h de fotoperíodo. Desde a postura dos ovos até a emergência do quinto ínstar, foi avaliado a duração de cada estágio sob condições laboratoriais (Figura 1.1).

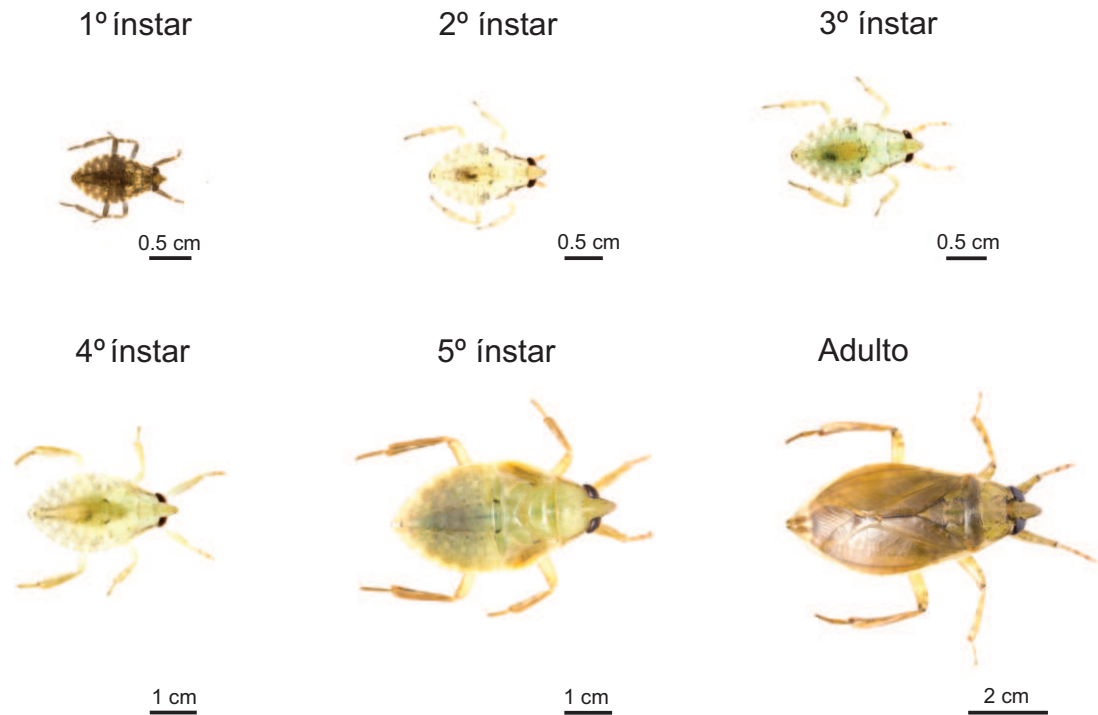


Figura 1.1: Estágios de desenvolvimento da barata d'água *B. anurum*.

1.2.4 Desenvolvimento de ínstar - hormônio presente na alimentação dos peixes

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×1 , sendo duas dietas experimentais (presença ou ausência do hormônio 17α -metiltestosterona na dieta dos peixes) e presença do inseto *B. anurum*, com 14 repetições cada.

Para avaliar o efeito do hormônio (i.e., presente na ração dos peixes dos aquários e que indiretamente estava na mesma água em contato com as baratas d'água) nas fases de desenvolvimento do *B. anurum*, foi utilizado ração comercial em pó (50% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo, 4% de fibra bruta e 14% de matéria mineral - Tabela 1.1), onde uma parte foi destinada para compor a dieta controle dos peixes (sem a presença do hormônio) e a outra metade foi misturado o hormônio 17α -metiltestosterona (Syntex S. A.), na proporção de 60 mg kg^{-1} de ração. O hormônio foi previamente diluído em 0,5 L de álcool 46° INPM para 1 kg de ração. Depois de realizada a mistura, esta ração foi espalhada sobre papel pardo e seco à sombra em temperatura ambiente por 24 horas.

Tabela 1.1: Níveis de garantia da ração utilizada para a alimentação das larvas de tilápia-donilo durante a fase de reversão sexual.

Nutrientes	(g kg ⁻¹)
Umidade (Máx.)	130,00
Proteína bruta (Min.)	500,00
Extrato etéreo (Min.)	80,00
Fibra bruta (Máx.)	40,00
Matéria mineral (Máx.)	140,00
Cálcio (Min. - Máx.)	15,00 - 35,00
Fósforo (Min.)	6,00
Cobre (Min.)	0,008
Manganês (Min.)	0,0015
Selênio (Min.)	0,00030
Zinco (Min.)	0,080
Ferro (Min.)	0,060

Enriquecimento: vitamina A (Min.) 8.000,00 UI/kg; vitamina D3 (Min.) 2.000,00 UI/kg; vitamina K3 (Min.) 4,00 mg/kg; vitamina B1 (Min.) 10,00 mg/kg; vitamina B2 (Min.) 10,00 mg/kg; vitamina B6 (Min.) 6,00 mg/kg; vitamina B12 (Min.) 20,00 mg/kg; ácido fólico (Min.) 3,00 mg/kg; ácido pantotênico (Min.) 15,00 mg/kg; biotina (Min.) 0,50 mg/kg; colina (Min.) 800,00 mg/kg; niacina (Min.) 31,20 mg/kg. **Composição básica:** farinha de vísceras, farelo de soja 1, farelo de glúten de milho 601, milho integral moído 1, óleo de peixe, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, iodato de cálcio, selenito de sódio, ácido fólico, pantotenato de cálcio, biotina, cloreto de colina, niacina, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, Zootécnico equilibrador da flora intestinal, conservante (propionato de cálcio), aditivo tecnológico antioxidante (BHT (hidróxido de tolueno butilado)).

Eventuais substitutivos: farinha de carne e ossos, farinha de resíduos de abatedouro de aves, farinha de peixe, gordura de frango, óleo de soja, degomado 2, quirera de arroz, monóxido de manganês, iodato de potássio, vitamina A/D3, aditivo tecnológico conservante (sorbato de potássio), aditivo tecnológico antioxidante (ácido cítrico). Contém milho 1 e soja 2 transgênicos e/ou outros ingredientes transgênicos produzidos a partir destes.

A unidade amostral foi composta por lotes de 40 peixes que foram distribuídos em 14 aquários (35 x 28,5 x 13,5 cm) contendo 8 L de água declorada, filtro biológico, aeração constante e temperatura em 28 ± 2 °C por meio de aquecedores acoplados à um termostato. O laboratório permaneceu em fotoperíodo de 12 h.

Cento e doze potes de plástico (6,8 x 5,0 x 5,1 cm) foram colocados nos aquários, na proporção de quatro potes/aquário. Os potes tiveram os fundos removidos e substituídos por tecido organza para possibilitar a entrada de água, como também foram perfurados na lateral. Para que permanecessem flutuando, cada pote foi envolvido por um suporte feito de isopor. Uma ninfa de terceiro ínstar de *B. anurum* foi colocada em cada pote de acordo com o tratamento. Os insetos que morreram na primeira semana, foram substituídos por outros da mesma fase de desenvolvimento.

Nos 28 dias de experimento, os peixes foram alimentados 11 vezes ao dia com ração em pó, a cada uma hora (das 07:00 às 18:00 horas). No horário de 12 h, *B. anurum* foram alimentados com dois peixes (i.e., larvas de tilápia-do-nilo, isentos de hormônio).

Após a última alimentação, os aquários foram sifonados na proporção de 2 L/aquário, os quais foram repostos nas mesmas condições experimentais. Para manter a água nas mesmas condições da água utilizada no experimento, foram mantidas duas caixas de PVC de 100 L contendo água aquecida por aquecedores ligados a termostato na temperatura de 28 ± 2 °C. Uma vez por semana foi trocado toda a água dos aquários.

A temperatura da água dos aquários foi aferida duas vezes ao dia (07:00 e 18:00 horas) por meio de um termômetro comum de álcool (0 a 100 °C), enquanto que o pH, a amônia e o oxigênio dissolvido foram verificados semanalmente utilizando-se os aparelhos: PHMETRO (K39-0014P), Kit labconTest e Medidor de Oxigênio (YSI F-1550^a), respectivamente.

Nos horários de alimentação de *B. anurum*, foi avaliado a ecdise de cada inseto para verificar se houve mudança de ínstar. Para tal, a exúvia visível a olho nu e o tamanho maior do inseto era o sinal de que houve mudança de ínstar.

1.2.5 Desenvolvimento de ínstar - hormônio presente na água e na alimentação

Neste experimento, havia dois tratamentos, *B. anurum* que se alimentavam de peixes tratados (i.e., larvas de tilápias-do-nilo que estavam sendo revertidas com ração com hormônio), e os que se alimentavam de peixes não-tratados (peixes que não receberam ração com hormônio), sendo sete repetições para cada. E todos os peixes presentes nos aquários que estavam em contato indireto com a barata d'água, recebiam ração com hormônio.

A condição experimental neste bioensaio foi a mesma do anterior (duração de ínstar - hormônio presente na alimentação dos peixes), com algumas modificações na alimentação dos insetos. Nos horários de 12:00 h e 17 h, *B. anurum* eram alimentados com dois peixes (larvas de tilápia-do-nilo) de acordo com o tratamento.

Havia duas caixas de PVC de 100 L para manter os peixes que eram utilizados na alimentação dos insetos, uma delas recebia dieta sem hormônio e a outra, dieta com

hormônio.

Nos horários de alimentação dos *B. anurum*, era realizado a avaliação de cada um, afim de verificar se houve mudança de ínstar. Para tal, a exúvia visível a olho nu e o tamanho maior do inseto era o sinal de que houve mudança de ínstar.

1.2.6 Razão sexual das baratas d'água

Insetos que chegaram a fase de adulto oriundos do experimento exposição do hormônio presente na água e na alimentação, foram sexados para avaliar a proporção de machos em relação as fêmeas, a fim de verificar se ocorria alteração na razão sexual em virtude da sua alimentação com peixes tratados e não tratados.

1.2.7 Consumo de peixes pelas baratas d'água

Foi avaliado também, a quantidade diária de peixes consumidos por ninfas (i.e., terceiro ao quinto ínstar) de *B. anurum* provenientes do experimento exposição do hormônio presente na água e na alimentação. A alimentação com larvas foi realizada diariamente às 12 h e às 17 h e foi contabilizado o número de peixes consumidos por inseto.

1.2.8 Sobrevivência

No bioensaio de sobrevivência, ninfas de terceiro ínstar de *B. anurum* foram expostas as concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 3,0; 10 e 30 mg/L de hormônio 17 α -metiltestosterona. As três menores concentrações foram obtidas por Rivero-Wendt et al. (2013) em água que foi utilizada para reversão sexual em tilápias-do-nilo. A unidade amostral constituía de um frasco de vidro com 100 ml da solução com hormônio, nas diferentes concentrações testadas. Cada frasco continha um inseto e foram cobertos com tecido organza. Para cada tratamento foram realizadas 20 repetições e a mortalidade foi avaliada a cada 24 horas por 17 dias. No tratamento controle, os insetos foram expostos à água destilada e álcool. Após estímulos mecânicos, *B. anurum* sem movimentação foram considerados mortos.

1.2.9 Análises estatísticas

Os dados de duração de ínstaes realizada em laboratório foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) e ao teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San José, CA, EUA). Os dados de duração de ínstaes quando os insetos eram exposto ao hormônio (i.e., o hormônio presente na alimentação dos peixes) e também se alimentavam de peixes tratados e não tratados, foram submetidos ao teste t ou Mann-Whitney Rank Sum, quando não foram satisfeitas as premissas de normalidade e homogeneidade. Os dados de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência, utilizando os estimadores de Kaplan-Meier (método Log-rank) e comparadas pelo teste Holm-Sidak com o software SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San Jose, Califórnia, EUA). Os dados de consumo diário foram submetidos a análises de variância com medidas repetidas no tempo para determinar os efeitos do hormônio, do sexo e do tempo. Os fatores estudados foram hormônio e sexo, e peixes consumidos diariamente (SAS 3 Institute, 2008). Todos os gráficos foram feitos no software SigmaPlot 12.5.

1.3 Resultados

O tempo de desenvolvimento dos insetos criados em condições laboratoriais foi maior para as ninfas no quarto e quinto ínstar ($P < 0,001$) (Figura 1.2) e a duração média deste ciclo foi $85,11 \pm 3$ dias. Quando comparou-se a média total do ciclo de vida destes insetos com aqueles que consumiram peixes sem ração com hormônio (i.e, oriundos do experimento hormônio presente na alimentação dos peixes), está média cai para $56 \pm 1,3$ dias.

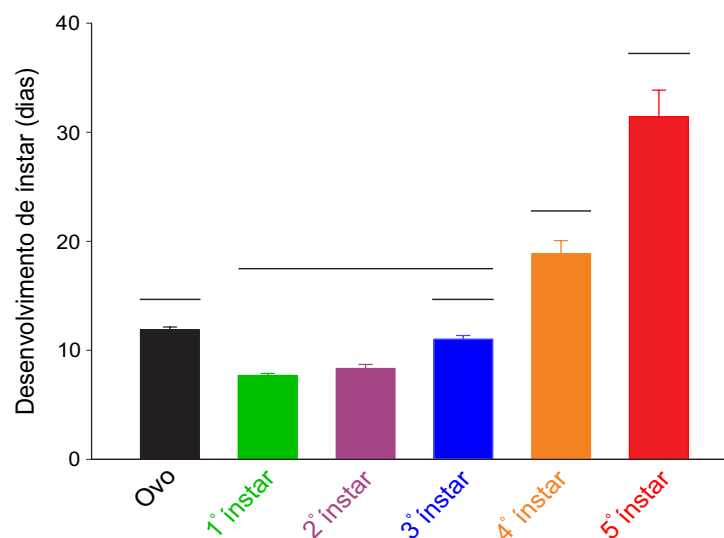


Figura 1.2: Duração em dias das fases de desenvolvimento de *B. anurum* em condições laboratoriais. A duração média do ciclo de vida foi $85,11 \pm 3$ dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Quando comparou-se a duração de desenvolvimento entre o mesmo ínstar, de tratamento diferentes (presença ou ausência de hormônio presente na alimentação dos peixes), os resultados foram semelhantes para todos os estágios: terceiro ($T = 785$; $P = 0,832$), quarto ($T = 752$; $P = 0,429$) e quinto ($T = 767$; $P = 0,597$) ínstar (Figura 1.3).

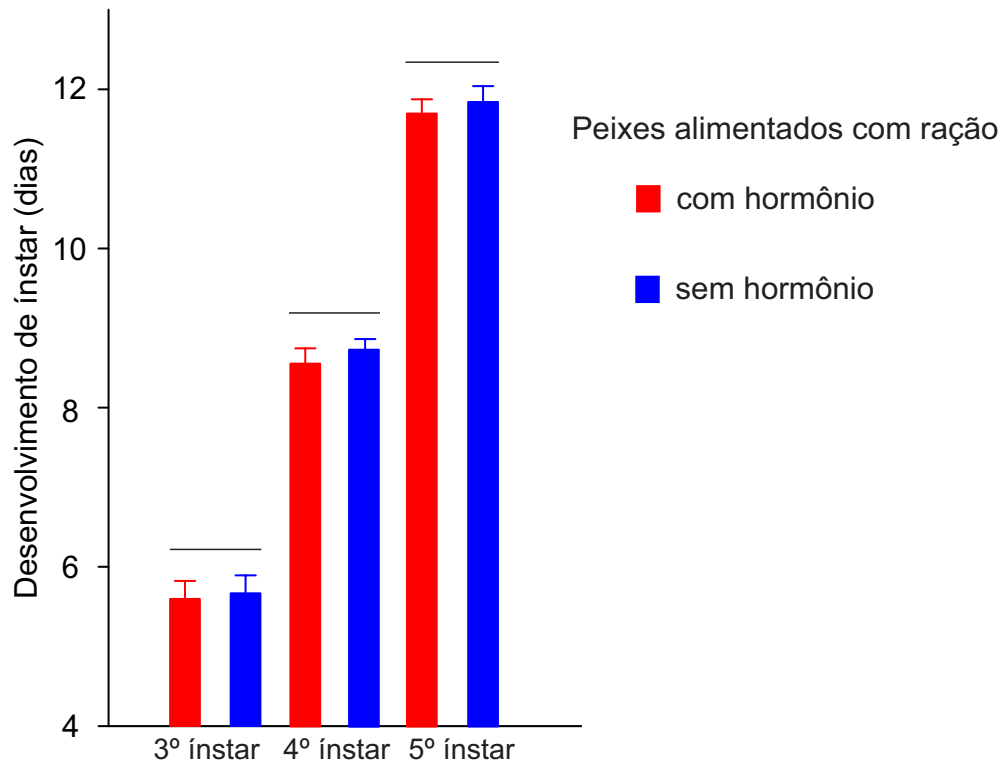


Figura 1.3: Duração em dias das fases de desenvolvimento de *B. anurum* que foram expostos ou não ao hormônio presente na alimentação dos peixes. A duração média do ciclo de vida dos insetos alimentados com peixes, que não estavam em aquários que receberam ração com hormônio foi $56 \pm 1,3$ dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney rank.

Baratas d'água do quinto ínstar que estavam em aquários com hormônio presente na alimentação dos peixes e que se alimentaram com peixes tratados, anteciparam sua mudança de ínstar em relação ao quinto ínstar que alimentou-se de peixes não-tratados ($T = 404$; $P < 0,001$). Enquanto que para o terceiro ($T = 823,5$; $P = 0,676$) e quarto ($T = 678,5$; $P = 0,494$) ínstar não diferiram (Figura 1.4).

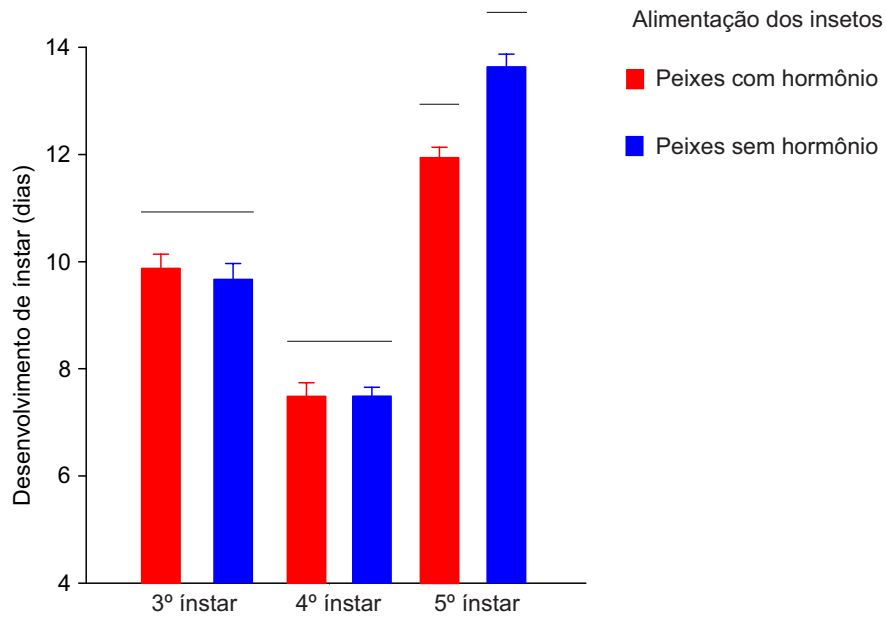


Figura 1.4: Duração em dias das fases de desenvolvimento de *B. anurum* expostos ao hormônio presente na alimentação dos peixes e que consumiram peixes tratados e não-tratados. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney rank.

Quando comparado os tratamentos por sexo dentro de cada instar, machos ($T = 289$; $P = < 0,001$) e fêmeas ($T = 72$; $P = 0,002$) do quinto instar que consumiram peixes tratados obtiveram menor tempo de desenvolvimento (Figura 1.5 C) em relação ao tratamento dos insetos que se alimentaram de peixes não tratados. Enquanto que para o terceiro (machos: $t = 0,78$; $P = 0,44$; fêmeas: $t = 0,28$; $P = 0,781$) e quarto instar (machos: $T = 236$; $P = 0,218$; fêmeas: $T = 129,5$; $P = 0,800$) não houve diferença para os sexos (Figura 1.5 A e B).

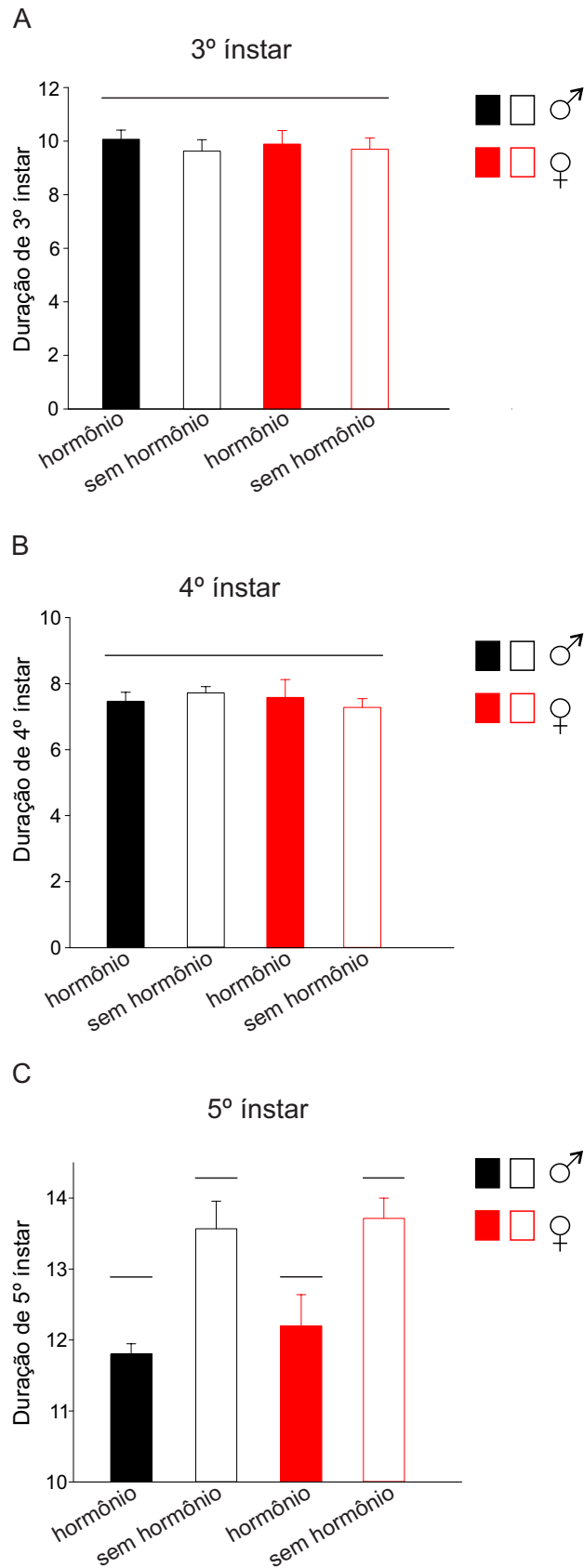


Figura 1.5: Duração das fases de desenvolvimento de *B. anurum* expostos ao hormônio presente na alimentação dos peixes e que consumiram peixes tratados e peixes não-tratados. **A.** Machos e fêmeas do 3° instar, **B.** Machos e fêmeas do 4° instar e **C.** Machos e fêmeas do 5° instar. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste t (3° instar) e teste Mann-Whitney rank (4° e 5° instar).

Ao chegar a fase final de desenvolvimento (adulto), a proporção de machos de *B. anurum* que consumiram peixes tratados foi semelhante para os que receberam peixes não-tratados ($t = 1,2$; $P = 0,243$) (Figura 1.6).

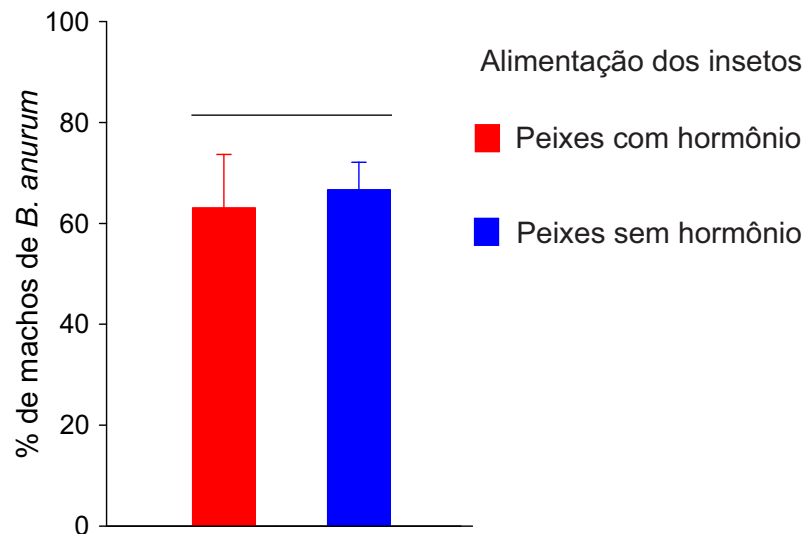


Figura 1.6: Porcentagem de machos de *B. anurum* que consumiram peixes tratados e não-tratados. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste t.

A análise de variância com medidas repetidas no tempo mostrou que não houve efeito do hormônio na alimentação das ninfas de terceiro ($F_{(1,49)} = 0,99$; $P = 0,325$) e quarto ínstar ($F_{(1,49)} = 0,30$; $P = 0,584$) nem da interação hormônio e sexo: $F_{(1,49)} = 0,12$; $P = 0,73$ e $F_{(1,49)} = 0,20$; $P = 0,656$, respectivamente. Desta forma, os tratamentos foram agrupados pelo sexo (Tabela 1.2 e 1.3). As fêmeas do terceiro ínstar se alimentaram mais do que os machos ($F_{(1,49)} = 5,49$; $P = 0,023$) ao longo do tempo ($F_{(40,10)} = 14,41$; $P < 0,0001$) (Figura 1.7), este mesmo resultado se repetiu para o quarto ínstar ($F_{(1,49)} = 13,33$; $P = 0,0006$) (Figura 1.8). A análise de variância com medidas repetidas no tempo mostrou efeito da interação entre tempo e hormônio na alimentação do quinto ínstar ($F_{(43,7)} = 0,68$; $P = 0,0134$) e tempo e sexo ($F_{(43,7)} = 0,72$; $P = 0,0403$), no consumo diário dos *B. anurum* (Tabela 1.4). Machos e fêmeas que se alimentaram de peixes não-tratados, diminuíram a sua alimentação ao longo do tempo, entretanto, as fêmeas ainda continuaram a se alimentar mais como nos ínstars anteriores. Já os machos que consumiram peixes tratados aumentaram sua alimentação ao longo do tempo e estabilizou-se em relação as fêmeas do mesmo tratamento, estas que por sua vez, diminuíram o consumo e posteriormente houve aumento da sua alimentação (Figura 1.9).

Tabela 1.2: Análise de variância com medida repetida no tempo para o número de larvas de tilápia-do-nilo predadas por ninfas de 3º ínstar de *B. anurum* durante esta fase de desenvolvimento.

Fontes de variação	gl	F	P		
Entre fatores					
Hormônio (H)	1	0,99	0,325		
Sexo (S)	1	5,49	0,023*		
H x S	1	0,12	0,73		
Erro	49	-	-		
	gl _{den}	gl _{num}	Wilks'lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	40	10	0,217	14,41	< 0,0001*
T x H	40	10	0,931	0,29	0,9785
T x S	40	10	0,853	0,69	0,7280
T x H x S	40	10	0,723	1,53	0,1631

Tabela 1.3: Análise de variância com medida repetida no tempo para o número de larvas de tilápia-do-nilo predadas por ninfas de 4º ínstar de *B. anurum* durante esta fase de desenvolvimento.

Fontes de variação	gl	F	P		
Entre fatores					
Hormônio (H)	1	0,30	0,5840		
Sexo (S)	1	13,33	0,0006*		
H x S	1	0,20	0,6562		
Erro	49	-	-		
	gl _{den}	gl _{num}	Wilks'lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	43	7	0,836	1,20	0,3220
T x H	43	7	0,647	3,35	0,0062
T x S	43	7	0,937	0,41	0,8901
T x H x S	43	7	0,850	1,09	0,3884

Tabela 1.4: Análise de variância com medida repetida no tempo para o número de larvas de tilápia-do-nilo predadas por ninfas de 5º ínstar de *B. anurum* durante esta fase de desenvolvimento.

Fontes de variação	gl	F	P		
Entre fatores					
Hormônio (H)	1	0,34	0,5616		
Sexo (S)	1	0,61	0,4403		
H x S	1	2,19	0,1451		
Erro	49	-	-		
	gl _{den}	gl _{num}	Wilks'lambda	F	P
Dentro de cada fator					
Tempo (T)	43	7	0,928	0,47	0,8483
T x H	43	7	0,677	2,93	0,0134*
T x S	43	7	0,724	2,35	0,0403*
T x H x S	43	7	0,823	1,32	0,2629

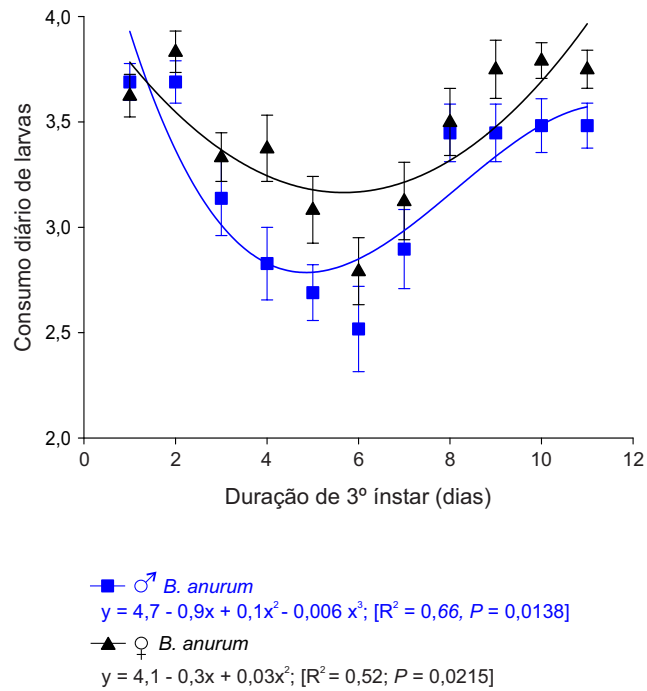


Figura 1.7: Consumo diário de larvas de tilápia-do-nilo por machos e fêmeas de *B. anurum*, durante sua fase de desenvolvimento de 3º ínstar. As fêmeas foram representadas por uma regressão polinomial quadrática, enquanto os machos pela regressão polinomial cúbica.

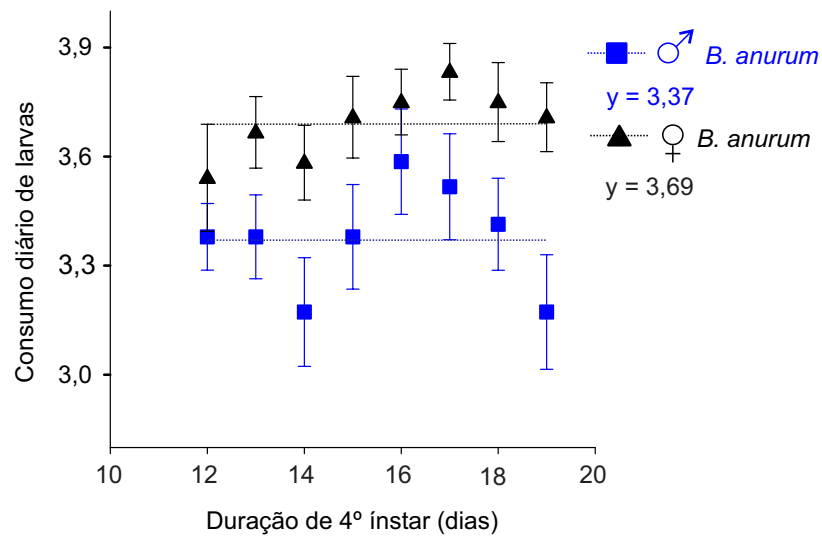


Figura 1.8: Consumo diário de larvas de tilápia-do-nilo por machos e fêmeas de *B. anurum*, durante sua fase de desenvolvimento de 4º ínstar. Fêmeas e machos foram representados por uma reta que tangencia os valores médios.

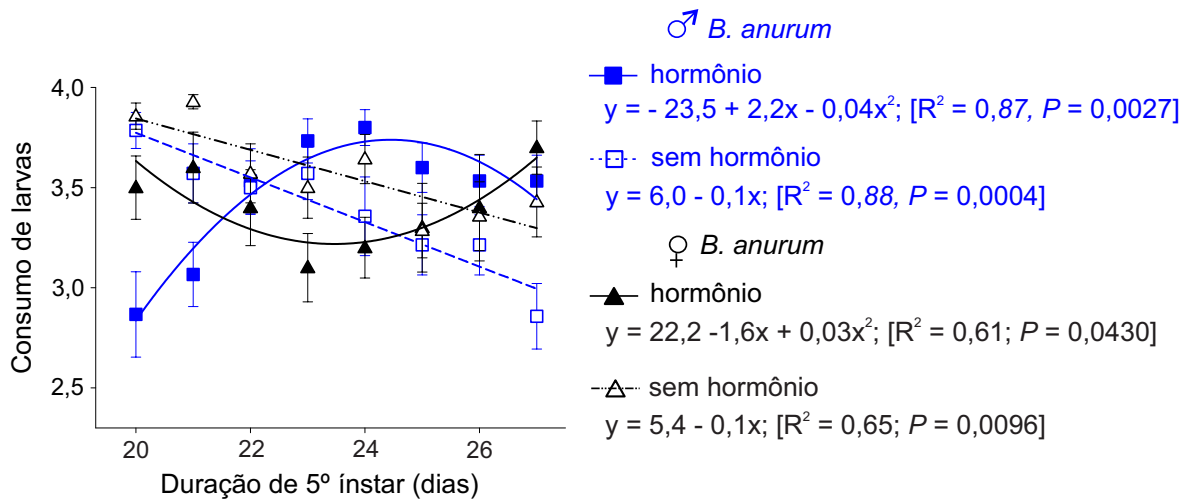


Figura 1.9: Consumo diário de larvas de tilápia-do-nylo (tratadas e não-tratadas) por machos e fêmeas de *B. anurum*, durante sua fase de desenvolvimento de 5º ínstar. Fêmeas e os machos do tratamento com peixes não tratados, foram representados por uma regressão polinomial linear, enquanto as fêmeas e os machos do tratamento com peixes tratados, são representados pela regressão polinomial quadrática.

Observou-se que nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L do hormônio 17 α -metiltestosterona houve aumento no tempo de sobrevivência em relação ao controle (Log-Rank: $\chi^2 = 173,192$; g.l. = 6, $P < 0,001$). Em apenas 24 horas, as maiores concentrações do hormônio (10 e 30 mg/L) foram letais para os insetos em relação a todos os outros tratamentos (Figura 1.10). As concentrações da TL₅₀ (tempo médio letal de sobrevivência) apresentaram regressão não-linear Lorentzian, com o pico de sobrevivência afetado nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/L de hormônio (Figura 1.11).

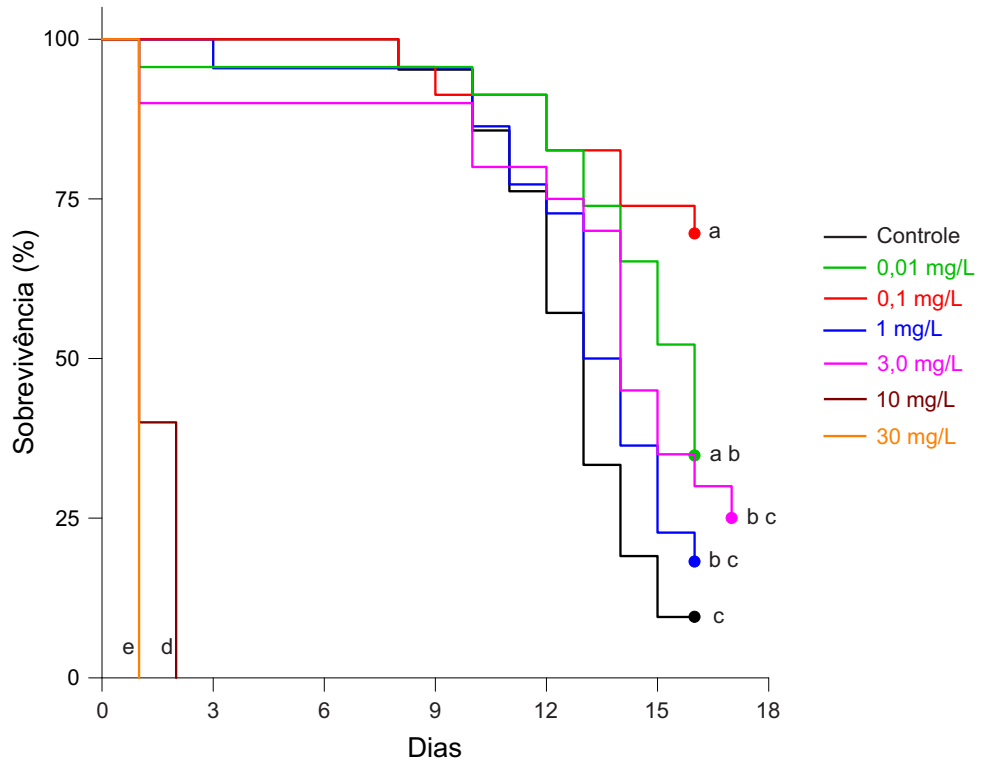


Figura 1.10: Curvas de sobrevivência de *B. anurum* expostos a diferentes concentrações do hormônio 17 α -metiltestosterona e controle com os tempos médios (\pm EP). Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Holm-Sidak.

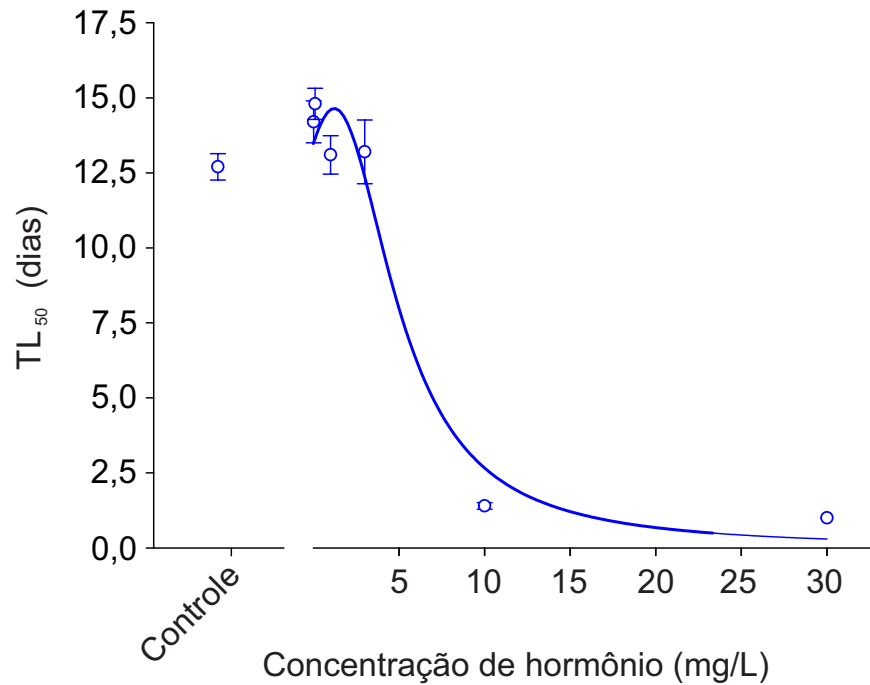


Figura 1.11: Tempo médio letal de sobrevivência (TL₅₀) dos *B. anurum* expostos a diferentes concentrações do hormônio 17 α -metiltestosterona.

1.4 Discussão

O ciclo de vida dos *B. anurum* é direto (hemimetábolo) sendo constituído pelas fases de ovo, cinco fases ninfais e adultos. Sob condições laboratoriais, a duração média do ciclo foi $85,11 \pm 3$ dias. Há estudos que mostraram médias diferentes do ciclo de vida para outras espécies da mesma família (Smith 1974; Tawfik et al. 1978; McPherson and Packauskas 1986 e Tara and Kour 2014). Conseqüentemente, essa longa duração ocorreu devido a alimentação destes insetos, que não eram tão nutritiva como aqueles que se alimentaram de peixes (i.e., vertebrados tem maior valor nutricional do que invertebrados). Apesar de se alimentarem de uma variedade de animais aquáticos (e.g., peixes, girinos, caracóis e insetos) (Tara and Kour 2014), as ninfas do primeiro ao terceiro ínstar, ainda são pequenas, desta forma, consomem presas menores.

Por possuírem um ciclo de vida longo, estes insetos podem estar expostos á xenobióticos, principalmente na fase imatura. Embora, os resultados obtidos apontam que a duração de ínstar de *B. anurum* quando expostos a água contendo ração com hormônio não é afeta as fases ninfais em relação ao controle. O consumo por presas maiores favoreceu a mudança antecipada de ínstar e não o hormônio presente na água.

Os insetos (i.e., no quinto ínstar) alimentados com peixes tratados e na presença de água com hormônio anteciparam sua mudança de ínstar para adulto. O que pode ter ocasionado esse rápido tempo de desenvolvimento é devido aos peixes que se alimentaram com hormônio serem maiores em relação aos outros (i.e., controle) (Barbosa et al. 2013; Mateen et al. 2015), sendo assim, numa situação de campo, esses predadores podem preferir presas maiores e mais nutritivas (presa maior sacia mais a alimentação). Além do mais, durante a muda, vários fatores hormonais estão envolvidos nesta etapa, como também o estiramento do corpo, ocasionado pelo peso e tamanho do inseto (Simpson and Chapman 2013), que neste caso foi antecipado devido a alimentação com peixes tratados.

O hormônio indiretamente (via alimentação) também não afetou a razão sexual destes insetos. Mas há estudos em que foram relatados efeitos deste hormônio na fisiologia reprodutiva (massa de ovos e espermatozoides) de outro invertebrado, tal como o caracol *Biomphalaria glabrata* (Rivero-Wendt et al. 2014).

Durante o experimento, foi verificado que fêmeas (i.e., do terceiro e quarto ínstar)

consumiram mais peixes, isto sugere que elas precisam de mais energia para produzir ovos. Já os machos e as fêmeas que receberam peixes não tratados diminuíram seu consumo, pois as presas eram menores e menos atrativas para a ingestão. Já os machos que comeram peixes tratados aumentaram seu consumo, pois além das presas serem maiores, eles repõem a energia para produção de espermatozoides e consequentemente por ficarem mais tempo sem se alimentar quando estão carregando os ovos (Papeschi and Bressa 2006), uma característica da família Belostomatidae. E as fêmeas diminuíram ao longo do tempo o seu consumo, pois elas compensam a energia de que precisam nos primeiros momentos de vida para produção de ovos e retornam consumindo mais para que ocorra definitivamente a muda para adulto.

Com bases nos resultados, em baixas concentrações do hormônio 17 α -metiltestosterona ocorreu um aumento da sobrevivência dos *B. anurum*. O hormônio beneficiou o inseto, ele pode ter fornecido energia, ou seja, micronutrientes, que auxiliou na sobrevivência. Enquanto que as duas maiores concentrações foram letais, devido ao excesso de micronutrientes prejudicar a sobrevivência. O processo pelo qual ocorre um tipo específico de curva dose-resposta, onde baixas concentrações de um xenobiótico induz efeito positivo, ocorrido em função de um desequilíbrio no estado homeostático do organismo, enquanto que altas concentrações resulta em efeito negativo é conhecido como hormese (Cook and Calabrese 2007; Mattson 2008; Murado and Vázquez 2010). Já em outros trabalhos, invertebrados também obtiveram respostas benéficas, como no caracol *B. glabrata* (Rivero-Wendt et al. 2014), já mencionado e os que tiveram efeitos morfológicos prejudicados, como em lagostas (Vogt 2007) e o vertebrado, peixe-zebra (Rivero-Wendt et al. 2016). Desta forma, neste estudo, evidencia que o hormônio pode afetar o ecossistema aquático e consequentemente, levar ao desequilíbrio ecológico, ou seja, maior tempo de vida dos insetos gera maior consumo de peixes e menor produtividade para o piscicultor.

De forma geral, o hormônio não afetou negativamente os *B. anurum*, fato que pode ser explicado pela degradação do produto sob as condições em que o experimento foi conduzido. Segundo Rivero-Wendt et al. (2014), em seus experimentos, dentro de uma semana o hormônio havia sido completamente degradado. Neste trabalho, os aquários eram sifonados todos os dias e uma vez por semana a água também era trocada, com o objetivo de diminuir a quantidade de amônia presente na água e as

sobras de ração. Além do mais, é importante notar as diferenças de alimentação entre os organismos submetidos ao experimento, por exemplo, caracóis como *B. glabrata* têm capacidade de filtro de redução das cargas de nutrientes (Sabatini et al. 2011), enquanto *B. anurum* são predadores (Armúa De Reyes and Estévez 2006). Isto implica que o hormônio chega até o organismo do inseto indiretamente.

Mesmo diante destes resultados, é de suma importância estudar melhor o composto e seu modo de ação em organismos não-alvo, pois águas residuais de piscicultura são descarregadas em ecossistemas, e a presença do hormônio 17 α -metiltestosterona pode comprometer a reprodução de outras espécies benéficas.

1.5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

1.6 Referências

- Abo-Al-Ela, H. G., A. F. El-Nahas, S. Mahmoud, and E. M. Ibrahim (2017). The extent to which immunity, apoptosis and detoxification gene expression interact with 17 α -methyltestosterone. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 289–298.
- Armúa De Reyes, C. and A. L. Estévez (2006). Predation on *Biomphalaria* sp. (Mollusca: Planorbidae) by three species of the genus *Belostoma* (Heteroptera: Belostomatidae). *Brazilian Journal of Biology* 66(4), 1033–1035.
- Barbosa, I. R., S. Lopes, R. Oliveira, I. Domingues, A. M. V. M. Soares, and A. J. A. Nogueira (2013). Determination of 17 α -methyltestosterone in freshwater samples of tilapia farming by high performance liquid chromatography. *American Journal of Analytical Chemistry* 4(4), 207.
- Calabrese, E. J. and R. Blain (2005). The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicology and applied pharmacology* 202(3), 289–301.
- Chakraborty, S. B., S. Banerjee, and S. Chatterjee (2011). Increased androgen receptor expression in muscle tissue contributing to growth increase in androgen-treated Nile tilapia. *Aquaculture International* 19(6), 1119–1137.

- Consoli, R. A., M. H. Pereira, A. L. Melo, and L. H. Pereira (1989). *Belostoma micantulum* stal, 1858 (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of larvae and pupae of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(4), 577–578.
- Contardo-Jara, V., S. Pflugmacher, G. Nutzmann, W. Kloas, and C. Wiegand (2010). The β -receptor blocker metoprolol alters detoxification processes in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental pollution* 158(6), 2059–2066.
- Cook, R. and E. J. Calabrese (2007). The importance of hormesis to public health. *Ciência & Saúde Coletiva* 12(4), 955–963.
- Dias-Neto, J., G. M. R. Valladão, P. H. de Oliveira Viadanna, and F. Pilarski (2016). Three strategic feeding during hatching of nile tilapia: effects on organs integrity, parasitism and performance parameters. *International Aquatic Research* 8(1), 37–48.
- Gall, H. E., S. A. Sassman, L. S. Lee, and C. T. Jafvert (2011). Hormone discharges from a midwest tile-drained agroecosystem receiving animal wastes. *Environmental science & technology* 45(20), 8755–8764.
- Garcia, F., D. M. Romera, K. S. Gozi, E. M. Onaka, F. S. Fonseca, S. H. C. Schalch, P. G. Candeira, L. O. M. Guerra, F. J. Carmo, and D. J. Carneiro (2013). Stocking density of nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture* 410, 51–56.
- Gutiérrez, Y., H. P. Santos, J. E. Serrão, and E. E. Oliveira (2016). Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiatus*. *PloS one* 11(3), e0152383.
- Haddad, V., E. F. Schwartz, C. A. Schwartz, and L. N. Carvalho (2010). Bites caused by giant water bugs belonging to Belostomatidae family (Hemiptera, Heteroptera) in humans: A report of seven cases. *Wilderness & environmental medicine* 21(2), 130–133.
- Halstead, N. T., D. J. Civitello, and J. R. Rohr (2015). Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. *Chemosphere* 135, 265–271.
- Halstead, N. T., T. A. McMahon, S. A. Johnson, T. R. Raffel, J. M. Romansic, P. W. Crumrine, and J. R. Rohr (2014). Community ecology theory predicts the effects of agrochemical mixtures on aquatic biodiversity and ecosystem properties. *Ecology letters* 17(8), 932–941.
- Herrich-Schaeffer, G. A. W. (1848). Die wanzenartigen insecten. *Nuremberg: Lotzbeck, J.R.* 8, 28.
- Kweka, E. J., G. Zhou, T. M. Gilbreath, Y. Afrane, M. Nyindo, A. K. Githeko, and G. Yan (2011). Predation efficiency of *Anopheles gambiae* larvae by aquatic predators in western Kenya highlands. *Parasites & vectors* 4(1), 128.

- Linnaeus, C. (1762). *Oeconomia naturae. Miscellaneous Tracts relating to Natural History, Husbandry and Physick*, edited by: Stillingfleet, B., 2nd Edn., London, 37–129.
- Mateen, A., I. Ahmed, et al. (2015). Androgen sex reversal, subsequent growth and meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pak. J. Agri. Sci* 52(1), 199–202.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing research reviews* 7(1), 1–7.
- McPherson, J. and R. Packauskas (1986). Life history and laboratory rearing of *Belostoma lutarium* (Heteroptera: Belostomatidae) with descriptions of immature stages. *Journal of the New York Entomological Society*, 154–162.
- Megbowon, I. and T. O. Mojekwu (2014). Tilapia sex reversal using methyl testosterone (MT) and its effect on fish, man and environment. *Biotechnology* 13(5), 213–216.
- Murado, M. A. and J. A. Vázquez (2010). Biphasic toxicodynamic features of some antimicrobial agents on microbial growth: a dynamic mathematical model and its implications on hormesis. *BMC microbiology* 10(1), 220.
- Norum, U., N. Friberg, M. R. Jensen, J. M. Pedersen, and P. Bjerregaard (2010). Behavioural changes in three species of freshwater macroinvertebrates exposed to the pyrethroid lambda-cyhalothrin: Laboratory and stream microcosm studies. *Aquatic Toxicology-Amsterdam* 98(4), 328–335.
- Papeschi, A. G. and M. J. Bressa (2006). Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *Journal of Biological Research* 5, 3–21.
- Pereira, M., R. Silva, A. Azevedo, A. Melo, and L. Pereira (1993). Predation of *Biomphalaria glabrata* during the development of *Belostoma anurum* (Hemiptera, Belostomatidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 35(5), 405–409.
- Relyea, R. and J. Hoverman (2006). Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecology Letters* 9(10), 1157–1171.
- Relyea, R. A. (2004). Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(7), 1737–1742.
- Rivero-Wendt, C., A. Borges, E. Oliveira-Filho, A. Miranda-Vilela, M. Ferreira, and C. Grisolia (2014). Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Genet Mol Res* 13, 605–615.
- Rivero-Wendt, C. L., A. L. Miranda-Vilela, M. F. Ferreira, A. M. Borges, and C. K. Grisolia (2013). Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Genet Mol Res* 12(3), 3862–3870.
- Rivero-Wendt, C. L. G., R. Oliveira, M. S. Monteiro, I. Domingues, A. M. V. M. Soares, and C. K. Grisolia (2016). Steroid androgen 17 α -methyltestosterone induces malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos. *Environmental toxicology and pharmacology* 44, 107–113.

- Sabatini, S. E., I. Rocchetta, C. M. Luquet, M. I. Guido, and M. d. C. R. De Molina (2011). Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *diplodon chilensis*. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters* 41(4), 356–362.
- Shaalán, E. A.-S. and D. V. Canyon (2009). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical biomedicine* 26, 223–261.
- Simpson, S. J. and R. F. Chapman (2013). *The insects: structure and function*. Cambridge University Press.
- Smith, R. L. (1974). Life history of *Abedus herberti* in central Arizona (Hemiptera: Belostomatidae). *Psyche* 81(2), 272–283.
- Tara, J. and R. Kour (2014). Biology and morphometric studies of aquatic bug, *Sphaerodema molestrum* (Hemiptera: Belostomatidae) from Jammu (J&K, India). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2(3), 82–85.
- Tawfik, M., S. El-Sherif, and A. Lutfallah (1978). On the life-history of the giant water-bug *Limnogeton fieberi* Mayr (Hemiptera: Belostomatidae), predatory on some harmful snails. *Journal of Applied Entomology* 86(1-4), 138–145.
- Toledo, L. F. (2003). Predation on seven South American anuran species by water bugs (Belostomatidae). *Phyllomedusa* 2(2), 105–108.
- Vogt, G. (2007). Exposure of the eggs to 17 α -methyltestosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. *Aquatic toxicology* 85(4), 291–296.

Efeito do predador *Belostoma anurum* no desenvolvimento das larvas de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*

Efeito do predador *Belostoma anurum* no desenvolvimento das larvas de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*

Resumo

As presas podem alterar seu comportamento quando se sentem ameaçadas por seus predadores, por meio de estratégias defensivas que geram custos para seu organismo, ou seja, na sobrevivência, crescimento ou fecundidade. Desta forma, *Belostoma anurum* (baratas d'água), pertencente a família Belostomatidae, são conhecidos por serem predadores generalistas que coexistem com suas presas, como por exemplo, as larvas de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, mas não se sabe como o risco de predação por estes insetos podem afetar os peixes. Por estas razões, o crescimento produtivo (i.e., ganho de peso e de comprimento), resposta ao estresse e a fisiologia oxidativa da tilápia-do-nilo, foram averiguados durante a fase de reversão sexual, sob condições laboratoriais. Durante a fase de reversão sexual, larvas de tilápia-do-nilo presentes em aquários, foram expostas indiretamente ao predador. Nos tratamentos que havia a presença de hormônio na alimentação, os peixes obtiveram maior ganho de peso e comprimento, independente de ter ou não a presença do inseto no aquário. Todavia, o predador foi um agente estressor para suas presas, havendo aumento da concentração de glicose, lactato e da atividade da SOD (superóxido dismutase) dos peixes quando na presença da barata d'água. Esses resultados sugerem uma hipótese para explicar que o predador *B. anurum* impacta a fisiologia das tilápias-do-nilo, quando estas estão condicionadas à resposta de luta ou fuga.

Palavras-chave: 17 α -metiltestosterona, SOD, Resposta ao estresse

Abstract

Preys can change their behavior when they feel threatened by their predators, through defensive strategies that generates costs for their organism, that is, in survival, growth or fecundity. Thus, *Belostoma anurum* (water bug), belonging to the Belostomatidae family, are known to be generalist predators coexisting with their prey, such as the larvae Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, but it is not known how the risk of predation by these insects can affect fishes. For these reasons, the productive growth (i.e., weight

and length gain), stress response and the oxidative physiology of Nile tilapia, were investigated during the phase of sexual reversion, under laboratory conditions. During the sexual reversal phase, Nile tilapia larvae present in aquariums, were exposed indirectly to the predator. In the treatments that had the presence of hormone in the food, the fishes obtained greater gain of weight and length, regardless of whether or not the insect is present in the aquarium. However, the predator was a physiological stressor for its prey, which led to an increase in the fishes glucose, lactate, and in its activity of SOD (superoxide dismutase) when in the presence of the water bug. These results suggest a hypothesis to explain that the predator *B. anurum* impacts on the physiological development of Nile tilapia, when these are conditioned to the fight or flight response.

Key words: 17 α -methyltestosterone, SOD, Stress response

2.1 Introdução

Estratégias de defesa realizadas pelas presas, resultam em comportamentos anti-predatórios, como ficar em sinal de alerta, evitar ficar próximo do predador e posteriormente ocorre a fuga (Apfelbach et al. 2005; Martin et al. 2010). Estas respostas podem alterar o comportamento e a fisiologia do animal, gerando custos significativos que diminuem sua sobrevivência, crescimento e fecundidade (Werner and Peacor 2003; Benard 2004; Preisser and Bolnick 2008; Berg and Ellers 2010; Zanette et al. 2014). Entretanto, existem poucos estudos que demonstraram ganho de crescimento produtivo em resposta ao risco de predação (Dmitriew 2011).

No meio aquático há uma diversidade de seres vivos que interagem entre si. Entre eles encontram-se as baratas d'água, *Belostoma anurum* (Herrich-Schaeffer 1848) (Hemiptera: Belostomatidae), que são predadoras de pequenos peixes, girinos, caracóis e algumas larvas de insetos vetores de doenças (Shaalán and Canyon 2009; Haddad et al. 2010; Kweka et al. 2011). Estes insetos são encontrados em riachos, lagoas e tanques de piscicultura associados a vegetação, onde coexistem com suas presas, possuindo um papel de predador importante na fauna aquática (Haddad et al. 2010; Tara and Kour 2014).

Uma das potenciais presas para os *B. anurum*, são as tilápias-do-nilo, *Oreochromis*

niloticus (Linnaeus, 1757) (Perciformes: Cichlidae), por serem amplamente cultivadas em tanques de piscicultura e ocupando a segunda posição no ranking de peixes mais produzidos no mundo (FAO 2016). Em virtude deste cultivo, piscicultores em geral, utilizam de técnicas para reversão sexual com a finalidade de aumentar a sua produção (Chakraborty et al. 2011; Rivero-Wendt et al. 2014). Por meio de uso do hormônio 17 α -metiltestosterona incorporado a dieta artificial, há à obtenção de populações de peixes com maior taxa de crescimento (El-Sayed 2006; Rivero-Wendt et al. 2013; Golan and Levavi-Sivan 2014; Dias-Neto et al. 2016). Essa técnica possibilita gerar peixes machos que ao atingirem a idade adulta, são maiores, por possuírem metabolismo mais acelerado do que as fêmeas (Honorato 2012; Barbosa et al. 2013; Mateen et al. 2015), estas por sua vez, tem crescimento de até cinco vezes menos (Balarin and Haller 1982). Devido ao fato, delas consumirem parte das reservas para a reprodução, pois nesta fase, a incubação dos ovos e larvas é na boca, desta forma, não se alimentam (Popma and Lovshin 1996). Por um período de 28 dias, o hormônio reverte 97 a 100% de larvas de tilápia-do-nilo em machos (Popma and Green 1990; Chakraborty et al. 2011; Beaven and Muposhi 2012).

A mera ameaça de predação pode ser suficiente para reduzir a sobrevivência, crescimento ou maturidade sexual das tilápias-do-nilo (Preisser and Bolnick 2008) e ocasionar estresses (Hawlena and Schmitz 2010b) durante a fase de reversão sexual. Desta forma, a presença do inseto pode interferir na resposta ao estresse, no crescimento produtivo e no estresse oxidativo, comprometendo o bem-estar dos peixes (e.g., os peixes ficam susceptíveis a doenças) (Lushchak 2011).

Quando os organismos estão sob condições de estresse em geral, os efeitos a nível subcelular são os primeiros a causar a interrupção de vias metabólicas normais (Ansaldo et al. 2006), devido a produção de radicais livres, chamados de EROS (espécies reativas de oxigênio). O excesso destes radicais livres no organismo é combatido por enzimas antioxidantes produzidas pelo corpo ou absorvidos da dieta. Se ocorre o desbalanço entre eles (i.e., radicais livres e as enzimas antioxidantes) (Lushchak et al. 2008; Monaghan et al. 2009; Lushchak (2011); Nishida 2011), os radicais livres podem causar danos ao DNA, oxidação de proteínas e produzir a peroxidação lipídica, resultando no estresse oxidativo no organismo (Livingstone 2003).

Mediante a isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a presença do predador *B.*

anurum impacta o desenvolvimento e a fisiologia oxidativa da tilápia-do-nilo, durante sua fase de reversão sexual sob condições laboratoriais.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 *Ética experimental*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais de produção da Universidade Federal de Viçosa (Ceup-UFV), Brasil, protocolo nº 40/2016, de acordo com as diretrizes internacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório (Anexo I).

2.2.2 *Obtenção e criação dos insetos*

Insetos adultos de *B. anurum* foram coletados em tanques do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal (DBA) utilizando rede entomológica (D-net). Posteriormente, foram levados para o Laboratório de Fisiologia e Neurobiologia de Insetos do Departamento de Entomologia (DDE), ambos da Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, MG, Brasil, 20°45' S, 42°52' W).

No laboratório, os insetos adultos foram mantidos em aquário (30 x 40 x 60 cm) com água proveniente dos tanques de piscicultura em temperatura de 28 ± 2 °C até a postura dos ovos. Após a postura, machos contendo os ovos no dorso, foram transferidos individualmente para pote de plástico (10,9 x 9,2 x 7,5 cm) onde permaneceram até a eclosão dos ovos. As ninfas do primeiro ínstar foram individualizadas em vidros (5,0 x 2,6 x 2,0 cm) para evitar o canibalismo e alimentadas diariamente com uma larva de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) (Diptera: Culicidae), até atingirem o terceiro ínstar que foram utilizadas nos experimentos.

2.2.3 *Obtenção dos peixes*

Larvas de tilápias-do-nilo com quatro dias de idade foram coletadas dos tanques de piscicultura do Setor de Piscicultura do Departamento de Biologia Animal da UFV. Posteriormente, eles foram transferidos para aquários de 100 L no Laboratório de

Comportamento e Nutrição de Peixes, contendo água declorada, aeração constante e temperatura de 28 °C, para aclimação.

2.2.4 Primeiro bioensaio: crescimento produtivo

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas dietas experimentais (dietas com presença ou ausência de hormônio 17 α -metiltestosterona) na presença e ausência do *B. anurum*, com sete repetições cada.

Para a confecção das dietas experimentais, foi utilizado ração comercial em pó (50% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo, 4% de fibra bruta e 14% de matéria mineral) (Tabela 2.1). Desta ração, uma parte foi destinada para compor a dieta controle (sem a presença do hormônio) e a outra metade foi misturado ao hormônio 17 α -metiltestosterona (Syntex S. A.), na proporção de 60 mg kg⁻¹ de ração. O hormônio foi previamente diluído em 0,5 L de álcool 46° INPM para 1 kg de ração. Depois de realizada a mistura, esta ração foi espalhada sobre papel pardo e seco à sombra em temperatura ambiente por 24 horas.

Tabela 2.1: Níveis de garantia da ração utilizada para a alimentação das larvas de tilápia-do-nylo durante a fase de reversão sexual.

Nutrientes	(g kg ⁻¹)
Umidade (Máx.)	130,00
Proteína bruta (Min.)	500,00
Extrato etéreo (Min.)	80,00
Fibra bruta (Máx.)	40,00
Matéria mineral (Máx.)	140,00
Cálcio (Min. - Máx.)	15,00 - 35,00
Fósforo (Min.)	6,00
Cobre (Min.)	0,008
Manganês (Min.)	0,0015
Selênio (Min.)	0,00030
Zinco (Min.)	0,080
Ferro (Min.)	0,060

Enriquecimento: vitamina A (Min.) 8.000,00 UI/kg; vitamina D3 (Min.) 2.000,00 UI/kg; vitamina K3 (Min.) 4,00 mg/kg; vitamina B1 (Min.) 10,00 mg/kg; vitamina B2 (Min.) 10,00 mg/kg; vitamina B6 (Min.) 6,00 mg/kg; vitamina B12 (Min.) 20,00 mg/kg; ácido fólico (Min.) 3,00 mg/kg; ácido pantotênico (Min.) 15,00 mg/kg; biotina (Min.) 0,50 mg/kg; colina (Min.) 800,00 mg/kg; niacina (Min.) 31,20 mg/kg. **Composição básica:** farinha de vísceras, farelo de soja 1, farelo de glúten de milho 601, milho integral moído 1, óleo de peixe, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, iodato de cálcio, selenito de sódio, ácido fólico, pantotenato de cálcio, biotina, cloreto de colina, niacina, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, Zootécnico equilibrador da flora intestinal, conservante (propionato de cálcio), aditivo tecnológico antioxidante (BHT (hidróxido de tolueno butilado)).

Eventuais substitutivos: farinha de carne e ossos, farinha de resíduos de abatedouro de aves, farinha de peixe, gordura de frango, óleo de soja, degomado 2, quirera de arroz, monóxido de manganês, iodato de potássio, vitamina A/D3, aditivo tecnológico conservante (sorbato de potássio), aditivo tecnológico antioxidante (ácido cítrico). Contém milho 1 e soja 2 transgênicos e/ou outros ingredientes transgênicos produzidos a partir destes.

Lotes de 40 peixes foram pesados em uma balança de precisão (Western), medidos com um paquímetro e distribuídos em 28 aquários (35 x 28,5 x 13,5 cm) contendo 8 L de água de clorada, filtro biológico, aeração constante e temperatura em 28 ± 2 °C por meio de aquecedores acoplados a um termostato. O laboratório permaneceu em fotoperíodo de 12 horas.

Cento e doze potes de plástico (6,8 x 5,0 x 5,1 cm) foram colocados nos aquários, na proporção de quatro potes/aquário. Os potes tiveram os fundos removidos e substituídos por tecido organza para possibilitar a entrada de água e também foram perfurados na lateral. Para que permanecessem flutuando, cada pote foi envolvido por um suporte feito de isopor. Uma ninfa de terceiro ínstar de *B. anurum*, foi colocada em cada pote de acordo com o tratamento. Os insetos que morreram na primeira semana de experimento, foram substituídos por outros da mesma fase de desenvolvimento.

Os peixes eram alimentados 11 vezes ao dia, a vontade, com as dietas experimentais a cada uma hora (das 07:00 às 18:00 horas), por um período de 28 dias. No horário de 12:00 horas, *B. anurum* eram alimentados com dois peixes (i.e., larvas de tilápia-do-nilo, isentos de dietas com hormônio).

Após a última alimentação, os aquários foram sifonados na proporção de 2 L/aquário, os quais foram repostos nas mesmas condições experimentais. Para manter a água nas mesmas condições da água utilizada no experimento, foram mantidas duas caixas de PVC de 100 L contendo água aquecida por aquecedores ligados a termostato na temperatura de 28 ± 2 °C. Uma vez por semana foi trocado toda a água dos aquários.

A temperatura da água dos aquários foi aferida três vezes ao dia (07:00, 12:00 e

18:00 horas) por meio de um termômetro comum de álcool (0 a 100 °C), enquanto que o pH, a amônia e o oxigênio dissolvido eram verificados semanalmente utilizando-se os aparelhos: PHMETRO (K39-0014P - KASVI), Kit labconTest e Medidor de Oxigênio (YSI F-1550^a), respectivamente.

Os pesos obtidos inicialmente dos lotes de larvas foram divididos pela quantidade total de peixes presentes em cada aquário (40). Ao final de 28 dias, estes peixes foram pesados individualmente para o cálculo de ganho de peso (peso final menos peso inicial do peixe). Já para o ganho de comprimento, 20 alevinos foram medidos inicialmente por meio de um paquímetro, sendo em média 0,4 cm o tamanho inicial de cada larva. No fim do experimento, eles foram medidos individualmente e foi feito o comprimento final menos o comprimento inicial.

2.2.5 Segundo bioensaio: crescimento produtivo e fisiologia oxidativa

Neste bioensaio, havia dois tratamentos, larvas de tilápia-do-nylo na presença e ausência do *B. anurum*, sendo 14 repetições para cada.

Para a alimentação dos peixes presentes nos aquários, foi utilizado ração comercial em pó no primeiro mês (Tabela 2.1) e ração comercial em pellets no segundo mês (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Níveis de garantia da ração utilizada para a alimentação das larvas de tilápia-do-nylo durante a fase de crescimento.

Nutrientes	(g kg ⁻¹)
Umidade (Máx.)	80,00
Proteína bruta (Min.)	400,00
Extrato etéreo (Min.)	80,00
Fibra bruta (Máx.)	60,00
Matéria mineral (Máx.)	120,00
Cálcio (Min. - Máx.)	10,00 - 25,00
Fósforo (Min.)	8,00
Cobre (Min.)	0,013
Manganês (Min.)	0,036
Selênio (Min.)	0,00076
Zinco (Min.)	0,075
Ferro (Min.)	0,097
Colina (Min.)	2,00
Lisina (Min.)	19,00
Metionina (Min.)	8,5

Enriquecimento: vitamina A (Min.) 16.000,00 UI/kg; vitamina D3 (Min.) 4.500,00 UI/kg; vitamina E 400 UI/kg; vitamina K3 (Min.) 30 mg/kg; vitamina C (Min.) 1000 mg/kg; tiamina B1 (Min.) 32,00 mg/kg; riboflavina B2 (Min.) 32,00 mg/kg; piridoxina B6 (Min.) 32,00 mg/kg; vitamina B12 (Min.) 32,00 mg/kg; biotina (Min.) 0,10 mg/kg; niacina (Min.) 170,0 mg/kg; ácido fólico (Min.) 10,00 mg/kg; pantotenato de cálcio (Min.) 80,00 mg/kg; manano-oligossacarídeo 50,00 mg/kg; pediococcus acidilactici 15 x 10 E9UF.

Composição básica: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, farelo de glúten de milho, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, farinha de sangue, farinha de vísceras, óleo de soja, cloreto de sódio (sal comum), cloreto de colina, L-lisina, D-metionina, vitamina A, vitamina D3, vitamina K3, vitamina C, tiamina B1, riboflavina B2, piridoxina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, niacina, pantotenato de cálcio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, óxido de zinco, monóxido de manganês, selenato de sódio, protenato de cobre, protenato de ferro, protenato de manganês, protenato de zinco, selênio na forma orgânica, aditivo prebiótico, aditivo probiótico, farinha de algas marinhas, extrato de alecrim, óleo de palma, óleo de coco, ácido propiônico, aluminato de sódio e cálcio (hidróxido de tolueno butilado) BHA (butil hidróxido), propugalato.

Eventuais substitutivos: sorgo integral moído, farinha de gérmen de milho, farinha de gérmen de milho desengordurado, farinha de glúten de milho, farinha de arroz, farelo de arroz desengordurado, quirera de arroz, levedura seca de carne de açúcar, hemoglobina, óleo de peixe refinado, óleo de vísceras de aves.

A condição experimental no primeiro mês neste bioensaio foi a mesma que no primeiro bioensaio. Já no segundo mês de experimento, os peixes eram alimentados com ração em pellets, quatro vezes ao dia (08:00, 11:00, 14:00 e às 17:00 horas). Neste bioensaio, o tempo de duração do experimento foi maior, para que os peixes permanecesse por mais tempo com o predador, crescessem mais e obtivessem maior quantidade de sangue e de brânquias.

2.2.5.1 *Crescimento produtivo*

Lotes de 40 alevinos foram pesados no início do experimento, o valor obtido foi então dividido pela quantidade total de peixes presentes em cada aquário (40). Ao final de 60 dias, estes peixes eram pesados individualmente para o cálculo de ganho de peso. Sendo peso final menos peso inicial do peixe.

Para o ganho de comprimento, 20 alevinos foram medidos inicialmente por meio de um paquímetro, sendo em média 0,4 cm o tamanho inicial de cada um. No fim do experimento, os peixes foram medidos individualmente e foi feito o comprimento final menos o comprimento inicial.

2.2.5.2 *Resposta ao estresse*

Um total de 13 peixes de cada tratamento foram eutanasiados com óleo de cravo (400 mg/L) para as análises sanguíneas de lactato e 19 peixes para análise da glicose. Um

corte com bisturi foi feito na região do pedúnculo da nadadeira caudal e o sangue depositado em tiras reagentes (tiras reagentes do monitor digital Accutrend® PlusRoche para o lactato sanguíneo e tiras reagentes do monitor digital Accu-ChekActive®Roche para análise da glicose sanguínea).

2.2.5.3 Estresse oxidativo

Um total de 3 peixes de cada repetição, foram eutanasiados com óleo de cravo (400 mg/L) para a coleta das brânquias. Com uma pinça, o opérculo foi levantado e as mesmas foram expostas e em seguida retiradas por meio de um bisturi. As amostras das brânquias foram posteriormente congeladas em nitrogênio líquido e armazenado a - 80 °C até a sua utilização.

Em tampão fosfato de potássio (pH 7.4) 0.2 M com 1M EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram homogeneizados fragmentos de brânquias (\pm 100 mg) de *O. niloticus*. Um volume de 2 mL da suspensão resultante foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para as análises de superóxido dismutase (SOD), óxido nítrico (ON), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) e o produto da peroxidação lipídica malondialdeído (MDA). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros do Departamento de Biologia Animal da UFV e todos os procedimentos foram arrefecidos em gelo.

Para mensurar a atividade da SOD, foram adicionados juntamente em duplicata nas microplacas, 30 μ l de homogenato, 99 μ l em tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0), 6 μ l de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) e 15 μ l pirogalol (1,2,3-benzenotriol). Posteriormente, deixado na estufa por 5 minutos a 37 °C e, em seguida, acrescentou-se 100 μ l de DMSO (Dimetilsulfóxido) e realizou-se a leitura no espectrofotômetro (λ = 570nm). A SOD catalisa a reação do superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Dieterich et al. 2000). Desta forma, diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogalol. Os resultados foram expressos Unidades/mg proteína⁻¹.

Para a análise da enzima CAT, foram utilizados 1 mL de PBS pH 7.0 mais a mistura de 40 μ l de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mM) com 25 mL de tampão fosfato de potássio 0.2 M (pH 7.0) em 10 μ l do homogenato para realizar-se a leitura no espectrofotômetro (λ = 240 nm) e mensurar a atividade da enzima. Como descrito por Aebi

(1984), a atividade da CAT ocorre pela taxa de queda da absorbância em 60 segundos. Posteriormente, foi aplicado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $\epsilon_{240} = 36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e os resultados expressos em Unidades/mg proteína⁻¹.

Por meio de uma mistura contendo 10 μl de 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1 mM em etanol, 10 μl de glutathione redutase (GSH) 1 mM, 970 μl de tampão fosfato de potássio (pH 7.0) 100 mM e 10 μl de homogenato pela variação da absorbância em $\lambda = 340 \text{ nm}$ por 60 segundos, foi mensurada a atividade da enzima GST. De acordo com Habig et al. (1976), isto se dá pela formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar do CDNB $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig et al. 1974) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1} / \text{g}$.

O MDA foi estimado conforme descrito por Wallin et al. (1993). Em eppendorfs, foram pipetados 200 μl de homogenato e adicionado 400 μl de solução TBARS (ácido tricloroacético 15%, 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e ácido clorídrico 0,25 M) para homogeneização do tecido. Em seguida, os tubos foram mantidos em banho maria por 40 minutos em água fervente (90 °C) e resfriados a 5 minutos. Posteriormente, foi acrescentado álcool butílico (600 μl), agitado em vortex por ≈ 2 minutos e centrifugados (10 minutos a 300 rpm). O sobrenadante foi transferido para leitor de microplacas ($\lambda = 540 \text{ nm}$). Por meio de curva padrão de concentrações conhecidas, a concentração de MDA foi determinada a partir de 1, 1, 3,3-tetramethoxypropane (TMPO). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M} / \text{mg proteína}^{-1}$.

Pela metodologia de Tsikas (2007), foram adicionados 50 μl do homogenato e 100 μl Reativo de Griess em microplacas e incubados no escuro por 10 minutos para analisar o ON. Posteriormente, foi realizada a leitura das microplacas ($\lambda = 570 \text{ nm}$) em espectrofotômetro. A análise da enzima ON é detectada pela presença do nitrito. Isso ocorre pelo Reativo de Griess, composto por 1% de sulfanilamida e 0.1% naftil-etileno-diamina em 2.5% H_3PO_4 (ácido fosfórico). A concentração do ON das amostras foi averiguada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em Unidades/mg proteína⁻¹.

A concentração de proteína total da brânquia foi mensurada de acordo com Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina do soro bovino como curva padrão.

2.2.6 Análises estatísticas

Os dados de ganho de peso e de comprimento realizados no primeiro bioensaio, foram submetidos à análise de variância (One-Way) ou Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks quando não foram satisfeitas as premissas de normalidade e homogeneidade. Já os dados obtidos do segundo bioensaio, foram submetidos ao teste t ou Mann-Whitney Rank Sum quando os pressupostos de normalidade e homogeneidade não foram satisfeitos. Em todas as análises foi utilizado o programa SigmaPlot 12.5 (Systat Software, San José, CA, EUA), como também para a elaboração dos gráficos.

2.3 Resultados

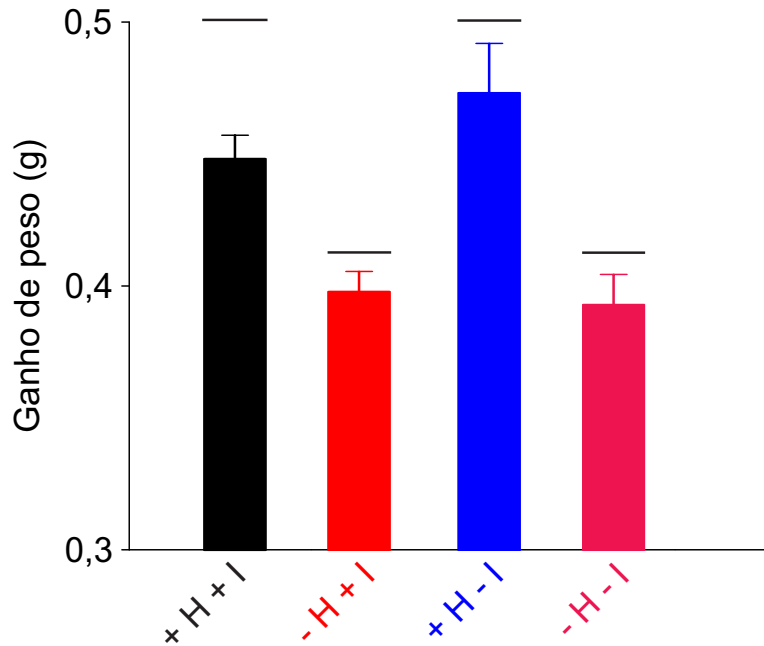
2.3.1 Primeiro bioensaio: crescimento produtivo

Independentemente da presença ou não do inseto, os peixes que receberam alimentação com hormônio obtiveram maior ganho de peso ($H = 61,927$ e $P < 0,001$), este resultado também se repete para o ganho de comprimento ($H = 45,942$ e $P < 0,001$) (Figura 2.1 e 2.2).

2.3.2 Segundo bioensaio: crescimento produtivo e fisiologia oxidativa

2.3.2.1 Crescimento produtivo

Neste experimento, sem a presença do hormônio na alimentação dos peixes nos aquários, foi mostrado que o predador *B. anurum* não interfere no crescimento da tilápia-do-nilo. Tanto o ganho de peso ($T = 205480,500$; $P = 0,446$) como o ganho de comprimento ($T = 196630,500$; $P = 0,359$) não diferiram estatisticamente (Figura 2.3 e 2.4).



- + H + I = com hormônio e com inseto
- H + I = sem hormônio e com inseto
- + H - I = com hormônio e sem inseto
- H - I = sem hormônio e sem inseto

Figura 2.1: Ganho de peso (g) de larvas de tilápia-do-nilo alimentadas com ração contendo hormônio 17α -metiltestosterona e alimentação isenta de hormônio, na presença e ausência do inseto *B. anurum* ao final de 28 dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis.

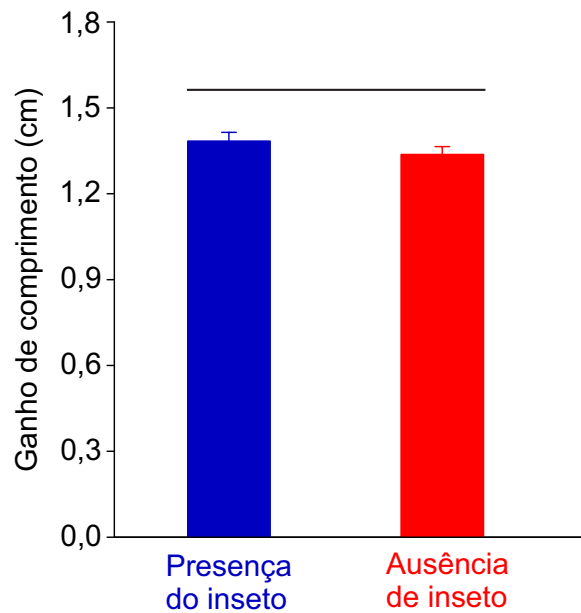
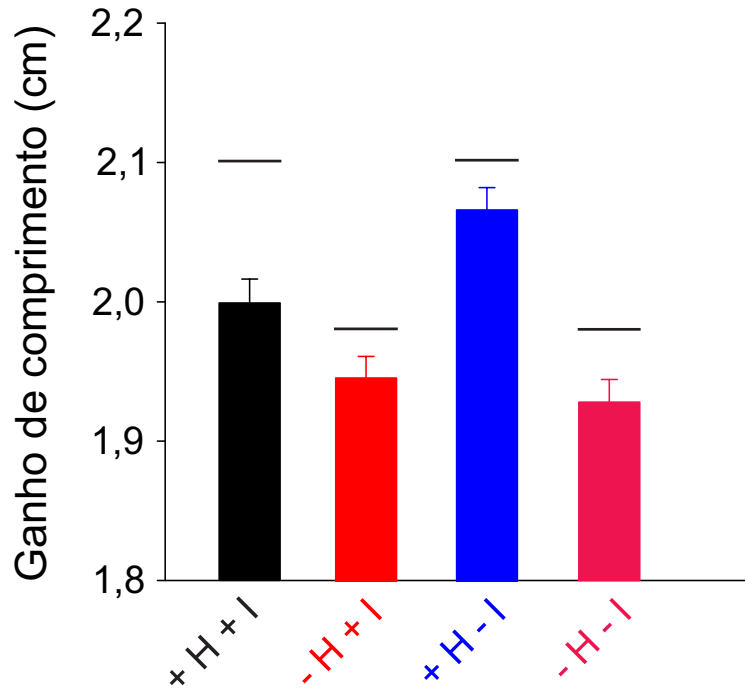


Figura 2.4: Ganho de comprimento (cm) de larvas de tilápia-do-nilo expostas ou não indiretamente ao predador *B. anurum* ao final de 60 dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney Rank.



+ H + I = com hormônio e com inseto

- H + I = sem hormônio e com inseto

+ H - I = com hormônio e sem inseto

- H - I = sem hormônio e sem inseto

Figura 2.2: Ganho de comprimento (cm) de larvas de tilápias-do-nilo alimentadas com ração contendo hormônio 17 α -metiltestosterona e alimentação isenta de hormônio, na presença e ausência do inseto *B. anurum* ao final de 28 dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis.

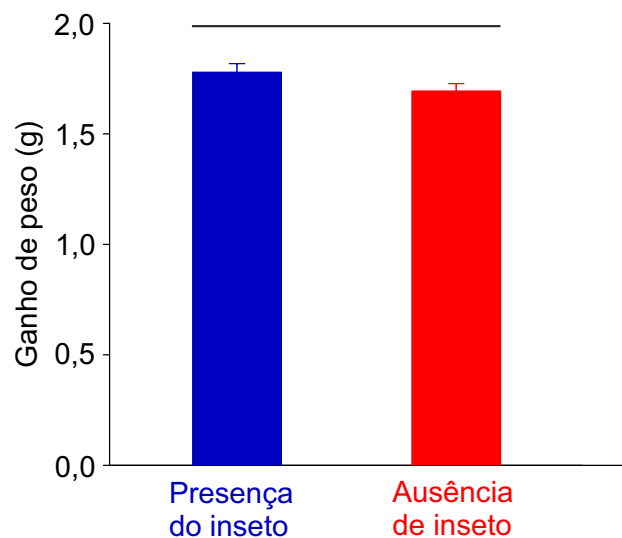


Figura 2.3: Ganho de peso (g) de larvas de tilápias-do-nilo expostas ou não indiretamente ao predador *B. anurum* ao final de 60 dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney Rank.

2.3.2.2 Resposta ao estresse

As concentrações de glicose e lactato sanguíneos encontradas nas tilápias-do-nilo, foram maiores quando elas estavam expostas indiretamente ao predador *B. anurum* ($t = 3,534$; $P = 0,001$ e $t = 3,940$; $P < 0,001$), respectivamente (Figura 2.5, 2.6).

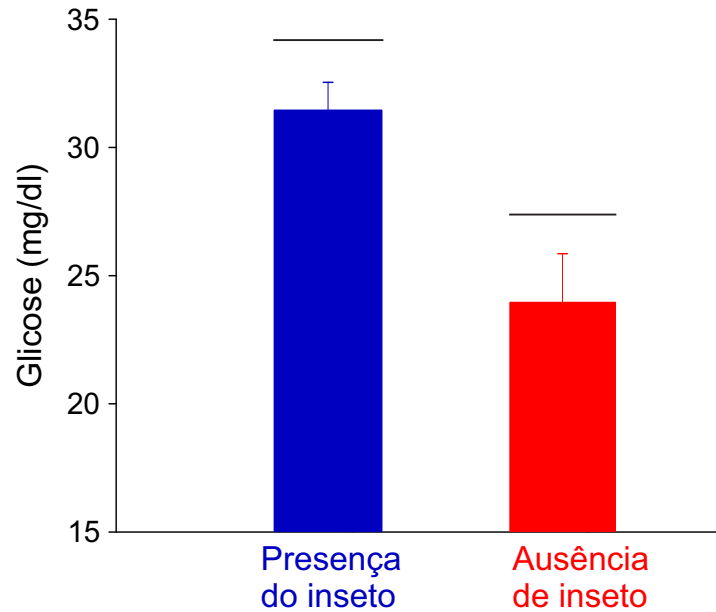


Figura 2.5: Concentração de glicose sanguínea (mg/dl) de tilápia-do-nilo quando exposta ou não indiretamente ao predador *B. anurum* ao final de 60 dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste t.

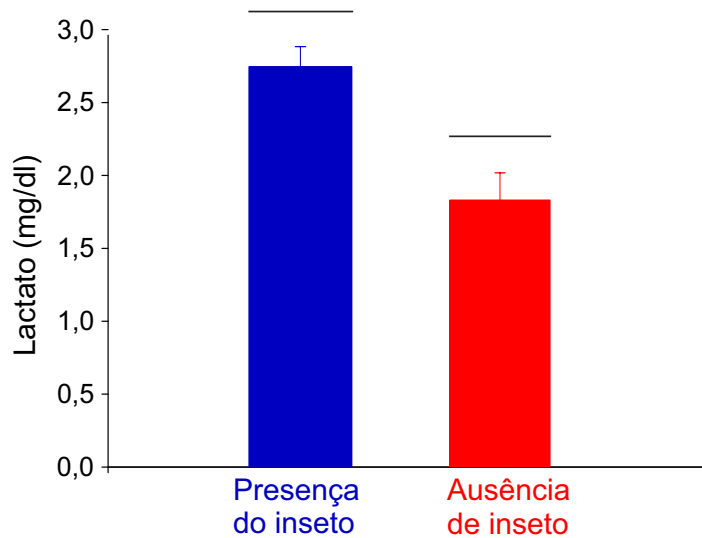


Figura 2.6: Concentração de lactato sanguíneo (mg/dl) de tilápia-do-nilo quando exposta ou não indiretamente ao predador *B. anurum* ao final de 60 dias. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste t.

2.3.2.3 Estresse oxidativo

A mensuração da capacidade antioxidante das células de brânquias de tilápias-do-nilo, resultaram em aumento da atividade da enzima SOD para os peixes que estavam expostos indiretamente ao *B. anurum* ($t = 2,180$; $P = 0,0385$) (Figura 2.7). Enquanto que para os demais agentes antioxidantes, CAT ($T = 2,38$; $P = 0,113$), GST ($t = 1,345$; $P = 0,19$), MDA ($T = 203,000$; $P = 1,00$) e ON ($T = 192,000$; $P = 0,629$) os resultados foram semelhantes (Figura 2.8 A, B, C e D).

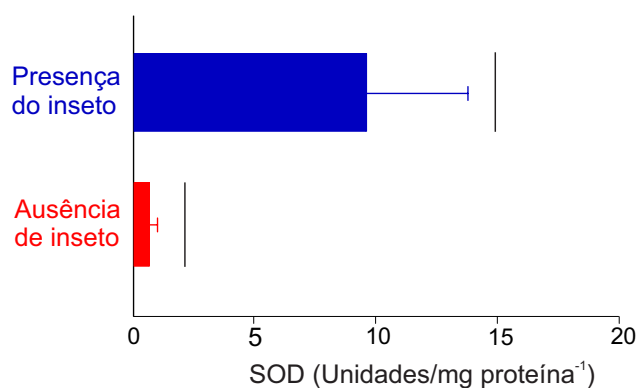


Figura 2.7: Mensuração da atividade da superóxido dismutase - SOD (Unidades/mg proteína⁻¹) em células de brânquias de tilápias-do-nilo, quando estas estavam expostas ou não indiretamente ao predador *B. anurum*. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste t.

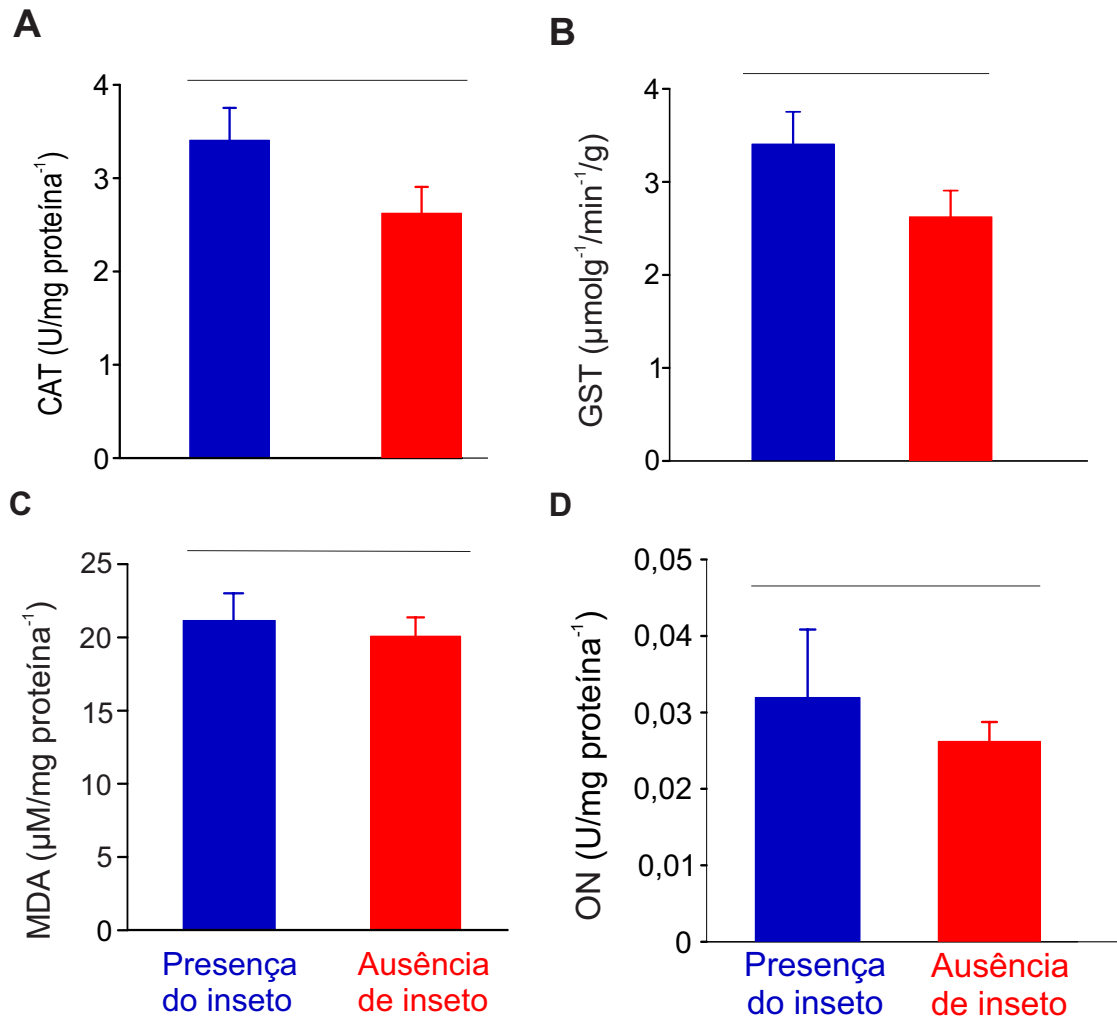


Figura 2.8: Mensuração da atividade das enzimas: **A.** CAT (catalase) e **B.** GST (glutathiona S-transferase); e das concentrações de: **C.** MDA (malondialdeído) e **D.** ON (óxido nítrico) em células de brânquias de tilápias-do-nilo, quando estas estavam expostas ou não indiretamente ao predador *B. anurum*. Médias seguidas por linhas na mesma altura não diferem estatisticamente pelo teste Mann-Whitney Rank (CAT, MDA e ON) e pelo test t (GST).

2.4 Discussão

Muitos modelos ecológicos pressupõe que predadores e presas relacionam-se por meio da captura e consumo, onde ocorre declínio da população de presas. Entretanto, estas podem manifestar comportamentos anti-predatórios como estratégias de defesa (Murdoch et al. 2003; Preisser and Bolnick 2008). Além do mais, o comportamento de forrageamento pode sofrer maior impacto do que medidas de sobrevivência, crescimento e fecundidade (Preisser and Bolnick 2008).

Os resultados deste trabalho, mostraram que na presença do predador *B. anurum*, a tilápia-do-nilo não sofre interferência no crescimento produtivo (ganho de peso e comprimento), ou seja, sob o risco de predação, as presas não deixaram de se alimen-

tar. Há estudos com outras espécies de invertebrados que demonstraram o contrário (Abrams and Rowe 1996; Lima 1998; Adamo and Baker 2011; Van Dievel et al. 2016). Em contrapartida, os tratamentos que receberam hormônio na dieta (independente da presença do inseto) obtiveram maior ganho de peso e comprimento em relação aos que receberam dieta pura, isso se deve ao fato deste hormônio 17 α -metiltestosterona que é um anabolizante, ser eficaz para aumentar a síntese de proteína e estimular o aumento da massa muscular do peixe (Bhasin et al. 2001; Dias-Neto et al. 2016), como já foi abordado em diferentes estudos com tilápias-do-nilo (Mair et al. 1995; Dan and Little 2000; Little et al. 2003; Chakraborty et al. 2011) e em outras espécies de peixes, *Labeo rohita* (Pandey et al. 2014).

Foi demonstrado que o predador é um agente estressor para suas presas. Apesar da tilápia-do-nilo tolerar certas condições ambientais (e.g., pH, temperatura, amônia e xenobióticos) e estresse induzido pela manipulação (Tsadik and Bart 2007), os resultados apontaram que os parâmetros da resposta ao estresse (glicose e lactato) aumentaram nas tilápias-do-nilo que estavam em contato indireto com o predador *B. anurum*. Já se sabe que os níveis de glicose e lactato sanguíneos são constantemente utilizados como padrões de confiança para as respostas fisiológicas em condições de estresse (Mommensen et al. 1999).

A glicose é de suma importância para os vertebrados, uma vez que, ela é essencial para o desempenho dos órgãos, como brânquias, cérebro, gônadas e eritrócitos (Hemre et al. 2002). Já o lactato, revela o acúmulo de ácido láctico resultante do aumento do exercício físico (i.e., fuga) quando os animais são expostos a um estressor (Barton et al. 2002; Morgan and Iwama 2011). Este aumento da glicose e do lactato indica uma resposta secundária do organismo destes peixes, como consequência da elevação dos hormônios (e.g., cortisol) que induz o aumento na glicemia e ácido láctico plasmático (Iwama 1998; Brandão et al. 2006).

Já o estresse oxidativo é a elevada produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) e diminuição ou aumento das enzimas antioxidantes nas células (Monaghan et al. 2009; Lushchak et al. 2008; Lushchak 2011; Nishida 2011). Os EROS são produzidos por agentes estressores para os peixes, como metais pesados, pesticidas, temperatura, turbidez da água, salinidade, parasitismo e quando na presença do seu predador (Bonga 1997; Bell et al. 2007; Lushchak et al. 2008; Slaninova et al. 2009). Além do

mais, a própria célula produz os radicais livres, sendo a mitocôndria a principal fonte de EROS (Mahboob 2013). Isto implica para a célula, em oxidação de proteínas e DNA e peroxidação de lipídios (Livingstone 2003), como consequências fisiológicas para os peixes, pode levar a redução no crescimento produtivo e reprodutivo e a diminuição na capacidade imunológica, tornando-os susceptíveis a doenças (Lushchak 2011).

A SOD, CAT e a GST são as principais enzimas antioxidantes, sendo importantes indicadoras de estresse oxidativo. A SOD converte O_2^- a H_2O_2 , enquanto a CAT é uma enzima fundamental para promover a degradação de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002). Por outro lado, a GST é responsável pela biotransformação de compostos xenobióticos (Hyne and Maher 2003; Rauch and Nauen 2004). Os resultados deste trabalho mostraram que somente a SOD, aumentou sua concentração nas células das brânquias das tilápias-do-nilo que estavam em contato com o *B. anurum*. É presumível que o aumento da quantidade de EROS neste trabalho, está associado à resposta de luta ou fuga (Janssens and Stoks 2013). Quando na presença do predador, os peixes em sinal de resposta, fogem e conseqüentemente ocorre o aumento da sua respiração (Wada et al. 2008). Mas a produção destas EROS não foram suficientes para promover a peroxidação lipídica nas membranas celulares (MDA) e aumentar a produção de radicais livres (ON). Como as brânquias são os órgãos responsáveis pela troca gasosa, equilíbrio ácido-base e regulação iônica, isso a torna um local específico para poluentes em geral, que afetam a morfologia do epitélio (Evans 1987), como também, na preparação em respostas a fuga. Gerando aumento das taxas metabólicas e alocação de energia para a natação e posterior fuga (Janssens and Stoks 2013). Outro fator que poderia explicar esse estresse, seria a emissão de sinais químicos na água pelo predador, como o jato fecal. Estes odores podem chegar até os peixes evidenciando um sinal de alerta (King and Green 1999; Fendt et al. 2005; Mella et al. 2011). Como já foi demonstrado por Martin et al. (2010) com *Rutilus rutilus* (Cypriniformes: Cyprinidae).

Mediante a isso, conclui-se que a fase de larva das tilápias-do-nilo é afetada quando em situação de risco predatório, como já visto em outros estudos (Romero 2004; Brown et al. 2005). Isso pode acarretar em menor produção para o piscicultor, uma vez que, os peixes estressados podem diminuir seu desenvolvimento e conseqüentemente morrerem.

2.5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

2.6 Referências

- Abrams, P. A. and L. Rowe (1996). The effects of predation on the age and size of maturity of prey. *Evolution*, 1052–1061.
- Adamo, S. A. and J. L. Baker (2011). Conserved features of chronic stress across phyla: the effects of long-term stress on behavior and the concentration of the neurohormone octopamine in the cricket, *Gryllus texensis*. *Hormones and behavior* 60(5), 478–483.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105, 121–126.
- Ansaldo, M., D. E. Nahabedian, E. Holmes-Brown, M. Agote, C. V. Ansay, N. R. V. Guerrero, and E. A. Wider (2006). Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. *Toxicology* 224(1), 119–127.
- Apfelbach, R., C. D. Blanchard, R. J. Blanchard, R. A. Hayes, and I. S. McGregor (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29(8), 1123–1144.
- Balarin, J. D. and R. D. Haller (1982). The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. *Recent advances in aquaculture* 1, 265–355.
- Barbosa, I. R., S. Lopes, R. Oliveira, I. Domingues, A. M. V. M. Soares, and A. J. A. Nogueira (2013). Determination of 17 α -methyltestosterone in freshwater samples of tilapia farming by high performance liquid chromatography. *American Journal of Analytical Chemistry* 4(4), 207.
- Barton, B. A., J. D. Morgan, and M. M. Vijayan (2002). Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, 111–148.
- Beaven, U. and V. Muposhi (2012). Aspects of a monosex population of *Oreochromis niloticus* fingerlings produced using 17 α -methyltestosterone hormone. *Journal of Aquaculture Research and Development* 3, 1–5.
- Bell, A. M., T. Backström, F. A. Huntingford, T. G. Pottinger, and S. Winberg (2007). Variable neuroendocrine responses to ecologically-relevant challenges in sticklebacks. *Physiology & Behavior* 91(1), 15–25.

- Benard, M. F. (2004). Predator-induced phenotypic plasticity in organisms with complex life histories. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 651–673.
- Berg, M. P. and J. Ellers (2010). Trait plasticity in species interactions: a driving force of community dynamics. *Evolutionary Ecology* 24(3), 617–629.
- Bhasin, S., L. Woodhouse, and T. W. Storer (2001). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *Journal of endocrinology* 170(1), 27–38.
- Bonga, S. E. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews* 77(3), 591–625.
- Brandão, F. R., L. de Carvalho Gomes, and E. C. Chagas (2006). Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica* 36(3), 349.
- Brown, C., C. Gardner, and V. A. Braithwaite (2005). Differential stress responses in fish from areas of high-and low-predation pressure. *Journal of Comparative Physiology B* 175(5), 305–312.
- Chakraborty, S. B., S. Banerjee, and S. Chatterjee (2011). Increased androgen receptor expression in muscle tissue contributing to growth increase in androgen-treated Nile tilapia. *Aquaculture International* 19(6), 1119–1137.
- Chakraborty, S. B., D. Mazumdar, U. Chatterji, and S. Banerjee (2011). Growth of mixed-sex and monosex Nile tilapia in different culture systems. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11(1).
- Dan, N. C. and D. C. Little (2000). The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. *Aquaculture* 184(3), 221–231.
- Dias-Neto, J., G. M. R. Valladão, P. H. de Oliveira Viadanna, and F. Pilarski (2016). Three strategic feeding during hatching of Nile tilapia: effects on organs integrity, parasitism and performance parameters. *International Aquatic Research* 8(1), 37–48.
- Dieterich, S., U. Bieligg, K. Beulich, G. Hasenfuss, and J. Prestle (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart. *Circulation* 101(1), 33–39.
- Dmitriew, C. M. (2011). The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? *Biological Reviews* 86(1), 97–116.
- El-Sayed, A.-F. M. (2006). *Tilapia culture*. CABI.
- Evans, D. H. (1987). The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 71, 47.
- FAO (2016). Food and agriculture organization of the United Nations.

- Fendt, M., T. Endres, C. A. Lowry, R. Apfelbach, and I. S. McGregor (2005). Tmt-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29(8), 1145–1156.
- Golan, M. and B. Levavi-Sivan (2014). Artificial masculinization in tilapia involves androgen receptor activation. *General and comparative endocrinology* 207, 50–55.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249(22), 7130–7139.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby (1976). Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175(2), 710–716.
- Haddad, V., E. F. Schwartz, C. A. Schwartz, and L. N. Carvalho (2010). Bites caused by giant water bugs belonging to Belostomatidae family (Hemiptera, Heteroptera) in humans: A report of seven cases. *Wilderness & environmental medicine* 21(2), 130–133.
- Hawlena, D. and O. J. Schmitz (2010b). Physiological stress as a fundamental mechanism linking predation to ecosystem functioning. *The American Naturalist* 176(5), 537–556.
- Hemre, G., T. P. Mommsen, and . Krogdahl (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8(3), 175–194.
- Hermes-Lima, M. and T. Zenteno-Savin (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133(4), 537–556.
- Herrich-Schaeffer, G. A. W. (1848). Die wanzenartigen insecten. *Nuremberg: Lotzbeck, J.R.* 8, 28.
- Honorato, C. A. (2012). Microdietas na alimentação da tilápia do nilo durante a fase de reversão sexual. *Nucleus Animalium* 4(1).
- Hyne, R. V. and W. A. Maher (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and environmental safety* 54(3), 366–374.
- Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851(1), 304–310.
- Janssens, L. and R. Stoks (2013). Predation risk causes oxidative damage in prey. *Biology letters* 9(4), 20130350.
- King, D. and B. Green (1999). *Goannas: the biology of varanid lizards*. UNSW Press.
- Kweka, E. J., G. Zhou, T. M. Gilbreath, Y. Afrane, M. Nyindo, A. K. Githeko, and G. Yan (2011). Predation efficiency of *Anopheles gambiae* larvae by aquatic predators in western Kenya highlands. *Parasites & vectors* 4(1), 128.

- Lima, S. L. (1998). Stress and decision making under the risk of predation: recent developments from behavioral, reproductive, and ecological perspectives. *Advances in the Study of Behavior* 27, 215–290.
- Linnaeus, C. (1762). *Oeconomia naturae. Miscellaneous Tracts relating to Natural History, Husbandry and Physick*, edited by: Stillingfleet, B., 2nd Edn., London, 37–129.
- Little, D. C., R. C. Bhujel, and T. A. Pham (2003). Advanced nursing of mixed-sex and mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry, and its impact on subsequent growth in fertilized ponds. *Aquaculture* 221(1), 265–276.
- Livingstone, D. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire* 154(6), 427–430.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, et al. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265–275.
- Lushchak, V., O. I. Kubrak, M. Z. Nykorak, K. B. Storey, and V. I. Lushchak (2008). The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: possible protective role of glutathione. *Aquatic Toxicology* 87(2), 108–114.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101(1), 13–30.
- Mahboob, S. (2013). Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Life Sciences Journal* 10(10s), 336–347.
- Mair, G. C., J. S. Abucay, J. A. Beardmore, and D. O. F. Skibinski (1995). Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from yy-males in *Oreochromis niloticus* L.: On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture* 137(1-4), 313–323.
- Martin, C. W., F. J. Fodrie, K. L. Heck Jr, and J. Mattila (2010). Differential habitat use and antipredator response of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to olfactory and visual cues from multiple predators. *Oecologia* 162(4), 893–902.
- Mateen, A., I. Ahmed, et al. (2015). Androgen sex reversal, subsequent growth and meat quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pak. J. Agri. Sci* 52(1), 199–202.
- Mella, V. S. A., C. E. Cooper, and S. J. J. F. Davies (2011). Predator odour does not influence trappability of southern brown bandicoots (*Isodon obesulus*) and common brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Australian Journal of Zoology* 58(5), 267–272.
- Mommsen, T. P., M. M. Vijayan, and T. W. Moon (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9(3), 211–268.

- Monaghan, P., N. B. Metcalfe, and R. Torres (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters* 12(1), 75–92.
- Morgan, J. D. and G. K. Iwama (2011). Measurements of stressed states in the field. *Fish stress and health in aquaculture* 62, 247.
- Murdoch, W. W., C. J. Briggs, and R. M. Nisbet (2003). *Consumer-resource dynamics*, Volume 36. Princeton University Press.
- Nishida, Y. (2011). The chemical process of oxidative stress by copper (ii) and iron (iii) ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 142(4), 375–384.
- Pandey, A. K., M. Sarkar, G. Kanungo, C. T. Mahapatra, and P. K. Arvindakshan (2014). Effects of varying dietary protein and 17 α -methyltestosterone on growth and survival of fry of *Labeo rohita* (Hamilton-Buchanan). *Journal of Experimental Zoology, India* 17(2), 687–691.
- Popma, T. J. and B. W. Green (1990). Sex reversal of tilapia in earthen ponds. *Auburn University: International Center for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station*.
- Popma, T. J. and L. L. Lovshin (1996). *Worldwide prospects for commercial production of tilapia*. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments.
- Preisser, E. L. and D. I. Bolnick (2008). The many faces of fear: comparing the pathways and impacts of nonconsumptive predator effects on prey populations. *PloS one* 3(6), e2465.
- Rauch, N. and R. Nauen (2004). Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase from the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect biochemistry and molecular biology* 34(4), 321–329.
- Rivero-Wendt, C., A. Borges, E. Oliveira-Filho, A. Miranda-Vilela, M. Ferreira, and C. Grisolia (2014). Effects of 17 α -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Genet Mol Res* 13, 605–615.
- Rivero-Wendt, C. L., A. L. Miranda-Vilela, M. F. Ferreira, A. M. Borges, and C. K. Grisolia (2013). Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17 α -methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Genet Mol Res* 12(3), 3862–3870.
- Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution* 19(5), 249–255.
- Shalan, E. A.-S. and D. V. Canyon (2009). Aquatic insect predators and mosquito control. *Tropical biomedicine* 26, 223–261.

- Slaninova, A., M. Smutna, H. Modra, and Z. Svobodova (2009). Reviews oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters* 30(1), 2.
- Tara, J. and R. Kour (2014). Biology and morphometric studies of aquatic bug, *Sphaerodema molestrum* (Hemiptera: Belostomatidae) from Jammu (J&K, India). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2(3), 82–85.
- Tsadiq, G. G. and A. N. Bart (2007). Effects of feeding, stocking density and water-flow rate on fecundity, spawning frequency and egg quality of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 272(1), 380–388.
- Tsikas, D. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B* 851(1), 51–70.
- Van Dievel, M., L. Janssens, and R. Stoks (2016). Short-and long-term behavioural, physiological and stoichiometric responses to predation risk indicate chronic stress and compensatory mechanisms. *Oecologia* 181(2), 347–357.
- Wada, H., K. G. Salvante, C. Stables, E. Wagner, T. D. Williams, and C. W. Breuner (2008). Adrenocortical responses in zebra finches (*Taeniopygia guttata*): individual variation, repeatability, and relationship to phenotypic quality. *Hormones and Behavior* 53(3), 472–480.
- Wallin, B., B. Rosengren, H. Shertzer, and G. Camejo (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical biochemistry* 208(1), 10–15.
- Werner, E. E. and S. D. Peacor (2003). A review of trait-mediated indirect interactions in ecological communities. *Ecology* 84(5), 1083–1100.
- Zanette, L. Y., M. Clinchy, and J. P. Suraci (2014). Diagnosing predation risk effects on demography: can measuring physiology provide the means? *Oecologia* 176(3), 637–651.

Conclusões gerais

Este trabalho realizou a criação de *B. anurum* sob condições laboratoriais, onde a alimentação com presas menores aumentou a duração de ínstar (i. e., quarto e o quinto ínstar), enquanto os insetos que consumiram presas maiores (peixes), obteve menor ciclo de vida.

Os insetos expostos ao hormônio presente na ração dos peixes, não sofreram interferência no seu desenvolvimento. Já os que se alimentaram de peixes tratados, diminuíram seu tempo de desenvolvimento no quinto ínstar.

A proporção de insetos machos não foram afetados pelo hormônio.

No geral, as fêmeas consumiram mais peixes do que os machos, no entanto, machos do quinto ínstar que consumiram peixes tratados se alimentaram mais em relação as fêmeas do mesmo tratamento.

A exposição de ninfas de terceiro ínstar de *B. anurum* a concentrações subletais (0,01 e 0,1 mg/L) do hormônio 17 α -metiltestosterona é capaz de aumentar o tempo de sobrevivência desses indivíduos.

Apenas o hormônio 17 α -metiltestosterona, foi eficiente para interferir no desempenho produtivo das tilápias-do-nilo, aumentando o ganho de peso e o ganho de comprimento.

A presença do predador aquático *B. anurum*, resultou em estresse nos peixes, aumentando a concentração de glicose e lactato sanguíneos, além do mais, causou estresse oxidativo, aumentando a atividade da enzima SOD, presente nas brânquias.

Apesar de preliminar, conclui-se com base nos resultados aqui descritos, a fase juvenil das tilápias-do-nilo é afetada quando em situação de risco predatório e que a exposição subletal de *B. anurum* ao 17 α -metiltestosterona resultou em benefícios (e.g., maiores habilidades de sobrevivência como também menor duração do quinto ínstar) ao inseto aquático. Entretanto, novas experimentações precisam serem conduzidas para se averiguar se estas respostas benéficas ao inseto não poderiam por torná-los uma maior ameaça a produção de alevinos revertidos sexualmente, uma vez que eles

poderão permanecer por mais tempo nos ambientes contendo concentrações subletais do hormônio 17 α -metiltestosterona.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campus Universitário – Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone: (31) 3899.3275 – e-mail: ceuap@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 04/07/16

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Interações inseto/peixe no processo de reversão sexual da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)**", protocolo n° 40/2016, sob a responsabilidade de **Eugênio Eduardo de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de **24/Jun/2016**.

Finalidade: Pesquisa Ensino

Vigência do Projeto: de **06/2016** a **07/2017**

Espécie/linhagem: **Peixe (*Oreochromis niloticus*)** N° de animais: **2000**

Peso: **0,06 g** Idade: **04 dias** Sexo: — Origem: **Piscicultura/UFV – CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Interactions between fish and insects in the sexual reversion of Nile's tilapia (*Oreochromis niloticus*)**" protocol n° 40/2016, under the responsibility of **Eugênio Eduardo de Oliveira** - which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law n° 11.794, of October 8, 2008, Decree n° 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on **Jun, 24th, 2016**.

Finality: Research Education

Duration of the Project: from **Jun, 2016** to **Jul, 2017**.

Species / strain: **Fish (*Oreochromis niloticus*)** N° of animals: **2000**

Weight: **0,06 g** Age: **04 days** Sex: — Source: **Piscicultura/UFV – CNPJ/CPF: 25.944.455/0001-96**

Mário Luiz Chizzotti
Coordenador da CEUAP/UFV