



INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NA REAÇÃO DE ALARME EM PEIXES

M.L. de Campos

L.M. Ide

Universidade Federal de São João del - Rei, Departamento de Ciências Naturais, Laboratório de Ecofisiologia, Campus Dom Bosco, Praça Dom Helvécio, nº 74, Bairro Fábricas, 36.301 - 160, São João del - Rei, MG, Brasil. Telefone: (32) 3379 2460 maralucampos@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Muitos organismos, incluindo numerosos peixes liberam involuntariamente sinais químicos quando a pele é mecanicamente danificada, o que pode acontecer quando a presa é atacada ou capturada por um predador (Pfeiffer, 1963; Pfeiffer, 1977). Esta substância, quando liberada na água, induz reações de alarme ou respostas defensivas antipredatórias em co - específicos e hétero - específicos (Pfeiffer, 1977; Chivers & Smith, 1998). As respostas antipredatórias dependem do estado motivacional e energético dos animais, sob uma avaliação de custo - benefício (Mcnamara & Houston, 1994). Já foi demonstrado que a emocionalidade modula as respostas comportamentais em peixes (Corrêa & Hoffmann, 1999; Ide & Hoffmann, 2002). Esse fenômeno é definido, em mamíferos, como níveis de ansiedade. O controle dessa condição é associada à participação da amígdala (Ledoux, 2003) e há inúmeras evidências do papel crítico dessa estrutura cerebral para os efeitos ansiolíticos de drogas benzodiazepínicas (Nagy *et al.*, 1979; Bueno *et al.*, 2005). No caso dos peixes, dizer sobre estado de ansiedade ainda é um tema controverso, mas a emocionalidade nesses animais pode ser definida como as alterações induzidas por drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Receptores benzodiazepínicos foram descritos em diversos vertebrados não mamíferos, incluindo os peixes teleosteos (Nielsen *et al.*, 1978). Tais receptores estão presentes em alta concentração em diversas partes do telencéfalo dos peixes e drogas ansiolíticas (benzodiazepínicos) são farmacologicamente ativas nesses animais (Nielsen *et al.*, 1978; Rehnberg *et al.*, 1989). Para desenvolvimento deste trabalho, utilizamos como sujeito experimental o piau *Leporinus piau*, um peixe de hábito alimentar preferencialmente herbívoro, que se reproduz em cativeiro, mediante desova induzida (Britski *et al.*, 1984). O piau é um peixe nativo da bacia do Rio São Francisco, uma das mais importantes do Brasil, irrigando os estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Sato & Godinho, 1999). Produzem a substância de alarme e apresentaram reação a esta, confirmado pela existência de células club na epiderme desses animais e pelas respostas comportamentais de alarme apresen-

tadas pelos animais testados, sendo a resposta variável em condições de manutenção em agrupamento ou isolamento, em laboratório (Magalhães *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de analisar a influência do estado emocional sobre a reação de alarme em peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção de animais

Foram utilizados 69 piau juvenis, sem distinção de sexo, mantidos em aquários de vidro, contendo cascalho recobrindo o fundo, água de clorificada, aerada e continuamente filtrada (conteúdo de oxigênio variando de 7,0 a 10,0mg.l⁻¹), a temperatura em torno de 23,5°C e expostos ao ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Os peixes foram adquiridos da GMAlévinos, de Contagem-MG, mantidos no Laboratório de Ecofisiologia do campus Dom Bosco da Universidade Federal de São João del - Rei e alimentados diariamente às 10h30, com 3% da biomassa de ração comercial específica para peixes.

Inicialmente, os animais foram mantidos agrupados em aquários de vidro por no mínimo 30 dias para aclimação às condições laboratoriais (dimensões: 44x22x26cm; volume de água: 18l), depois transferidos para aquários experimentais e mantidos isoladamente de coespecíficos por pelo menos 10 dias previamente à realização dos testes. Todas as paredes, exceto a anterior, foram revestidas externamente com papel opaco para isolamento visual de outros peixes.

Estímulo químico

Alguns peixes foram pesados, medidos e posteriormente decapitados. A pele de ambos os lados do corpo foi removida a partir da região do pedúnculo caudal até próximo à região opercular. A área total aproximada de pele de piau utilizada para preparar o extrato de pele (EPC) foi de 25cm². Essa

pele foi homogeneizada em 50ml de água destilada e posteriormente filtrada para remover escamas e tecidos (Lawrence & Smith, 1989).

Grupo experimental

Leporinus piau juvenis (n=66) foram tratados com diazepam (0,5, 1,0 ou 2,0mg/Kg) e o efeito da droga foi avaliado na reação de alarme. A droga ou veículo foi aplicado via injeção intraperitoneal e a reação de alarme foi analisada 30 minutos após. Para avaliar a influência do diazepam sobre a reação de alarme, os peixes foram submetidos a 5 diferentes condições:

Grupo A (efeito do diazepam na reação de alarme, n=44): 0,5, 1,0 ou 2,0mg de diazepam/kg + EPC

Grupo B (reação de alarme, n=13): solução Ringer de teleósteo + EPC

Grupo C (controle, n=12): solução Ringer de teleósteo + água destilada

Sistema de registro e análise dos dados

Para quantificar a atividade locomotora, a parede posterior do aquário foi dividida em linhas verticais e horizontais, formando nove quadrantes ou células, pela frequência absoluta de deslocamentos por intervalo de tempo, obtida pela contagem do número de vezes em que o animal se deslocará pelas diferentes células. Foram quantificados a frequência absoluta de deslocamentos pré e pós - estímulo químico, por intervalo de tempo um minuto antes e após estímulo químico, e o tempo relativo de permanência em cada célula. Todos os animais foram monitorados 10 min antes (linha de base) e 10 min após a introdução do estímulo químico, utilizando - se filmadora. Os dados foram transcritos e quantificados para posterior análise estatística.

Os resultados serão apresentados como média \pm EPM. Testes não - paramétricos foram utilizados, visto que os dados não passaram nos testes de igualdade e/ou normalidade. O Teste de Friedman foi utilizado para comparações de frequência e tempo de dados dependentes e complementado pelo Teste Tukey ou de Student Neuman - Keuls (SNK). Para as comparações entre os diferentes grupos experimentais utilizamos e Teste de Kruskal - Wallis, complementado pelo Teste de Dunn. Um nível de significância de 0,05 foi adotado em todos os testes (Zar, 1996).

RESULTADOS

Em relação à atividade locomotora, tanto os animais tratados com salina, quanto com diazepam apresentaram maior frequência absoluta de deslocamentos no fundo, depois na meia água e menor frequência de deslocamentos na superfície (p0,001, Teste de Friedman, complementado pelo Teste de SNK). Já, quanto ao tempo relativo de permanência nas células, animais tratados com salina permaneceram em média 69% do tempo no fundo e 24% na meia água, enquanto que animais tratados com diazepam permaneceram 91% do tempo no fundo. Dos 17 animais tratados com 2,0mg/kg, quatro deles apresentaram perda postural e deslocamento com dificuldade pelo aquário. Identificamos diferenças estatísticas em animais tratados com 2,0 (n=13) ou 1,0mg/kg (n=15) de diazepam, os quais permaneceram significativamente mais tempo no fundo (H=11,752; P=0,019) e menos tempo na meia água

em relação aos animais do grupo controle, tratados com salina (H=14,0; P=0,007). Esses resultados sugerem que o diazepam teve efeito anestésico e possivelmente ansiolítico nos animais, anulando atividade natatória em alguns e restringindo locomoção em outros principalmente no fundo do aquário.

Após a introdução da substância de alarme, os animais previamente tratados com salina apresentaram redução estatisticamente significativa do deslocamento pela meia água (X²=39,195; P0,001; Teste de Friedman, complementado pelo teste de SNK) e apresentaram redução na frequência absoluta de deslocamentos nos tempos 3 a 6 min em relação ao primeiro minuto pós - introdução do estímulo químico (X²=43,29; P0,001; Teste de Friedman, complementado pelo teste de Tukey). Esses resultados indicam que animais tratados com salina e estimulados com a substância de alarme apresentaram reação de alarme, apesar de ausência de diferenças estatísticas em relação aos animais estimulados com água destilada. Possivelmente, os procedimentos de captura, manipulação e injeção retardaram a resposta de alarme, mas esta não foi anulada. *L. piau* não manipulados e estimulados com substância de alarme apresentam reações de alarme imediatamente, principalmente nos tempos 1 e 2 minutos após estimulação química, sendo que as respostas mais frequentes são as de dashing e imobilidade (Magalhães *et al.*, 2003). Além das respostas comportamentais, Rehnberg *et al.*, (1987) observaram que *Semotilus margarita* apresenta variações metabólicas de alarme incluindo elementos de uma resposta de estresse, tal como, elevação das concentrações sanguíneas de cortisol e glicose após detecção da substância de alarme. O retardo na reação de alarme foi, possivelmente, devido ao estresse provocado pelo manuseio de peixes e é demonstrado em outros estudos, nos quais há aumento do estresse associado com a retirada do peixe da água em procedimentos de captura, afetando a atenção do peixe em comportamentos de esquiava a novos objetos (Brydges *et al.*, 2009) e estímulos dolorosos, devido à injeção de ácido acético para estimulação de receptores nociceptivos em trutas, *Rainbow Trout*, diminui a neofobia, que foi interpretado como uma redução na atenção devido ao estresse causado pelo estímulo nociceptivo (Sneddon, *et al.*, 2003).

Já os animais estimulados com a substância de alarme e previamente tratados com diazepam apresentaram atividade locomotora inalterada e permaneceram no fundo do aquário nas fases pré e pós - estimulação química, comprometendo o reconhecimento de um possível efeito ansiolítico do diazepam à substância de alarme. Estudos com benzoazepínicos demonstram efeitos ansiolíticos em peixes, como a modulação da parada cardíaca reversível pelo diazepam na tilápia - do - Nilo *Oreochromis niloticus* (Ide & Hoffmann, 2002) e da resposta de alerta na tucunaré *Gymnotus carapo* (Corrêa & Hoffmann, 1999). O clordiazepóxido aumenta resposta de exploração territorial e abole a resposta de fuga em *Pimephales promelas* exposto à substância de alarme (Rehnberg *et al.*, 1989).

Pela análise dos resultados ora apresentados, a substância de alarme induz reação de alarme em piaus previamente manipulados, reconhecido pela redução na atividade natatória, apesar do retardo no tempo de resposta. O diazepam apresentou efeito sedativo sobre os animais, diminuindo a ativi-

dade natatória e mantendo os animais mais tempo no fundo do aquário. Devido, a essas respostas não fica claro o efeito ansiolítico do diazepam à substância de alarme. Torna-se necessário o monitoramento de outras variáveis como alterações neurovegetativas, humorais, ventilatórias e/ou cardiocirculatórias para identificarmos possíveis efeitos do diazepam sobre a reação de alarme em peixes.

CONCLUSÃO

Piaus submetidos aos procedimentos de captura, manipulação e injeção apresentaram um retardo na resposta de alarme, mas esta não foi anulada. O diazepam apresentou efeito sedativo sobre os animais, diminuindo a atividade natatória e mantendo os animais mais tempo no fundo do aquário.

(Agradecimentos a UFSJ-CNPQ pelo financiamento).

REFERÊNCIAS

- Brydges, N.M., Boulcott, P., Ellis, T., Braithwaite, V.A., Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species. *Applied Animal Behaviour Science*, v.116, p.295 - 301, 2009
- Britski, H.A.; Sato, Y.; Rosa, A.B.S. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias, com chaves de identificação para peixes da Bacia do Rio São Francisco. Brasília, Câmara dos Deputados, 1984*
- Bueno, C.H.; Zangrossi, J.R.H.; Viana, M.B. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T - maze and light/dark transition tests. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, p.1697 - 1701, 2005
- Chivers, D.P.; Smith, R.J.F. Chemical alarm Signalling in aquatic predator - prey systems: a review and prospectus. *Écoscience*, v.5 (3), p.338 - 352, 1998
- Corrêa, S.A.L.; Hoffmann, A. Effect of drugs that alter alertness and emotionality on the novelty response of a weak electric fish, *Gymnotus carapo*. *Physiology & Behavior*, v.65, p.863 - 869, 1999
- Lawrence, B.J.; Smith, R.J.F. Behavioral response of solitary fathead minnows, *Pimephales promelas*, to alarm substance. *Journal of Chemical Ecology*, v.15 (1), p.209 - 219, 1989
- Mcnamara, J.M.; Houston, A.I. The Effect of a Change in Foraging Options on Intake Rate and Predation Rate. *The American Naturalist*, v.144, n.6, p.978 - 1000, 1994
- Magalhães, E.J.; Hoffmann, A.; Ide, L.M. Alarm reaction in a south American teleost fish. In: XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia e XXI Congresso da Associação Latino - Americana de Ciências Fisiológicas, Ribeirão Preto, **Resumos...**São Paulo, p.315, 2003.
- Nagy, J.; Zambo, K.; Decsi, L. Anti - anxiety action of diazepam after intra - amygdaloid application in the rat. *Neuropharmacology*, v.18, p.573 - 576, 1979
- Nielsen, M.; Braestrup, C.; Squires, R.F. Evidence for a late evolutionary appearance of brain - specific benzodiazepine receptors: an investigation of 18 vertebrate and 5 invertebrate species. *Brain Research*, v.141, p.342 - 6, 1978
- Pfeiffer, W. Alarm substances. *Experientia*, v.19, p.113 - 123, 1963.
- Pfeiffer, W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*, p.653 - 665, 1977.
- Rehnberg, B.G.; Bates, E.H.; Smith, R.J.F.; Sloley, B.D.; Richardson, J.S. Brain benzodiazepine receptors in fathead minnows and the behavioural response to alarm pheromone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.33, p.435 - 42, 1989
- Rehnberg, B.G.; Smith, R.J.F.; Sloley, B.D. The reaction of pearl dace (Pisces, Cyprinidae) to alarm substance: time - course of behavior, brain amines, and stress physiology. *Canadian Journal of Zoology*, v.65, p.2916 - 2921, 1987
- Sato, Y., Godinho, H.P. Peixes da Bacia do Rio São Francisco. In: Lowe - McConnel (Ed.), *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. São Paulo: EDUSP, 1999
- Sneddon, L.U., Braithwaite, V.A., Gentle, M.J., Novel object test: Examining nociception and fear in the rainbow trout. *J. Pain*, v.4, p.431 - 440, 2003b
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 3.ed. New Jersey, Prentice - Hall, 1996.