



**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO EUGENOL E DA
INDUÇÃO HORMONAL REPRODUTIVA NO
RITMO BIOLÓGICO DE PEIXES**

VIVIANE DE OLIVEIRA FELIZARDO

2010

VIVIANE DE OLIVEIRA FELIZARDO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO EUGENOL E DA INDUÇÃO
HORMONAL REPRODUTIVA NO RITMO BIOLÓGICO DE PEIXES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de concentração em
Produção Animal, para a obtenção do título de
“Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Felizardo, Viviane de Oliveira.

Efeitos da exposição ao eugenol e da indução hormonal reprodutiva no ritmo biológico de peixes / Viviane de Oliveira Felizardo. – Lavras : UFLA, 2010.

57 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Anestésico. 2. Fotoperíodo. 3. Reprodução induzida. 4. Toxicidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.31

VIVIANE DE OLIVEIRA FELIZARDO

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO EUGENOL E DA INDUÇÃO
HORMONAL REPRODUTIVA NO RITMO BIOLÓGICO DE PEIXES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, área de concentração em
Produção Animal, para a obtenção do título de
“Doutor”.

APROVADA em 10 de abril de 2010

Prof. Jerry Carvalho Borges DMV/UFLA

Prof. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas DZO/UFLA

Prof^a. Cristina Delarete Drummond DMV/UFLA

Prof^a. Elissandra Ulbricht Winkaler UFRB

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

“Levanta-te, resplandece, porque vem a tua luz, e a glória do SENHOR vai nascendo sobre ti; porque eis que as trevas cobriram a terra, e a escuridão os povos; mas sobre ti o SENHOR virá surgindo, e a sua glória se verá sobre ti.”

(IS 60. 1,2)

Dedico este trabalho a Deus, por estar comigo em cada passo dessa caminhada e que nos momentos de fraqueza foi o meu refúgio e me restaurou com Sua força.

“Amor (Ederland) a você que passou momentos angustiantes na minha ausência, mas nem isso te impediu de demonstrar seu amor e carinho por mim, que ajudou a me manter prosseguindo. Sei que Deus nos aliviou nos momentos de saudade durante minha ausência. Você faz parte de cada um destes projetos apresentados aqui. Te amo”.

Aos meus pais, Sirlei de Souza Felizardo e Maria Aparecida de Oliveira Felizardo, que souberam compreender a minha ausência em muitos momentos e estiveram sempre na retaguarda me apoiando.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todos os momentos que tem proporcionado em minha vida, por ter me sustentado de pé diante as dificuldades.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, pelo acolhimento.

Aos professores Luis David Solis Murgas e Francisco Javier Sanchez Vázquez, pela orientação, confiança e apoio.

À CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao funcionário do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do DMV/UFLA, Willian César Cortez e do Laboratório de Anatomia Marcos Antônio Machado por estarem sempre prestativos, pela ajuda concedida e pelos momentos de descontração.

Aos professores Jerry Carvalho Borges, Elissandra Ulbricht Winkaler, Rilke Tadeu Fonseca de Freitas e Cristina Delarete Drummond por se disponibilizarem a fazerem parte da banca.

Aos colegas Estefânia Andrade, Fernando, Ulisses, Pablo, Aline e Vitor por auxiliarem na execução do projeto.

Enfim, a todos que contribuíram para minha formação e para execução desse projeto,

MUITO OBRIGADA...

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1	1
1 Introdução geral.....	1
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Ritmos biológicos.....	3
2.2 Ritmo diário em peixes.....	4
2.3 Anestésicos na piscicultura	5
2.3.1 Óleo de cravo (Eugenol).....	7
2.4 Reprodução	8
2.4.1 Fotoperíodo na reprodução.....	8
2.4.2 Reprodução induzida.....	9
2.4.3 Extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC).....	11
2.4.4 Gonadorelina (aGnRH).....	12
2.5 Espécie estuda.....	13
2.5.1 Zebrafish (<i>Danio rerio</i> Hamilton-Buchanan, 1822).....	13
2.5.2 Lambari do rabo amarelo <i>Astyanax bimaculatus</i>	14
3 Referências bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 2: Influência do fotoperíodo no efeito anestésico e na toxicidade de eugenol em zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	23
1 Resumo.....	24
2 Abstract.....	24
3 Introdução.....	25
4 Material e métodos.....	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Atividade motora diária.....	27

4.3 Teste de toxicidade preliminar.....	27
4.4 Teste de toxidade: Concentração letal (CL50) em ML e ME.....	28
4.5 Atividade de zebrafish exposto ao anestésico.....	28
5 Resultados e discussão.....	29
5.1 Ritmo diário de atividade.....	29
5.2 Curva de mortalidade em ML e ME.....	30
5.3 Efeito subletal de eugenol.....	33
6 Referências bibliográficas.....	36
CAPÍTULO 3: Influência do fotoperíodo na atividade reprodutiva de	
Lambari (<i>Astyanax bimaculatus</i>) induzido hormonalmente.....	40
1 Resumo.....	41
2 Abstract.....	42
3 Introdução.....	42
4 Material e métodos.....	44
4.1 Experimento 1.....	45
4.2 Experimento 2.....	46
5 Resultados e discussão.....	47
6 Agradecimentos.....	53
7 Referências bibliográficas.....	53
CONCLUSÕES FINAIS.....	57

RESUMO GERAL

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. **Efeitos da exposição ao eugenol e da indução hormonal reprodutiva no ritmo biológico de peixes**. 2010. 57 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.¹

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos no ritmo biológico de zebrafish *Danio rerio* exposto ao anestésico eugenol; verificar a influência do fotoperíodo na toxicidade de eugenol em zebrafish; analisar a influência do fotoperíodo na indução hormonal de lambari *Astyanax bimaculatus*; determinar o ritmo de atividade diária de lambari e verificar a eficiência de gonadorelina (GnRH) e extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) na reprodução induzida de lambari. O experimento com os exemplares de zebrafish foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade de Murcia-Espanha. Exemplares de zebrafish foram mantidos a um fotoperíodo de 12:12 Luz:Escuro (L:E). Para verificação da influência do fotoperíodo na toxicidade de zebrafish expostos ao eugenol, 480 peixes foram expostos a diferentes concentrações de eugenol (45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 200 mg.L) na metade do período de luz (ML) e metade do período de escuro (ME), onde foi realizado o cálculo da concentração letal média (CL50) utilizando o programa Spearman-Kärber test. Foi registrada a atividade motora destes animais. As análises de vídeo da atividade motora dos peixes expostos ao anestésico foram realizadas no programa Fish Tracker v1.1. O experimento com lambari foi realizado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. As quarenta e quatro fêmeas de lambari foram mantidas a um fotoperíodo de 12:12 Luz:Escuro (L:E). Foi realizado o registro da atividade motora diária destas espécies. Foram realizadas aplicações com uma dose única de 6 mg.kg peixe de EBHC e 80 µg.kg peixe de gonadorelina. A aplicação hormonal foi realizada na metade do período de luz (ML) e metade do período de escuro (ME) em 11 exemplares por tratamento. Após a ovulação, os exemplares foram sacrificados e foi avaliado o peso das gônadas e fígado para cálculo de índice gonadossomático (IGS%) e índice hepatossomático (IHS%), respectivamente. Foram coletados 0,1 g de ovócitos para determinação da fecundidade absoluta (FA), fecundidade absoluta relativa para peso (FARP) e fecundidade absoluta relativa para comprimento (FARC). Foram coletados ovócitos para verificação do diâmetro (µm) e da posição periférica da vesícula germinativa (PPVG %). O cálculo de

¹ Comitê Orientador: Luis David Solis Murgas – UFLA (Orientador), Cristina Delarete Drummond - UFLA.

horas graus (HG °C) da ovulação foi realizado através do somatório da temperatura a cada hora. Com os resultados foi possível verificar a influência do fotoperíodo na resposta de no zebrafish à exposição a diferentes concentrações de eugenol. O eugenol apresenta-se mais tóxico quando aplicado durante o período de luz. O lambari apresenta um ritmo diário crepuscular de atividade. Fêmeas induzidas com EBHC durante ML demoraram mais tempo para ovular do que animais submetidos aos demais tratamentos. As fêmeas que foram induzidas em ML, independente do hormônio utilizado, apresentaram maior ($P < 0,05$) FARP em relação ao grupo que foi induzido em ME. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). A aplicação hormonal de EBHC (6 mg.kg) e gonadorelina (80 µg.kg) durante ML e ME são eficientes para induzir a reprodução em lambari, embora, o EBHC tenha apresentado maior ($P < 0,05$) porcentagem de ovócitos com PPVG em relação ao uso de gonadorelina. Estes experimentos indicam que peixes expostos à anestésico e à indução hormonal da reprodução demonstram respostas fisiológicas que podem ser influenciadas pelo fotoperíodo.

Palavras-chave: Anestésico. Fotoperíodo. Reprodução induzida. Toxicidade.

ABSTRACT

FELIZARDO, Viviane de Oliveira. **Effects of eugenol exposition and of reproductive hormonal induction in the biological rhythms of fishes**. 2010. 57 p. Thesis (Doctoral in Animal Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras¹.

This work was carried out to analyze the effects of the anesthetic eugenol in the biological rhythms of the zebrafish *Danio rerio* and to examine the influence of photoperiod on the toxicity of eugenol in zebrafish; to analyze the influence of photoperiod on the hormonal induction of lambari *Astyanax bimaculatus*; to determine the rhythm of daily activity of lambari and to verify the efficiency of gonadorelin (GnRH) and the crude extract of carp pituitary (CECP) on the induced reproduction of lambari. The experiment with zebrafish was carried out at the Laboratory of Animal Physiology, University of Murcia, Spain. Samples of zebrafish were kept at a photoperiod of 12:12 light:dark (L:D). To test the influence of photoperiod on the toxicity of zebrafish exposed to eugenol, 480 fishes were exposed to different concentrations of eugenol (45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 and 200 mg.L) in a period mid-light (ML), and in a period mid-dark (MD). After it, was calculate the median lethal concentration (LC50), using the Spearman-Kärber test program. Also, was recorded the motor activity from these animals. Analyses of video motor activity of fishes exposed to the anesthetic were performed in the program Fish Tracker v1.1. The experiment with lambari was performed at the Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras. For this, was recorded daily motor activity of the forty-four females kept in a photoperiod of 12:12 light:dark (L:D). The fishes were received a single dose of 6 mg.kg CECP or 80 µg.kg gonadorelin. The hormonal application was done in period of mid-light (ML) and mid-dark period (MD) in a total of 11 specimens per treatment. After ovulation, the specimens were euthanized and evaluated the liver and gonad weight to calculation of gonadosomatic index (GSI%) and hepatosomatic index (HSI%), respectively. The absolute fecundity (AF), absolute fecundity relative to weight (AFRW) and absolute fecundity relative to length (AFRL) was calculated in 0.1 g of oocytes. Oocytes were also collected to verify the diameter (µm) and the peripheral position of the germinal vesicle (PPGV%). The calculation of hours degrees (HG °C) of ovulation was carried out by the sum of the temperature every hour. The results demonstrated that was effect of the exposure

¹ Guidance Committee: Luis David Solis Murgas – UFLA (Major Professor), Cristina Delarete Drummond– UFLA.

to different concentrations of eugenol in the zebrafish in ML and MD. The results indicated that lambari has a daily rhythm of crepuscular activity. Females with induced during CECP ML took longer to ovulate than animals subjected to other treatments. Females that were induced in ML independent of the hormone used had higher ($P < 0.05$) FARP compared to the group that was inducted into ME. Other parameters showed no significant difference ($P > 0.05$). The application CECP hormone (6 mg.kg) and gonadorelin (80 μ g.kg) at ML and MD were efficient to induce reproduction in lambari, although the CECP had higher ($P < 0.05$) percentage of oocytes with PPGV regarding the use of gonadorelin. These experiments indicated that fishes exposed to the anesthetic and to the reproductive induction with hormones showed physiological responses that may be influenced by photoperiod.

Key words: Anesthetic. Photoperiod. Induced reproduction. Toxicity.

CAPÍTULO 1

1 Introdução geral

Os movimentos de rotação e translação da terra fazem com que os organismos que nela habitam sejam submetidos a mudanças cíclicas dos fatores ambientais. Todas as formas de vida respondem aos ciclos do sol, da lua e das estações, sendo denominados de relógio biológico ou ritmo circadiano. Os animais são governados com um ciclo que é correspondente ao tempo de uma rotação terrestre. Cada ciclo de 24 horas influencia uma função do organismo: temperatura, níveis hormonais, ritmo cardíaco, pressão arterial e até mesmo sensibilidade à dor.

O comportamento animal e a maioria dos processos fisiológicos no corpo são regulados por ciclos diários de luz: escuro, bem como, pelas mudanças sazonais na duração do período de luz e escuro. A pineal, em vertebrados, é um órgão endócrino, que ajusta o ritmo biológico, mediante mudanças ambientais, através da produção do hormônio melatonina. Todos estes ciclos que atuam sobre os seres vivos têm promovido a aparição de relógios biológicos associados com estas variações cíclicas e que podem contribuir para uma maior sobrevivência dos organismos.

Os ritmos biológicos diários são associados com oscilações ambientais com uma periodicidade de 24 horas. Esses ritmos se denominam circadianos quando ocorrem em condições ambientais constantes, indicando a existência de um controle endógeno das atividades fisiológicas. Os fatores externos ao relógio de natureza rítmica que influenciam nos ritmos biológicos chamam-se sincronizadores ou Zeitgebers (do alemão, Zeit=tempo; geber=dar), um exemplo de Zeitgeber é o ciclo luz-escuro. Os ciclos de fotoperíodo e a temperatura são os principais sincronizadores do ritmo diário de comportamento e de expressão de genes relógio.

Os relatos na literatura sobre a influência do fotoperíodo sobre peixes expostos a anestésicos e na reprodução induzida de lambari são escassos. Diante disto, este trabalho teve como objetivos: verificar a influência do fotoperíodo na resposta de zebrafish exposto ao eugenol; verificar a influência do fotoperíodo nas características reprodutivas de lambari *Astyanax bimaculatus* induzido hormonalmente; determinar o ritmo de atividade diária de lambari e verificar a eficiência de extrato bruto de hipófise de carpa e a gonadorelina na reprodução induzida de lambari.

2 Referencial bibliográfico

2.1 Ritmos biológicos

As mudanças cíclicas dos fatores ambientais, aos quais os organismos vivos estão expostos, podem ter diferentes periodicidades: anual (que pode ser marcada pelas estações nas regiões temperadas), lunar (que influenciam as marés) e diária (originado pela alteração luz e escuro). Todos estes ciclos atuam sobre os seres vivos através da evolução e têm promovido a aparição de relógios biológicos que podem ser utilizados para antecipar estas mudanças, a fim de otimizar sua sobrevivência (Oliveira, 2009).

A maioria dos animais possui um relógio endógeno que lhes proporcionam informações temporais, permitindo sentir as mudanças diárias de luz e escuro. Ocorre um reconhecimento dos períodos do dia e da noite, da fase lunar e da época do ano em que esses organismos se encontram. O marca-passo, que controla endogenamente os ritmos biológicos, está situado no hipotálamo, na pineal e nos olhos dos vertebrados (Oliveira, 2009).

O ritmo biológico pode ser definido como a repetição de um fenômeno biológico em intervalos regulares de tempo (Aschoff, 1981). Os ritmos biológicos diários encontram-se associados com oscilações ambientais com uma periodicidade de 24 horas, e se denominam circadianos quando ocorrem em condições ambientais constantes, indicando a existência de controle endógeno. Se a frequência do ritmo for inferior a um dia (<24h), ele será denominado ultradiano. Por outro lado, os ritmos que possuem uma periodicidade de mais de um dia (>24h) são classificados como infradianos. Por último, os ritmos circ-
anuais estão associados com ciclos ambientais de periodicidade anual e podem afetar muitos processos biológicos estacionais tais como a reprodução, a migração, a hibernação, etc. (Oliveira, 2009).

As variações periódicas externas são utilizadas pelos animais para ajustar seu relógio interno e seus ritmos biológicos e se denominam sincronizadores

("zeitgebers"), que podem se classificar em dois tipos: fatores abióticos e bióticos. Entre os fatores abióticos, a luz e os ciclos de temperatura são os principais sincronizadores do ritmo diário de comportamento e de expressão de genes relógio (Carr et al., 2006) e têm um papel crucial nos ritmos estacionais, como a reprodução de peixes (Bromage et al., 2001).

2.2 Ritmo diário em peixes

O ritmo diário em peixes tem sido estudado durante as últimas duas décadas, com especial ênfase nos ritmos de comportamento (locomotor, reprodutivo e alimentar) e nos ritmos de secreção de fatores neuroendócrinos (Oliveira, 2009).

No que se refere aos ritmos de comportamento, as espécies de peixes têm sido classificadas como diurnas, noturnas ou crepusculares, de acordo com a hora do dia em que se tem o pico de sua atividade (Oliveira, 2009). Esta preferência para estar ativo em determinadas horas do dia parece ser específica de cada espécie e pode estar associada com uma herança genética ou com adaptações aos habitats (disponibilidade de alimento, predação, etc.) ou depender de fatores sensoriais (dependência da visão para a captura de alimento).

No entanto, algumas espécies podem possuir certa plasticidade nos padrões de atividade, como ocorre com os juvenis de bacalhau, *Gadus morhua*, que apresentam atividade noturna durante o verão e diurna no inverno (Clark & Green, 1990). Por outro lado, algumas espécies não alteram o seu padrão de comportamento. Um exemplo é a tencha, *Tinca tinca*, uma espécie estritamente noturna, inclusive em fotoperíodos extremamente curtos com somente duas horas de escuro por dia (Herrero et al., 2003).

Em peixes o relógio circadiano parece estar localizado na pineal, uma glândula fotossensível envolvida no controle da síntese de melatonina. Estudos

in vitro sugeriram que a maioria das espécies de teleósteos possui osciladores endógenos intrapineais, que controlam o ritmo de produção da melatonina (Oliveira et al., 2009).

O ritmo de atividade apresentado pelo peixe pode estar relacionado à produção de algumas substâncias e hormônios liberados. No robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), variações nos ritmos diários de concentração plasmática de cortisol, glicose e insulina foram observadas por Cerdá-Reverter et al. (1998), onde apresenta um ritmo diário diurno de concentração destas variáveis.

2.3 Anestésicos na piscicultura

O primeiro relato do uso de anestésicos em peixe ocorreu na década de 1930 e, deste então, foram desenvolvidos diversos agentes químicos e diferentes procedimentos para a insensibilização de peixes (Hoskonen & Pirhonen, 2004). Assim, o uso de anestésicos tem se tornado cada vez mais comum nas pisciculturas.

Diversas operações associadas com a piscicultura, como: marcação de matrizes, transporte, aplicação de hormônios, vacinas e coleta de sangue e de tecidos para análise, causam um grande desgaste nos animais (King et al., 2005), portanto os anestésicos têm sido empregados para tentar amenizar o efeito negativo destas práticas.

Um anestésico pode ser considerado ideal quando reúne algumas características como: uma atuação rápida (em torno de 3 minutos); um tempo de recuperação curto (cerca de 5 minutos); facilidade na aplicação; um baixo risco para os animais e para o ser humano; uma margem ampla de segurança nas dosagens utilizadas; ausência de efeitos persistentes na fisiologia dos peixes e em seu comportamento se utilizado de forma contínua; metabolização e excreção rápidas, pouco ou ausência de resíduos no organismo; ação passageira e não persistência no metabolismo dos peixes (King et al., 2005).

A farmacocinética das drogas no metabolismo dos animais pode ser fortemente influenciada por diversos fatores, como temperatura da água, espécie, oxigênio disponível, estado fisiológico e tamanho do animal (Woody et al., 2002). No entanto, não existem pesquisas que associam o fotoperíodo sobre a resposta de peixes quando expostos a anestésicos.

Os sedativos usados em peixes geralmente afetam músculos e nervos interferindo nos movimentos musculares e nas transmissões de informações sensoriais. Diversas alterações metabólicas são decorrentes do efeito da anestesia, desde uma leve sedação até o colapso medular levando à morte (Holloway et al., 2004).

Em peixes, os anestésicos atuam nos neurônios, bloqueando os canais de sódio, reduzindo, assim, a transmissão dos potenciais de ação nos nervos. A capacidade de interferir sobre o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) para minimizar respostas ao estresse tem sido um parâmetro norteador para a escolha dos anestésicos (Palic et al., 2006).

Diversos estudos comprovam que a utilização de sedativos reduz a concentração de corticóides (cortisol) e catecolaminas na circulação sanguínea, durante manejos estressantes.

Não existem leis que regulamentam o uso de anestésicos para peixes comerciais no Brasil. Desta forma, procura-se seguir as recomendações de países com regulamentos já definidos (Façanha & Gomes, 2005). Por outro lado, outros países, como os Estados Unidos e a Nova Zelândia, já possuem regulamentação quanto ao uso do óleo de cravo, de MS-222 e da benzocaína.

A benzocaína e o MS-222, derivados do ácido paminobenzóico, são solúveis em gordura, podendo ser acumulada nos tecidos dos peixes destinados ao consumo humano. Com isso, anestésicos alternativos, como o eugenol, têm sido empregados, pois peixes que são expostos a estes compostos não necessitam de depuração (Walsh & Pease, 2002).

O ensaio toxicológico de um determinado composto químico inicia-se com os testes de avaliação da toxicidade aguda. O objetivo desse teste é calcular a concentração letal média (CL50) do agente na água onde os organismos testados estão. A CL50 é a concentração estimada que causa mortalidade em 50% da população teste durante o período de exposição (Rand & Petrocelli, 1985). A determinação da letalidade é importante para estimar a concentração e potência de uma substância química e a sensibilidade da espécie alvo. Em seguida, outras respostas, além da mortalidade, podem ser observadas quando o animal é exposto a concentrações mais inferiores (subletais).

2.3.1 Óleo de cravo (Eugenol)

O óleo de cravo é um composto de origem natural obtido através da destilação de *Eugenia aromática* e *Eugenia caryophyllata* (Cunha & Rosa, 2006). Esse óleo contém vários compostos de terpeno que são responsáveis pelo aroma e paladar característicos (Ross & Ross, 2000).

As vantagens do uso do óleo de cravo estão no seu baixo preço de custo, e em sua capacidade de causar pouco ou nenhum efeito indesejado para os peixes e para quem o administra (Cunha & Rosa, 2006). De acordo com Wagner et al. (2002), este fármaco é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não possuindo um tempo de carência. Por esses motivos, ele vem sendo utilizado como anestésico de peixes em vários países, com vantagens econômicas e sem propriedades tóxicas aparentes.

No estudo realizado por Svobodova et al. (2007), o óleo de cravo em concentrações de 30-40 mg.L foi usado para a imobilização em peixes por um curto período de tempo. Nestas concentrações, a anestesia foi induzida com 5-10 minutos de exposição, apesar de o período de recuperação ter sido superior em relação a outros anestésicos.

O eugenol foi testado e caracterizado como anestésico para diversas espécies de peixes, como a carpa comum (Velisek et al., 2005), a truta arco-íris, (Holloway et al., 2004), a garoupa (King et al., 2005), o peixe-gato (Velisek et al., 2006), o mero gigante (Park et al., 2008), o linguado do Senegal *Solea senegalensis* (Weber et al., 2009) e o zebrafish *Danio rerio* (Mácová et al., 2008).

Estudos mostraram que o eugenol pode ser uma alternativa eficaz para o uso de MS-222 para a anestesia de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Wagner et al., 2002), peixe gato, *Ictalurus punctatus* (Small, 2003) e salmão-vermelho, *Nerka oncorhynchus* (Woody et al., 2002).

2.4 Reprodução

2.4.1 Fotoperíodo na reprodução

Em regiões temperadas, a reprodução de peixes teleósteos é controlada pelo aumento ou a diminuição do fotoperíodo e temperatura, a fim de atingir máxima sobrevivência da prole, devido às condições favoráveis que são alcançadas em determinada época do ano. O fotoperíodo sincroniza a reprodução sazonal e o órgão pineal parece ser o mediador entre o ambiente e o peixe (Bromage et al., 2001).

Existem muitas evidências de que a pineal, através da produção da melatonina, desempenha um papel fundamental na regulação dos padrões rítmicos sazonais e diários, incluindo a reprodução (Falcón et al., 2007).

A melatonina age sobre o eixo hipotálamo-hipófisário-gonadal, que por sua vez, controla a reprodução através de sinais neuroendócrinos (gonadotrofinas), da produção de esteróides sexuais e de fatores de crescimento nas gônadas. No entanto, o mecanismo de regulação de melatonina ainda é desconhecido, uma vez que parece haver inconsistências nos resultados dos estudos que foram realizados até a data (Falcón et al., 2007).

Segundo Amano et al. (2000), o tratamento com a melatonina apresentou um efeito estimulante sobre o índice gonadossomático (IGS), nas gonadotrofinas I (GTH-I) e elevou os níveis de testosterona em machos precoces de salmão japonês, *Oncorhynchus masou*. Esses resultados sugerem que é possível imitar um fotoperíodo curto através da administração de melatonina que estimulou o desenvolvimento testicular.

Em um estudo sobre o robalo europeu, os regimes artificiais de luz foram capazes de influenciar os níveis de melatonina circulante e afetar o ritmo diário de hormônio luteinizante (Bayarri et al., 2004). Para a mesma espécie, um estudo recente (Servili et al., 2008) sugeriu um papel para os hormônios liberadores de gonadotropina tipo II e tipo III na modulação da função da pineal e da retina, respectivamente.

2.4.2 Reprodução induzida

A reprodução da maioria dos peixes é sazonal, estando geralmente sincronizada com fatores ambientais que se adequam às necessidades metabólicas dos reprodutores, incrementando a viabilidade dos gametas e favorecendo o desenvolvimento inicial da prole (Oyakama et al., 2006).

Considerando-se que o objetivo da reprodução é a produção de jovens que possam atingir a idade adulta e procriar, o sucesso da reprodução depende de um ajuste temporal que garanta que a desova ocorra no melhor local e no momento exato, quando as condições ambientais se apresentem as mais favoráveis para a sobrevivência dos descendentes (Lowe-McConnel, 1999). Dessa forma, a sincronia entre os processos fisiológicos de maturação gonadal com as condições ambientais faz-se extremamente necessária (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Uma série de mecanismos de ajuste está envolvida no processo de maturação gonadal e desova, basicamente através de controles hormonais. No

início do desenvolvimento gonadal ocorre um aumento no nível de gonadotropina na hipófise e no plasma, servindo provavelmente para recrutar os ovócitos e iniciar a vitelogênese no período reprodutivo corrente (Murgas et al., 2009).

A aplicação das técnicas convencionais de indução hormonal é indicada para peixes aptos para reprodução, porém que estão confinados e não possuem as condições ambientais necessárias para a reprodução e se encontram na “fase de dormência”. Nessa fase, a vitelogênese está completa nos ovócitos, sendo necessária a indução hormonal para garantir a maturação final e a desova, que consiste basicamente na migração da vesícula germinativa do centro para a periferia do ovócito, o rompimento do envelope folicular e a conseqüente liberação dos ovócitos na luz do ovário, seguido pela eliminação dos ovócitos (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Em peixes teleósteos, a ovulação e a desova tendem a ocorrer em determinadas horas do dia, por causa da influência fotoperiódica (Murgas et al., 2009). Assim, pode-se considerar que essa variável ambiental é uma das mais importantes no controle da reprodução induzida. Sabe-se, que o GtH influencia a secreção e liberação dos hormônios esteróides sexuais gonadais, sendo estes os hormônios mais importantes associados com a maturação final dos ovócitos (Matsuyama et al., 1990).

Em tambaqui (*Colossoma macropomum*), Muniz et al. (2008) comprovaram a influência fotoperiódica no processo ovulatório, quando induzido com o hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH-gonadorelina) e que o grau dessa influência pode estar condicionado aos níveis plasmáticos de esteróides sexuais no início da indução hormonal.

2.4.3 Extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC)

A utilização de EBH de peixes maduros sexualmente continua sendo a técnica mais utilizada para a indução hormonal da maturação final dos peixes migradores brasileiros. Esse é o procedimento mais antigo utilizado para a indução hormonal da desova de peixes (Ihering, 1935). A técnica é simples e está baseada na importância da gonadotropina para a regulação da fase final do processo de maturação gonadal.

A concentração máxima de gonadotropina na hipófise ocorre durante a fase final da vitelogênese e se estende por todo o período de dormência, quando se processa a coleta da hipófise de peixes doadores para aplicação nos reprodutores. Dessa forma, o hormônio aplicado atua na indução de liberação de hormônios gonadotrópicos no peixe, acrescentando os hormônios que agem no processo reprodutivo que deixou de ser processado pela ausência das condições ambientais favoráveis (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Foram obtidos resultados positivos na indução da maturação final, ovulação e/ou espermiacção de vários peixes migradores brasileiros com a utilização do extrato bruto de hipófise (Zaniboni Filho & Barbosa, 1996).

Os valores elevados das hipófises de carpa e de salmão estimularam a realização de trabalhos com a hipófise de outros animais, obtendo-se sucesso na indução à desova de peixes com hipófises de frango, pato e rã (Streit Júnior, 2002) ou da urófise de peixes (Behr et al., 2000).

Por outro lado, outros hormônios indutores de reprodução vêm sendo testados, tais como ovaprim, a gonadotropina coriônica humana (HCG), o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) e seus análogos (Arabaci et al., 2004; Rzenieniechi et al., 2004; Miranda et al., 2005).

2.4.4 Gonadorelina (aGnRH)

A gonadorelina (aGnRH) é um hormônio que tem sido utilizado na indução à reprodução de peixes (Muniz et al., 2008). O GnRH possui uma eficiência elevada na indução da maturação do gametas, da ovulação e da espermição em peixes. Por essa razão, o GnRH de mamífero e os seus análogos são efetivos para induzir a desova de várias espécies de peixes (Harvey & Carolsfeld, 1993).

A utilização desses hormônios liberadores para a indução à maturação final e desova dos peixes possui vantagens sobre o uso da gonadotropina. Eles atuam no início da cadeia hormonal e estimulam o peixe a sintetizar a sua própria gonadotropina, eliminando assim os problemas relacionados à utilização de gonadotropina de outras espécies. Além disso, essas moléculas não são espécie-específica (Harvey & Carolsfeld, 1993).

Apesar da existência de vários análogos no mercado, os mais utilizados para indução à maturação final de peixes são os análogos dos hormônios liberadores de gonadotropina de mamíferos e de salmão (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Têm sido relatados vários registros de sucesso na indução à desova de espécies migradoras de peixes brasileiros, com a utilização do mGnRH-a e sGnRH-a (Zaniboni Filho & Barbosa, 1996). No entanto, são escassos estudos verificando a influência fotoperiódica sobre a indução hormonal de lambari.

2.5 Espécie estudada

2.5.1 Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822)



FIGURA 1 Zebrafish *Danio rerio*

O zebrafish (Figura1) é uma espécie tropical de água doce proveniente da Índia oriental que atinge um comprimento máximo de cerca de 6 cm e possui hábitos alimentares onívoros. A sua dieta consiste principalmente de zooplâncton, insetos, fitoplâncton, algas filamentosas, material de plantas vasculares, esporos e ovos de invertebrados (Spence et al., 2007).

Essa espécie habita águas paradas, margens de córregos e rios e possui uma série de atributos que a tornam particularmente dócil à manipulação experimental. O zebrafish é um peixe de tamanho reduzido, robusto, que pode ser facilmente mantido em laboratório com custos reduzidos e se reproduzem o ano todo (Kimmel et al., 1995).

O zebrafish desempenha um papel fundamental em estudos do comportamento, reprodução, genética e ecotoxicologia. É considerada uma espécie padrão em ecotoxicologia, sendo recomendada pela Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômicos (OCDE) como o organismo teste em protocolos internacionais. As aplicações destas pesquisas incluem manipulações de estoques comerciais de espécies de grande valor econômico, avaliação do impacto ambiental de efluentes industriais e o estudo de doenças genéticas (Vascoto et al., 1997).

É considerado um dos modelos de organismos de vertebrados mais importantes em genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia e da biomedicina (Amsterdam & Hopkins, 2006), particularmente como um modelo de doenças humanas e para o desenvolvimento de drogas terapêuticas (Guyon et al., 2006).

Como o zebrafish é um vertebrado, a sua utilização como um organismo modelo gera resultados mais comparáveis aos seres humanos do que as espécies de invertebrados, mais distantes filogeneticamente (Barbazuk et al., 2000). Além disso, o zebrafish é mais facilmente manipulado em experimentos de genética e embriologia do que espécies de mamífero modelo, como ratos.

O zebrafish é a espécie mais utilizada nos testes de toxicidade e constitui um modelo para estabelecer as bases moleculares de estudo cronobiológicos de relógio circadiano de vertebrados, associados, por exemplo, com os ritmos de comportamento e a caracterização de mutantes (Hurd & Cahill, 2002).

Pesquisas sobre os ritmos de locomoção de zebrafish expostos às condições constantes indicam que esses parâmetros são regulados por seu relógio circadiano e que, em condições de LE (luz-escuro), essa espécie apresenta um ritmo de atividade e alimentação diurna sincronizada com os ciclos de luz:escuro (Blanco-Vives & Sánchez-Vázquez, 2009).

2.5.2 Lambari do rabo amarelo *Astyanax bimaculatus*



FIGURA 2 Lambari *Astyanax bimaculatus*

O lambari *Astyanax Bimaculatus* (Figura 2) é um peixe de pequeno porte, atingindo cerca de 20 cm de comprimento e pesando até 40 g. Apresenta hábitos alimentares onívoros, sendo uma importante espécie de peixe forrageira. O lambari move-se em cardumes e pode realizar curtas migrações ascendentes na época de cheias, o que lhe proporciona o estímulo necessário para a reprodução (Vaz et al., 2000).

Os lambaris são utilizados como iscas na pesca esportiva, como petiscos, como peixes ornamentais e como peixes larvófagos no combate às larvas de pernilongos (Sato et al., 2006).

Essa espécie tem ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo comumente denominado de lambari, piaba do rabo amarelo ou lambari do rabo amarelo. A atividade reprodutiva inicia-se a partir dos 5 cm de comprimento e, dependendo das condições ambientais, o lambari pode apresentar desova parcelada ou total (Gennari Filho & Braga, 1996). A reprodução induzida de lambari utilizando extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC 6 mg.Kg) já foi testada com resultados satisfatórios por Sato et al. (2006).

Devido ao pequeno tamanho e a fácil manipulação em laboratório, esta espécie pode ser utilizada como espécie modelo para outras espécies no emprego de novas biotecnologias. A fecundação desta espécie é externa e não há cuidado parental. O sucesso alcançado por populações dessa espécie se deve à grande gama de estratégias reprodutivas, que podem variar de acordo com as condições ambientais (Garutti, 1989). A possível influência de fatores abióticos (como fotoperíodo, temperatura e nível pluviométrico) e bióticos (disponibilidade de alimento) sobre o processo reprodutivo de lambari tem sido também avaliada.

Os lambaris possuem grande adaptabilidade a habitats diferentes e são sensíveis a mudanças em seu ambiente natural, apresentando-se como um bom bioindicador de alterações ambientais (Fernandes & Martins-Santos, 2004).

3 Referências bibliográficas

AMANO, M.; IIGO, M.; IKUTA, K.; KITAMURA, S.; YAMADA, H.; YAMAMORI, K. Roles of melatonin in gonadal maturation of underyearling precocious male masu salmon. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 120, n. 1, p. 190-197, Nov. 2000.

AMSTERDAM, A.; HOPKINS, N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 22, n. 9, p. 473-478, Sept. 2006.

ARABACI, M.; DILER, I.; SARI, M. Induction and synchronisation of ovulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by administration of emulsified buserelin (GnRHa) and its effects on egg quality. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, n. 1/4, p. 475-484, Aug. 2004.

ASCHOFF, J. **Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms**. New York: Plenum, 1981. v. 4, 156 p.

BARBAZUK, W. B.; KORF, I.; KADAVI, C.; HEYEN, J.; TATE, S.; WUN, E.; BEDELL, J. A.; MCPHERSON, J. A.; JOHNSON, S. L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, Sept. 2000.

BAYARRI, M. J.; RODRÍGUEZ, L.; ZANUY, S.; MADRID, J. A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; KAGAWA, H.; OKUZAWA, K.; CARRILLO, M. Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 136, n. 1, p. 72-81, Mar. 2004.

BEHR, E. R.; BALDISSEROTTO, B.; GARCIA-PARRA, W.; BRANDÃO, D. A.; HERKE, Z. Urophysial and pituitary extracts for spawning induction in teleosts. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 897-898, set. 2000.

BLANCO-VIVES, B.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronization to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 98, n. 3, p. 268-275, Sept. 2009.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 63-98, June 2001.

CARR, A. J.; TAMAI, T. K.; YOUNG, L.; FERRER, V.; DEKENS, M.; WHITMORE, D. Light reaches the very heart of the zebrafish clock. **Chronobiology International**, New York, v. 23, n. 1/2, p. 91-100, May 2006.

CERDÁ-REVERTER, J. M.; ZANUY, S.; CARRILLO, M.; MADRID, J. A. Time-course studies on plasma glucose, insulin, and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 64, n. 3, p. 245-250, June 1998.

CLARK, D. S.; GREEN, J. M. Activity and movement patterns of juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua*, in Conception Bay, Newfoundland, as determined by sonic telemetry. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 68, n. 7, p. 1434-1442, 1990.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, London, v. 69, n. 5, p. 1504-1512, Nov. 2006.

FAÇANHA, M. F.; GOMES, L. C. A eficácia do mentol como anestésico para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characiformes: Characidae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 1, p. 71-75, jan. 2005.

FALCÓN, J.; BESSEAU, L.; SAUZET, S.; BOEF, G. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 18, n. 2, p. 81-88, Mar. 2007.

FERNANDES, C. A.; MARTINS-SANTOS, I. C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, Lund, v. 141, n. 3, p. 328-332, Dec. 2004.

GARUTTI, V. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* em cursos de água da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 114-120, 1989.

GENNARI FILHO, O.; BRAGA, F. M. S. Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *A. schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP). **Revista Unimar**, Maringá, v. 18, n. 2, p. 241-254, jul. 1996.

GUYON, J. R.; STEFFEN, L. S.; HOWELL, M. H.; PUSACK, T. J.; LAWRENCE, C.; KUNKEL, L. M. Modeling human muscle disease in zebrafish. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1772, n. 2, p. 205-215, Feb. 2006.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture**. Ottawa: IDRC, 1993. 144 p.

HERRERO, M. J.; MADRID, J. A.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Entrainment to Light of Circadian Activity Rhythms in Tench (*Tinca tinca*). **Chronobiology International**, New York, v. 20, n. 6, p. 1001-1017, Dec. 2003.

HOLLOWAY, A. C.; KEENE, J. L.; NOAKES, D. G.; MOCCIA, R. D. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1025-1030, Sept. 2004.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136-1142, Apr. 2004.

HURD, M. W.; CAHILL, G. M. Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. **Journal of Biological Rhythms**, New York, v. 17, n. 4, p. 307-314, Aug. 2002.

IHERING, R. V. Die wirkung von hypophyseinjektion auf den laichakt von fischen. **Zoologischer Anzeiger**, Jena, v. 111, p. 273-279, 1935.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, July 1995.

KING, W. V.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S. The use of clove oil, metomidate, tricaine, methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 14, p. 1442-1449, Oct. 2005.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. 89 p.

MÁCOVÁ, S.; DOLEZELOVÁ, P.; PISTEKOVÁ, V.; SVOBODOVÁ, Z.; BEDÁNOVÁ, I.; VOŠLÁROVÁ, E. Comparison of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*. **Neuro Endocrinology Letters**, Weinheim, v. 29, n. 5, p. 680-684, Oct. 2008.

MATSUYAMA, M.; YOSHIHIDE, H.; MATSUURA, S. Effects of steroids on germinal vesicle breakdown in vitro of intact follicles in the Japanese whiting, *Sillago japonica*, a marine teleost. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Physiology, New York, v. 96, n. 2, p. 257-261, 1990.

MIRANDA, L. A.; CASSARÁ, M. C.; SOMOZA, G. M. Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 15, p. 1473-1479, Nov. 2005.

MUNIZ, J. A. S. M.; CATANHO, M. T. J. A.; SANTOS, A. J. G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 205-211, 2008.

MURGAS, L. D. S.; DRUMOND, M. M.; PEREIRA, G. J. M.; FELIZARDO, V. O. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. p. 74-80.

OLIVEIRA, C. C. V. **Ritmos de reproducción en el lenguado senegalés: papel del órgano pineal y la melatonina como transductores de los ciclos ambientales diarios, lunares y estacionales**. 2009. 204 p. Thesis (Doctor Animal Physiology) - Universidad of Murcia, Murcia.

OLIVEIRA, C.; GARCIA, E. M.; LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; Daily and circadian melatonin release *in vitro* by the pineal organ of two nocturnal teleost species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. Molecular and Integrative Physiology, New York, v. 153, n. 3, p. 297-302, July 2009.

OYAKAMA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K. C.; NOLASCO, J. C. **Peixes de riachos da Mata Atlântica nas unidades de conservação do vale do rio Ribeira de Iguape no estado de São Paulo**. São Paulo: Neotrópica. 2006. 201 p.

PALIĆ, D.; HEROLT, D. M.; ANDREASEN, C. B.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 254, n. 1/4, p. 675-685, Apr. 2006.

PARK, M. O.; HUR, W. J.; IM, S. Y.; SEOL, D. W.; LEE, J.; PARK, I. S. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 877-884, June 2008.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Whashington: Hemisphere, 1985. 156 p.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 176 p.

RZEMIENIECKI, A.; STORESR, T. I.; SPRANDO, R. L. Induced spermiation in 3-year-old sterlet, *Acipenser ruthenus* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 144-151, Jan. 2004.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. U.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 267-273, mar. 2006.

SERVILI, A.; HERRERA, P.; MUÑOZ-CUETO, J. A.; LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Interaction between gonadotrophin-releasing-hormone and melatoninerpic systems in the European sea bass. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 151, n. 1, p. 206-212, 2008.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of methomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1/4, p. 177-185, Mar. 2003.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 83, n. 1, p. 13-34, Feb. 2007.

STREIT JÚNIOR, D. P. **Extrato de hipófise de frango e de coelho como indutores gonadais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) macho e fêmea, em comparação com o extrato de hipófise de carpa**. 2002. 36 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

VASCOTTO, S. G.; BECKHAM, Y.; KELLY, G. M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 75, n. 5, p. 479-485, Oct. 1997.

VAZ, M. M.; BARBOSA, N. D. de C.; TORQUATO, V. C. **Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

VELISEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio*). **Veterinary Medicine**, Czech, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

VELÍŠEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L.; ZIOMEK, E. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria** Brno, v. 75, n. 1, p. 99-106, Mar. 2006.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress response, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, n. 1/4, p. 353-366, Aug. 2002.

WALSH, C. T.; PEASE, B. C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 627-635, July 2002.

WEBER, R. A.; PELETEIRO, J. B.; LO, G. M.; ALDEGUNDE, M. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 1/2, p. 147-150, Mar. 2009.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 2, p. 340-347, Feb. 2002.

ZANIBONI FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 4, p. 655-659, out. 1996.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

CAPÍTULO 2

Influência do fotoperíodo no efeito anestésico e na toxicidade de eugenol em zebrafish (*Danio rerio*)

O capítulo 2 foi transcrito em formato de artigo e será encaminhado para submissão na Revista Brasileira de Zootecnia

Viviane de Oliveira Felizardo¹, Luisa Maria Vera², Francisco Javier Sanchez Vázquez², Luis David Solis Murgas^{1*}

1 – Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG 37200-000 Brasil.

2 – Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Biologia da Universidade de Murcia, Murcia, Espanha.

* Autor para correspondência: tel: (35) 3829 1728, fax: (35) 3829 1715,
E-mail: lsmurgas@ufla.br

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de auxílios para a realização deste trabalho.

1 Resumo

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência do fotoperíodo no efeito anestésico e na toxicidade de eugenol em zebrafish (*Danio rerio*). Adultos de zebrafish foram mantidos a um fotoperíodo de 12:12 Luz:Escuro (L:E). Foi realizado o registro da atividade do peixe quando exposto em eugenol nos períodos metade de luz (ML) e metade do escuro (ME). Foi realizado um teste de toxicidade preliminar, onde foi determinada a concentração (45 mg.L) que causou sedação nos exemplares sem que houvesse ocorrência de morte, nos peixes expostos. Para o teste de toxicidade, 480 peixes foram expostos a diferentes concentrações de eugenol (45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 200 mg.L). Os exemplares foram expostos ao eugenol por 15 minutos, sendo em seguida transferidos para aquários contendo água limpa, para posterior período de 1 hora de recuperação onde foi avaliada a taxa de mortalidade (%). Para o cálculo da CL50 em ML e ME foi utilizado o programa Sigma plot. As análises de vídeo da atividade motora dos peixes expostos ao anestésico foram realizadas no programa Fish Tracker v1.1. A toxicidade do eugenol é maior quando os peixes são expostos no período ML do que no ME, sendo a CL50 de 70, 26 e 104, 94 mg de eugenol por litro em ML e ME, respectivamente. Pode-se concluir com os resultados obtidos com zebrafish, em condições constantes de temperatura, oxigênio e fotoperíodo (12:12 luz:escuro), a CL50 é influenciada pelo período de aplicação (luz ou escuro).

Palavras-chave: óleo de cravo, peixes, ritmo biológico

2 Abstract

This work was carried out to verify the influence of photoperiod on the anesthetic effect and toxicity of eugenol in zebrafish (*Danio rerio*). Adult zebrafish were kept at a photoperiod of 12:12 light:dark (L:D). Was recorded when the activity of fish exposed to eugenol in periods of mid-light (ML) and mid-dark (MD). Was conducted a preliminary toxicity test, where concentration was determined (45 mg.L) which caused sedation in specimens with no occurrence of death in fish exposed. For the toxicity test, a total of 480 fish were exposed to different concentrations of eugenol (45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 and 200 mg.L). The specimens were exposed to eugenol for 15 minutes, and then transferred to aquaria containing clean water for further 1 hour period of recovery was assessed where the mortality rate (%). To calculate the LC50 ML and MD was used Spearman-Kärber program. Analyses of video motor activity of fish exposed to the anesthetic was performed in the program Fish Tracker v1.1. The efficiency of eugenol varied with the exposure time (ML or MD). The

LC50 was 70.26 ± 3.06 mg.L in fish exposed to ML and 104.94 ± 5.4 mg.L in MD. In zebrafish is the influence of photoperiod on the response of zebrafish exposed to eugenol. Can be concluded with the results obtained with zebrafish in constant conditions of temperature, oxygen and photoperiod (12:12 light: dark), the LC50 is influenced by the period of application (light or dark).

Keywords: biological rhythm, clove oil, fish,

3 Introdução

O zebrafish é uma espécie muito utilizada nos testes de toxicidade (Grush et al., 2004), se constituindo um modelo útil para estabelecer as bases moleculares em estudos cronobiológicos de relógio circadiano de vertebrados, nos quais estão sendo muito estudados os ritmos de comportamento (Hurd & Cahill, 2002). Quando exposta a condições constantes, esta espécie demonstra que está sendo regulada por seu relógio circadiano e que, em condições de LE (luz-escuro), apresenta um ritmo diurno da atividade locomotora (Blanco-Vives & Sánchez-Vázquez, 2009).

Durante o manuseio em algumas práticas de pesquisa, os peixes são expostos a uma variedade de fatores estressantes (Barton, 2000), podendo causar mudanças comportamentais e fisiológicas que podem gerar resultados insatisfatórios dos experimentos. Visando amenizar a intensidade do estresse destas atividades, o uso de anestésicos tem sido empregado.

Como cada anestésico induz o estágio de anestesia desejado em uma concentração diferente (Roubach et al., 2001), um estudo toxicológico deve ser realizado para estabelecer limites de concentrações aceitáveis e verificar os efeitos tóxicos do sedativo sobre os animais testados.

Anestésicos como o metanossulfonato de tricaina (MS-222), o sulfato de quinaldina, a benzocaína, o óleo de cravo (eugenol) e o fenoxietanol, têm sido utilizados nas pisciculturas (Inoue et al., 2003).

Como uma alternativa ao uso de anestésicos agressivos e residuais, pesquisas com anestésicos de fontes naturais como o eugenol têm demonstrado que esses compostos apresentam vantagens para a anestesia de peixes (Velisek et al., 2006; Weber et al., 2009). Além de ser um produto natural, o eugenol apresenta baixo custo, elevada disponibilidade, ampla margem de segurança para o peixe e baixa toxicidade para o operador, sendo metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo tempo de carência para ser consumido (Wagner et al., 2002). No entanto, dados relatando a influência do fotoperíodo no efeito da exposição ao eugenol em peixes são escassos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do fotoperíodo no efeito anestésico e na toxicidade de eugenol em zebrafish.

4 Material e métodos

4.1 Animais

Exemplares de zebrafish adultos com peso e comprimento de $27,7 \pm 5,31$ mg e $33,5 \pm 3,24$ mm, adquiridos em loja comercial, foram utilizados nos experimentos. Os peixes foram transportados para o laboratório de Fisiologia Animal da Universidade de Murcia-Espanha e alojados em aquários, com recirculação de água e temperatura controlada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$). Os exemplares foram aclimatados às condições laboratoriais durante 7 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em uma densidade de dois peixes/litro e a um fotoperíodo de 12:12 luz:escuro (LE) com iluminação artificial. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia “*ad libitum*”, com ração comercial (Tropical NUTRON Hi-Fi). Contudo, antes da realização dos experimentos, os peixes permaneceram em jejum por um período de 24 horas.

4.2 Atividade motora diária

O registro da atividade dos peixes foi realizado para comprovar o ritmo diário diurno apresentado pela espécie (Blanco-Vives & Sanchez-Vázquez, 2009) através de uma fotocélula infravermelha (Omron, modelo E3S-AD62, Japão) localizada na porção exterior mediana dos aquários. As fotocélulas eram ativadas pela movimentação dos peixes, sendo, então, enviado um sinal ao computador que fazia o registro. Após 17 dias, os dados registrados foram analisados pelo programa El Temps (v.1, 179 by Dr. Díez Noguera, Barcelona).

4.3 Teste de toxicidade preliminar

Foram utilizados 48 peixes expostos em 6 diferentes concentrações (0, 30, 40, 45, 50 e 70 mg.L) de eugenol, onde se determinou a concentração de eugenol que causou a sedação sem causar morte dos exemplares. Para cada concentração foram utilizados 8 exemplares; e aquários de 1,5 litros, colocados previamente dentro de um aquário de 100 litros, contendo água com temperatura constante ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$).

As exposições dos peixes às diferentes concentrações de anestésicos foram realizadas na metade do período de luz (ML) e na metade do período de escuro (ME). Para o preparo da solução estoque, o eugenol foi previamente diluído em etanol na proporção de 1:9 (óleo de cravo:etanol), antes de ser dissolvido na água. Os peixes foram expostos ao anestésico por um período de quinze minutos, sendo retirados e em seguida transferidos para aquários com água sem anestésico e expostos às mesmas condições dos aquários experimentais durante um período de recuperação de uma hora. Após este período foram registradas as taxas de mortalidade percentual dos peixes.

A água utilizada nos aquários de anestesia e destinada à recuperação foi mantida sob temperatura e oxigenação controladas.

4.4 Teste de toxicidade: Concentração letal (CL50) em ML e ME

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições descritas no item acima. Foram utilizadas 10 concentrações diferentes de eugenol (45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 e 200 mg.L). Para cada concentração foram utilizados oito peixes por aquário e seis réplicas para cada concentração, totalizando 480 peixes.

Os dados de mortalidade foram ajustados em função das concentrações testadas através de um modelo logístico, utilizando o programa sigma plot 10.0 (Systat products, Alemanha). A concentração letal média (CL 50), ou seja, a concentração de eugenol que mata 50% dos exemplares expostos, em ML e ME foi comparada pelo Spearman-Karber test com intervalo de confiança de 95%.

4.5 Atividade motora de zebrafish exposto ao anestésico

As análises da atividade de zebrafish expostos ao anestésico foram realizadas dentro de uma câmara, em aquário de 8 litros dividido em sete blocos, sendo distribuído 1 peixe por bloco. A temperatura da água foi mantida a 27 ± 1 °C, sendo os animais mantidos em jejum por um período de 24 horas antes da realização dos experimentos.

A filmagem foi realizada por um período de noventa minutos, sendo um tempo de trinta minutos antes da exposição ao anestésico eugenol. Os peixes ficaram expostos ao anestésico (45 mg.L, determinada no teste preliminar) por um período de quinze minutos, após este tempo foi realizada uma troca por água sem anestésico. Os registros foram realizados por mais quarenta e cinco minutos, durante o período de recuperação dos peixes.

Para as gravações diurnas foi utilizada iluminação com lâmpadas fluorescentes e a iluminação noturna foi feita com luzes infra-vermelhas, localizadas na partes superior e inferior dos aquários. As filmagens foram realizadas com uma câmera digital de vídeo, com opção Nightshot plus, que

permite gravações em ausência de luz visível, instalada na frente dos aquários. A filmagem de um grupo sem a exposição ao anestésico foi utilizada como controle.

As análises das atividades de cada exemplar foram realizadas através do programa Fish Tracker v1.1 (Universidade de Murcia, Espanha). Este programa avalia individualmente cada peixe, gerando um gráfico com a média dos 7 peixes. Foi verificada a atividade de natação vertical e horizontal. Através da análise do vídeo foi possível verificar o tempo gasto para que o anestésico fizesse efeito e o tempo necessário para recuperação após a troca de água foi registrado.

5 Resultados e discussão

5.1 Ritmo diário da atividade motora

Foi comprovado que os exemplares de zebrafish que foram utilizados neste experimento apresentavam ritmo diurno da atividade motora (Figura 1), observação esta, que já foi relatada por Blanco-Vives & Sánchez-Vázquez (2009). A comprovação da atividade diária destes exemplares é uma importante ferramenta, quando se deseja trabalhar com animais em condições constantes, visto que se torna possível verificar o sincronismo do animal com as condições disponíveis.

Dentre os fatores ambientais que controlam os ritmos circadianos, a luz é um dos mais importantes, particularmente a mudança entre luz e escuro (ciclo LE), que afeta diretamente as oscilações circadianas moleculares (Carr et al., 2006; Ziv & Gothilf, 2006).

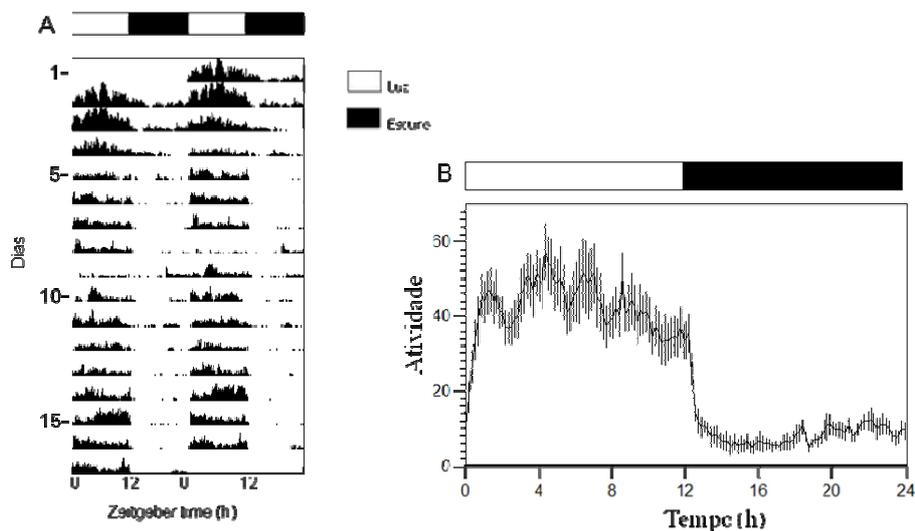


FIGURA 1A Ectograma da atividade locomotora diária, B atividade motora de *Danio rerio* (n=40) expostos a fotoperíodo de 12:12 L:E. As barras brancas e pretas na parte superior dos gráficos indicam, respectivamente, os períodos de luz e de escuro.

5.2 Curva de mortalidade em ML e ME

Verificou-se que as concentrações de eugenol utilizadas foram eficientes no processo de anestesia dos exemplares expostos em ML e ME. No entanto, no período de ML, os peixes adormeciam em um tempo menor em relação a ME (Figura 2). Resultados que sugeriram uma possível influência do período do dia em que os peixes são expostos sobre os efeitos sedativos do eugenol. Na literatura não há relatos da influência do fotoperíodo no efeito da anestesia. Porém, há relatos de alguns fatores que podem influenciar no efeito do anestésico, como a concentração do anestésico, temperatura da água e tamanho e espécie de peixe (Hamackova et al., 2004; Myszkowski et al., 2003).

A maior toxicidade dos peixes que foram expostos ao anestésico em ML, em relação aos peixes expostos às mesmas concentrações em ME foi

comprovada pela concentração letal média (CL50), que foi menor em peixes expostos em ML ($70,26 \pm 3,06$ mg.L) que em ME ($104,94 \pm 5,4$ mg.L). Estes resultados sugerem que a CL50 em zebrafish expostos ao eugenol é influenciada pelo fotoperíodo.

A CL50 encontrada para zebrafish expostos em eugenol-ML é superior aos valores obtidos por Mácová et al. (2008) e Grush et al. (2004) em experimentos com a mesma espécie expostos ao mesmo anestésico. Esses autores relatam uma CL50 de $18,8 \pm 5,52$ e 21 mg.L, respectivamente com um tempo de exposição de 96 horas. Essa diferença nos valores de CL50 entre os trabalhos pode estar associada com o tempo de exposição ao anestésico adotado (Velisek et al., 2006), que neste trabalho foi inferior (15 minutos) ao utilizado por estes autores.

A maior toxicidade do anestésico em ML pode estar relacionada com o metabolismo do peixe, que se mostra mais ativo durante o dia, fato este, que requer um maior gasto de energia. Quando os peixes são expostos ao eugenol ocorre redução dos movimentos respiratórios e dos batimentos cardíacos através de uma ação direta do sedativo no sistema nervoso central (Iggo & Klemm, 1996), causando conseqüentemente um bloqueio da atividade do peixe. O organismo do peixe, ao tentar manter a sua homeostase, consome mais energia, o que induzirá o aumento da secreção de catecolaminas e cortisol (Pickering, 1993) causando um desgaste excessivo e podendo levar o animal à morte.

Por outro lado, os peixes no período de ME podem apresentar metabolismo mais baixo, devido à atividade reduzida durante a noite, sugerindo que, nesse período, o esforço do organismo para manter a homeostase é menor e, conseqüentemente, diminuindo o estresse.

A diferente forma de resposta dos peixes após a exposição ao eugenol nos períodos de ML e ME, nos leva a sugerir que alguns fenômenos biológicos desta espécie podem ser regulados por fatores endócrinos como a melatonina. A

melatonina é o principal hormônio regulador dos ritmos biológicos em peixes. Este hormônio é produzido na pineal, que é o órgão-chave do sistema circadiano de vertebrados e é responsável por traduzir estímulos ambientais (como LE) em estímulos hormonais. A melatonina é produzida em alta quantidade durante o período de escuro e é imediatamente lançada na corrente sanguínea (Falcón et al., 2007).

Por outro lado, a exposição do peixe ao eugenol pode agir sobre os níveis de hormônios relacionados à resposta ao estresse. Foi observado por Holloway et al. (2004) o efeito do uso de eugenol sobre os níveis de cortisol e glicose no sangue de truta arco-íris expostos aos anestésicos por um período de 2 minutos. No entanto, em peixes que sofreram eutanásia (10 min.), os níveis de cortisol diminuíram e os hormônios triiodotironina (T3) e tirosina (T4) se elevaram. Em truta arco-íris, Davidson et al. (2000) também relatam um aumento significativo nos níveis de cortisol e hematócrito e uma diminuição na concentração de potássio, após a exposição em eugenol.

A resposta à exposição ao anestésico pode também ser influenciada por fatores biológicos, tal como estresse, condições do indivíduo e espessura da pele (Walsh & Pease, 2002). Os peixes podem se apresentar mais estressados durante o período diurno, visto que os níveis de cortisol podem apresentar um pico de liberação durante o dia, como observado na truta arco-íris (Reddy & Leatherland, 2003).

A concentração de eugenol que foi letal para pelo menos um exemplar em ML foi 50 mg.L, enquanto que em ME esta concentração foi 70 mg.L. Já a dose mínima utilizada em ML que matou 100% dos peixes expostos em eugenol foi de 120 e 200 mg.L em ME (Figura 2). Um modelo logístico foi utilizado para fazer ajuste dos dados através do programa Sigma Plot v. 10.0.

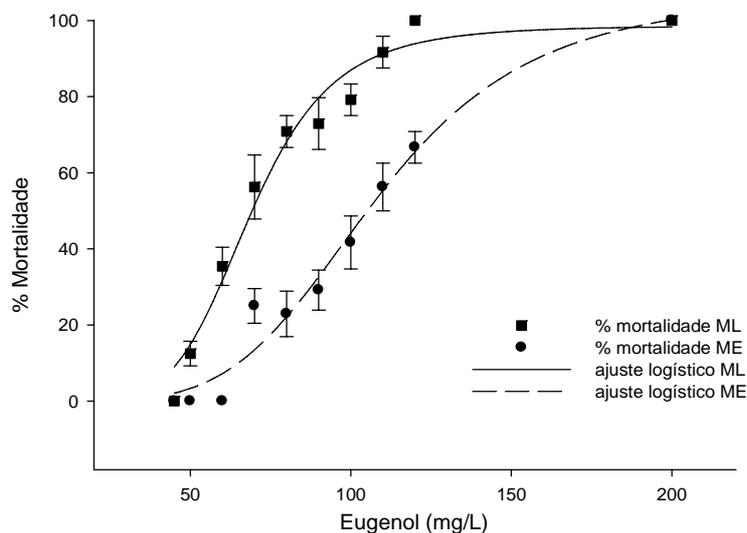


FIGURA 2 Curva de mortalidade de *Danio rerio* (n = 48), exposto ao eugenol durante 15 minutos em ML (quadrados) e ME (círculos).

5.3 Efeito subletal de eugenol

Durante a exposição dos peixes ao eugenol em ML, foi observada uma diminuição brusca da atividade dos exemplares após 3 minutos de exposição ao anestésico (Figuras 4 C e 5 C). O tempo para sedação dos peixes expostos ao eugenol em ML verificado com o uso de 45 mg.L também é relatado para salmão exposto com o mesmo anestésico (Woody et al., 2002). Segundo esses autores, o tempo de sedação é um dos parâmetros que indicam a eficiência do anestésico.

No entanto, quando observamos o tempo gasto para que o peixe ficasse imobilizado em ME (13 min.), podemos sugerir que esta concentração não foi eficiente, de acordo com Cunha & Rosa (2006) que afirmaram que a concentração ideal deve proporcionar completa sedação em até 3 min. Esta

diferença no tempo de sedação dos peixes expostos em ML e ME comprovam a maior eficácia do anestésico em ML.

A recuperação dos exemplares de zebrafish expostos ao eugenol em ML ocorreu aproximadamente 3 minutos após a troca da água do aquário, observando-se um aumento da atividade em comparação com período pré-anestesia. Cerca de 30 minutos após a exposição dos peixes à água limpa, a sua atividade se estabilizou, voltando aos valores basais.

Por outro lado, os peixes que foram expostos no período de ME, testados se recuperaram imediatamente após serem colocados em água limpa (Figuras 4 D e 5 D). Neste caso, a atividade após a troca de água também foi maior que o período pré-anestesia, mas se estabilizou após 20 minutos na água sem sedativo. A diferença no tempo de recuperação dos peixes em ML e ME, pode ser devido à maior eficácia do eugenol apresentada durante o dia, visto que, os peixes entram em sedação em um tempo menor e permanecem sedados por um tempo maior em relação ao período de escuro.

O tempo de recuperação observado em ambos os períodos de exposição está dentro dos limites citados por outros autores para o anestésico em outras espécies, como em *Silurus glanis* (Velisek et al., 2006), onde apresentou recuperação após 30 minutos.

Foi possível verificar uma hiperatividade nos peixes logo após o início da exposição ao anestésico, na atividade natatória vertical (Figura 4 C e D). Este comportamento também é observado logo após a transferência dos animais para água sem anestésico, sendo que este comportamento foi observado tanto em ML como em ME, na atividade natatória vertical (Figura 4 C e D) e na horizontal (Figura 5 C e D). A hiperatividade dos peixes logo após a exposição aos anestésicos é relatada como um primeiro comportamento de agitação observado em um animal submetido à anestesia geral, tendo sido observada no próprio zebrafish (Grush et al., 2004), e em *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*

(Mylonas et al., 2005) expostos ao eugenol. Este comportamento é uma reação de sobrevivência do peixe, em que ele investe toda sua energia para tentar manter-se vivo.

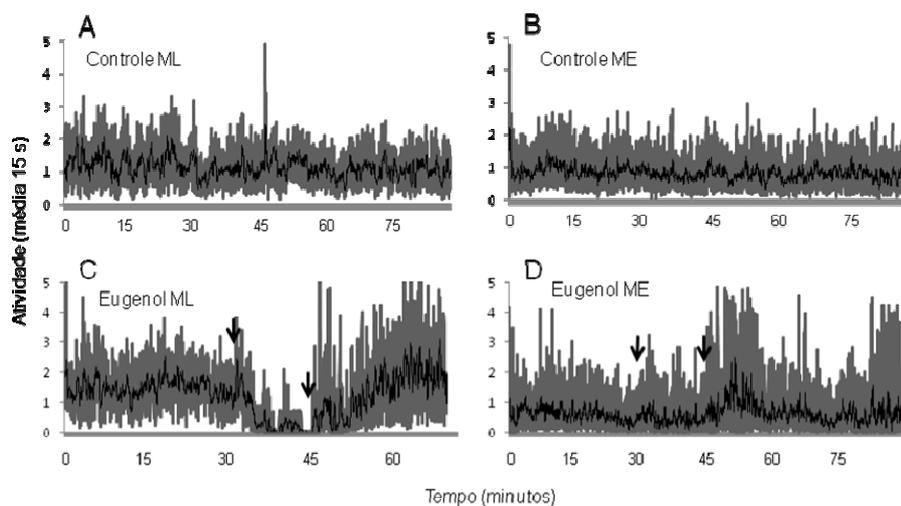


FIGURA 4 Atividade natatória vertical de *Danio rerio* (n = 7). A e B controle ML e ME, respectivamente. C e D Exemplares expostos em eugenol (45 mg.L) em ML e ME, respectivamente. As setas pretas indicam o início e fim da exposição ao anestésico.

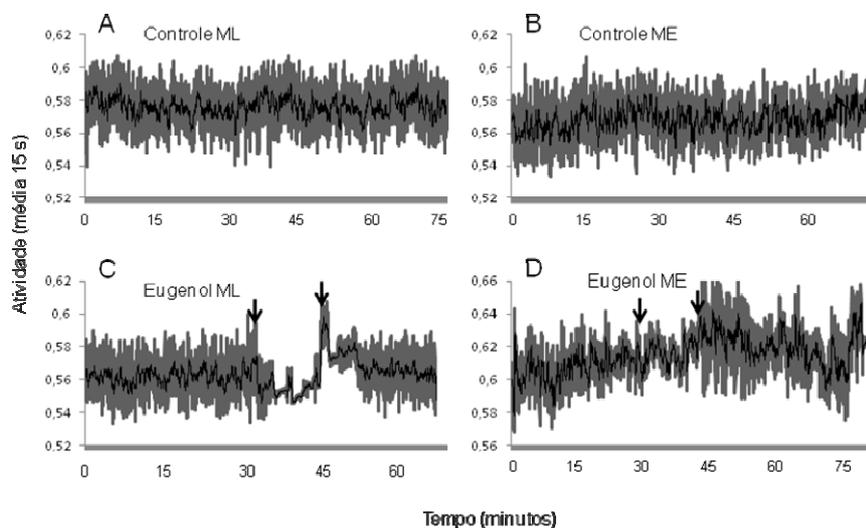


FIGURA 5 Atividade natatória horizontal de *Danio rerio* (n = 7). A e B controle em ML e ME, respectivamente. C e D expostos ao eugenol (45 mg.L), em ML e MD, respectivamente. As setas pretas indicam início e fim do período de exposição ao anestésico.

Pode-se concluir, com os resultados obtidos com zebrafish em condições constantes de temperatura, oxigênio e fotoperíodo (12:12 luz:escuro), que a CL50 é influenciada pelo período de aplicação (luz ou escuro). A toxicidade do eugenol é maior quando os peixes são expostos no período ML do que no ME, sendo a CL50 de 70, 26 e 104, 94 mg de eugenol por litro em ML e ME, respectivamente.

6 Referências bibliográficas

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 62, n. 1, p. 12-18, Jan. 2000.

BLANCO-VIVES, B.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronization to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 98, n. 3, p. 268-275, Sept. 2009.

CARR, A. J.; TAMAI, T. K.; YOUNG, L.; FERRER, V.; DEKENS, M.; WHITMORE, D. Light reaches the very heart of the zebrafish clock. **Chronobiology International**, New York, v. 23, n. 1/2, p. 91-100, May 2006.

CUNHA, F. E. A.; ROSA, I. L. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. **Journal of Fish Biology**, London, v. 69, n. 5, p. 1504-1512, Nov. 2006.

DAVIDSON, G. W.; DAVIE, P. S.; YOUNG, G. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUISTM. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 31, n. 1, p. 105-114, Mar. 2000.

FALCÓN, J.; BESSEAU, L.; SAUZET, S.; BOEF, G. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 18, n. 2, p. 81-88, Mar. 2007.

GRUSH, J.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). **Zebrafish**, New Rochele, v. 1, n. 1, p. 46-53, 2004.

HAMACKOVA, J.; LEPICOVA, A.; KOZAK, P. The efficacy of various anaesthetics in tench (*Tinca tinca* L.) related to water temperature. **Veterinary Medicine**, Czech, v. 49, n. 12, p. 467-472, 2004.

HOLLOWAY, A. C.; KEENE, J. L.; NOAKES, D. G.; MOCCIA, R. D. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 1025-1030, Sept. 2004.

HURD, M. W.; CAHILL, G. M. Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. **Journal of Biological Rhythms**, New York, v. 17, n. 4, p. 307-314, Aug. 2002.

IGGO, A.; KLEMM, W. R. Nervos, sinapses e reflexos. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 699-713.

INOUE, L. A. K. A.; OLIVEIRA, R.; VASCONCELOS, E. Clove oil anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 943-947, set./out. 2003.

MÁCOVÁ, S.; DOLEZELOVÁ, P.; PISTEKOVÁ, V.; SVOBODOVÁ, Z.; BEDÁNOVÁ, I.; VOŠLÁROVÁ, E. Comparasion of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*. **Neuro Endocrinology Letters**, Weinheim, v. 29, n. 5, p. 680-684, Oct. 2008.

MIRANDA, L. A.; CASSARÁ, M. C.; SOMOZA, G. M. Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 15, p. 1473-1479, Nov. 2005.

MYLONAS, C. C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 432-438, May 2005.

MYSZKOWSKI, B. L.; KAMINSKI, R.; WOLNICKI, J. Response of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) to the anaesthetic 2-phenoxyethanol. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 142-145, Feb. 2003.

PICKERING, A. D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 111, n. 3, p. 51-63, Apr. 1993.

REDDY, P. K.; LEATHERLAND, J. F. Influences of photoperiod and alternate days of feeding on plasma growth hormone and thyroid hormone levels in juvenile rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 1, p. 197-212, July 2003.

ROUBACH, R.; GOMES, L.; VAL, A. Safest level of tricaine methanesulfonate (MS 222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã *Brycon cephalus*. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 31, n. 1, p. 159-163, mar. 2001.

VELÍŠEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ, Z.; NOVOTNÝ, L.; ZIOMEK, E. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). **Acta Veterinaria**, Brno, v. 75, n. 1, p. 99-106, Mar. 2006.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress response, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, n. 1/4, p. 353-366, Aug. 2002.

WALSH, C. T.; PEASE, B. C. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 627-635, July 2002.

WEBER, R. A.; PELETEIRO, J. B.; LO, G. M.; ALDEGUNDE, M. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 288, n. 1/2, p. 147-150, Mar. 2009.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, n. 2, p. 340-347, Feb. 2002.

ZIV, L.; GOTHILF, Y. Expression pattern and its role in the development of the pineal circadian clock in zebrafish. **Chronobiology International**, New York, v. 23, n. 1/2, p. 101-112, May 2006.

CAPÍTULO 3

Influência do fotoperíodo na atividade reprodutiva de Lambari (*Astyanax bimaculatus*) induzido hormonalmente

O capítulo 3 foi transcrito em formato de artigo e será encaminhado para
submissão ao periódico científico “Arquivos Brasileiro de Veterinária e
Zootecnia”

Viviane de Oliveira Felizardo¹, Estefânia de Souza Andrade¹, Pablo Andrés
López², Rilke Tadeu Fonseca de Freitas³, Luis David Solis Murgas^{1*}

1 – Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras,
Lavras, MG 37200-000 Brasil.

2 – Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Nacional de Rosário
(FCV-UNR), CP 2170. Santa Fe, Argentina.

3 - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

* Autor para correspondência: tel: (35) 3829 1728, fax: (35) 3829 1715,
E-mail: lsmurgas@ufla.br

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior) pela concessão de auxílios para a realização deste trabalho.

1 Resumo

O fotoperíodo desempenha um papel crucial no sincronismo da reprodução sazonal de peixes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do fotoperíodo na atividade reprodutiva de fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) induzidas hormonalmente com gonadorelina e extrato bruto hormonal de carpa (EBHC) e verificar o ritmo diário de atividade motora desta espécie. Os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia Animal no Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Lavras (UFLA). As fêmeas de lambari (n=44) foram selecionadas, pesadas e foi registrado o comprimento total e padrão. Posteriormente, os peixes foram expostos a um fotoperíodo de 12:12 luz:escuro (LE) e, após 10 dias de aclimatização, os animais foram induzidos hormonalmente com dose única de EBHC (6 mg.kg) e gonadorelina (80 µg.kg) durante o período de metade de luz (ML) e metade de escuro (ME). Após a ovulação, os peixes foram sacrificados, sendo pesadas as gônadas e o fígado, para cálculo de índice gonadossomático (IGS) e índice hepatossomático (IHS), respectivamente. A fecundidade absoluta (FA) e a fecundidade absoluta relativa para o peso (FARP) e para o comprimento (FARC) dos exemplares foram calculadas, assim como o diâmetro dos ovócitos (µm) e a porcentagem de posição periférica da vesícula germinativa (PPVG %). A ovulação foi calculada em horas graus. Foi registrada a atividade diária dos lambaris, mediante a utilização de uma fotocélula. Os dados foram analisados por ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Observou-se que o lambari apresenta ritmo de atividade motora crepuscular. Fêmeas induzidas com EBHC durante ML demoraram mais tempo para ovular do que aquelas submetidas aos demais tratamentos. Fêmeas induzidas em ML, independente do hormônio utilizado, apresentaram maior FARP em relação ao grupo induzido em ME. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) em relação ao período de aplicação. A aplicação hormonal de EBHC (6 mg.kg) e gonadorelina (80 µg.kg) em período de ML e ME induzem a reprodução em lambari. Na aplicação realizada em ML, os animais que receberam o EBHC apresentaram maior ($P<0,05$) porcentagem de ovócitos com PPVG em relação ao uso de gonadorelina. A gonadorelina pode ser utilizada como hormônio alternativo para a indução hormonal de lambari.

Palavras-chave: EBHC, gonadorelina, ovócitos, ritmo diário

2 Abstract

The photoperiod plays a crucial role in the timing of seasonal reproduction of fish. This study aimed to evaluate the influence of photoperiod on reproductive activity of females of lambari (*Astyanax bimaculatus*) hormonally induced with gonadorelin and crude extract of carp pituitary (CECP) and check the daily rhythm of motor activity of this species. The experiments were performed in the laboratory of Animal Physiology at the Department of Veterinary Medicine - Federal University of Lavras (UFLA). The females of lambari (n=44) were selected, weighed and recorded the total length and pattern. Subsequently, fish were exposed to a photoperiod of 12:12 light:dark (LD) and after 10 days of acclimatization, the animals were hormonally induced with a single dose CECP (6 µg.kg) and gonadorelin (80 mg.kg) during the mid-light (ML) and mid-dark (MD). After ovulation, the fish were killed, and weighed the gonads and liver, for calculation of gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI), respectively. Absolute fecundity (AF), the absolute fecundity relative to weight (AFRW) and length (AFRL) of the specimens were calculated, and the oocyte diameter (µm) and percentage of peripheral position of the germinal vesicle (PPGV%) . Ovulation was calculated in hours degrees. Activity was recorded daily smelt through the use of a photocell. Data were analyzed by ANOVA and means were compared by the Tukey test at 5%. It was observed that the lambari presents rhythm of motor activity twilight. Females with induced during CECP in ML took longer to ovulate than those subjected to other treatments. In females induced in ML, regardless of hormone use had higher AFRW for the group induced on MD. Other parameters showed no significant differences ($P>0.05$) over the period of operation. The use of hormonal CECP (6 mg.kg) and gonadorelin (80 µg.kg) in ML and ME period induce breeding lambari. In the application performed in ML, the animals that received CECP had higher ($P<0.05$) percentage of oocytes with PPGV regarding the use of gonadorelin. The hormone Gonadorelin can be used as an alternative to hormonal induction of lambari.

Key words: CECP, daily rhythm, gonadorelin, oocytes,

3 Introdução

Os ritmos biológicos diários que se encontram associados a oscilações ambientais com uma periodicidade de 24 horas se denominam circadianos, que

define o ciclo de luz e escuro. O ciclo de luz e a temperatura têm um papel crucial em ritmos estacionais, como a reprodução de peixes (Bromage et al., 2001; Clark et al., 2005).

Em peixes teleósteos, a ovulação e a desova tendem a ocorrer em determinadas horas do dia, por causa da influência fotoperiódica (Sherwood et al., 1983). Assim, pode-se considerar essa variável ambiental como sendo uma das mais importantes no controle da reprodução induzida. Por outro lado, os picos da gonadotropina maturacional plasmática (GtHm) entre espécies de peixes variam de acordo com a hora do dia. Este hormônio é responsável por atuar na maturação final do ovócito para posterior liberação.

Muniz et al. (2008) comprovaram a influência fotoperiódica no processo ovulatório de tambaqui (*Colossoma macropomum*) induzido com o hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH-gonadorelina). Essa influência pode estar condicionada aos níveis plasmáticos de esteróides sexuais presentes no início da indução hormonal.

Na indução hormonal, a utilização de extrato bruto de hipófise (EBHC) é a técnica mais utilizada para a indução da maturação final dos peixes migradores brasileiros, tendo sido obtidos resultados positivos para diversas espécies (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Porém, o elevado custo das hipófises de carpa e de salmão, utilizados nesse processo, estimularam a realização de trabalhos com hormônios alternativos, como o ovaprim, a gonadotropina coriônica humana (HCG), o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) e seus análogos (Rzenieniechi et al., 2004; Levavi-Sivan et al., 2004; Miranda et al., 2005). A gonadorelina é GnRH sob a forma de diacetato tetrahidrato liofilizada, e também tem sido utilizada na reprodução de peixes (Muniz et al., 2008), porém não há relatos da atividade diária reprodutiva de peixes induzidos com este hormônio.

O lambari *Astyanax bimaculatus* tem ampla distribuição geográfica na América do Sul (Lima et al., 2003), sendo popularmente denominado como lambari, piaba do rabo amarelo ou lambari do rabo amarelo. A sua atividade reprodutiva inicia-se a partir dos 5 cm de comprimento (Santos et al., 1991) e esta espécie pode apresentar desova parcelada ou total, dependendo das condições ambientais (Garutti, 1989).

Devido ao seu pequeno tamanho e facilidade de manipulação em laboratório, o lambari pode ser utilizado como modelo para outras espécies de grande porte. A espécie foi utilizada em testes de indução reprodutiva com EBHC (Sato et al., 2006).

No entanto, são escassas as pesquisas para determinação da atividade motora diária e a influência do fotoperíodo na reprodução induzida de espécies de peixes tropicais. Diante disto, este trabalho foi realizado com os objetivos de verificar o ritmo diário de atividade motora de lambari (*Astyanax bimaculatus*) em um fotoperíodo de 12:12 (luz:escuro) e a variação nos parâmetros reprodutivos de fêmeas de lambari induzidas hormonalmente com gonadorelina e extrato bruto hormonal de carpa (EBHC) durante a metade dos períodos de luz e escuro.

4 Material e métodos

Para atender aos objetivos estabelecidos neste trabalho foram realizados dois experimentos. Um experimento para determinar a atividade motora diária de fêmeas de lambari em idade reprodutiva (Experimento 1). E o outro para verificar a variação nos parâmetros reprodutivos de fêmeas de lambari induzidas hormonalmente com gonadorelina e extrato bruto hormonal de carpa (EBHC) durante a metade dos períodos de luz e escuro (Experimento 2).

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia Animal no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no mês de dezembro/2009. Foram utilizadas 44 fêmeas de lambari, aptas a indução hormonal, com peso de 7.9 ± 2.4 g e comprimento de 8.4 ± 0.8 cm provenientes da estação de piscicultura da UFLA.

A seleção das fêmeas aptas à indução hormonal foi feita pela observação de características externas como o ventre abaulado, poro genital dilatado e avermelhado (Sato et al., 2006). Após a seleção, os exemplares foram mantidos em aquários de vidro de 10 litros (11 peixes/ aquário) em um sistema fechado de recirculação de água instalados em ambiente fechado, devidamente preparado para o controle do fotoperíodo de 12:12 horas de luz:escuro (LE), com auxílio de lâmpadas fluorescentes. Durante o período experimental, a temperatura da água foi mantida em $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e os níveis de oxigênio dissolvido e pH em $6 \pm 0,5$ mg.L⁻¹ e $6,5 \pm 0,5$, respectivamente.

Os animais, durante todo o período experimental, receberam ração comercial, na quantidade calculada de 2% do peso vivo em duas porções diárias fornecidas durante o período de luz.

4.1 Experimento 1

A atividade motora diária dos lambaris foi registrada durante 10 dias por meio de uma fotocélula infravermelha (Omron, modelo E3S-AD62, Japão) instalada na porção mediana externa de um aquário de vidro de 10 litros com 11 peixes. A fotocélula era ativada pelos movimentos dos animais e os registros desses deslocamentos eram enviados e armazenados por um computador, diretamente conectado à fotocélula. A partir dos dados numéricos armazenados durante o período de avaliação, gerou-se um gráfico demonstrando a atividade motora diária média dos 10 dias, com uma linha de tendência a cada 10 minutos. A determinação do modelo de atividade motora diária (diurna, noturna ou

crepuscular) foi realizada mediante a observação do período de maior atividade de movimentação dos peixes dentro do fotoperíodo.

4.2 Experimento 2

Este experimento foi conduzido, após um período 10 dias de aclimatização dos peixes às condições experimentais, em um delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos em esquema fatorial de 2 x 2, sendo 2 hormônios (80 µg de gonadorelina e 6 mg de extrato bruto de hipófise de carpa por kg de peixe) e 2 períodos de aplicação (metade dos períodos de luz - ML e de escuro - ME), com 11 repetições, sendo cada fêmea como unidade experimental.

A indução hormonal foi realizada, após jejum de 24 horas, através de aplicação em dose única, via intramuscular (na base da nadadeira peitoral), durante a metade dos períodos de luz (12:00 horas) e escuro (24:00 horas). A ovulação foi constatada pela observação do comportamento natatório característico das fêmeas do lambari no momento da ovulação, ou seja, apresentando movimentos laterais e em círculo (Sato et al., 2006). Constatada a ovulação, os exemplares foram eutanasiados com o anestésico benzocaína (2g. em 5 mL álcool + 1 L de água).

Após a eutanásia, procedeu-se à incisão ventral nos exemplares para retirada e pesagem das gônadas e do fígado. Calculou-se o índice gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) por meio das seguintes expressões: $IGS = (PG/PT) \times 100$, em que PG é o peso da gônada; $IHS = (PF/PT) \times 100$, em que PF é o peso do fígado (Vazzoler, 1996).

Após a pesagem das gônadas foram coletados 0,1 g de ovócitos para determinação dos seguintes parâmetros: fecundidade absoluta ($FA = PG \times \text{número de ovócitos em } 0,1 \text{ g} - \text{número total de ovócitos produzidos por peixe}$);

fecundidade absoluta relativa para peso (FARP=FA/PT – número total de ovócitos por grama do exemplar); e fecundidade absoluta relativa para comprimento (FARC=FA/CT – número de ovócitos por centímetro do animal).

A medida de diâmetro (DIAM μm) foi realizada em 10 ovócitos de cada fêmea, previamente imersos em solução de Gilson (5 mL de álcool 60%, 44 de água destilada, 0,7 ácido nítrico 80%, 1 g de cloreto de mercúrio e 0,9 mL de ácido acético glacial). Para a análise da posição periférica da vesícula germinativa (PPVG %), 25 ovócitos de cada fêmea foram imersos em solução de Serra (60 mL de álcool 90%, 30 mL de formaldeído e 10 mL de ácido acético glacial). As análises de DIAM e PPVG foram realizadas com auxílio de microscópio óptico.

O cálculo de horas graus (HG °C) da extrusão dos ovócitos foi determinado de acordo com Silva, 2007.

Os dados foram submetidos a análises de variância, utilizando-se o pacote computacional SAEG, seguindo o modelo estatístico com dois critérios de classificação (hormônio e período de aplicação) cruzados.

5 Resultados e discussão

O lambari apresenta um ritmo de atividade motora crepuscular (Fig. 1), com um pequeno pico de atividade durante o fim do período de luz e início do período de escuro. Dessa forma, o lambari não possui uma atividade marcadamente diurna, como algumas espécies como o zebrafish, *Danio rerio*, que apresenta uma atividade marcadamente diurna, permanecendo praticamente inativo no período da noite (Blanco-Vives & Sanchez-Vázquez, 2009).

Esta preferência para estar ativo em determinadas horas do dia parece ser específica de cada espécie e pode estar associada com uma herança genética ou com adaptações aos habitats (disponibilidade de alimento, predação, etc.) ou

depende de fatores sensoriais (dependência da visão para a captura de alimento) [Oliveira, 2009].

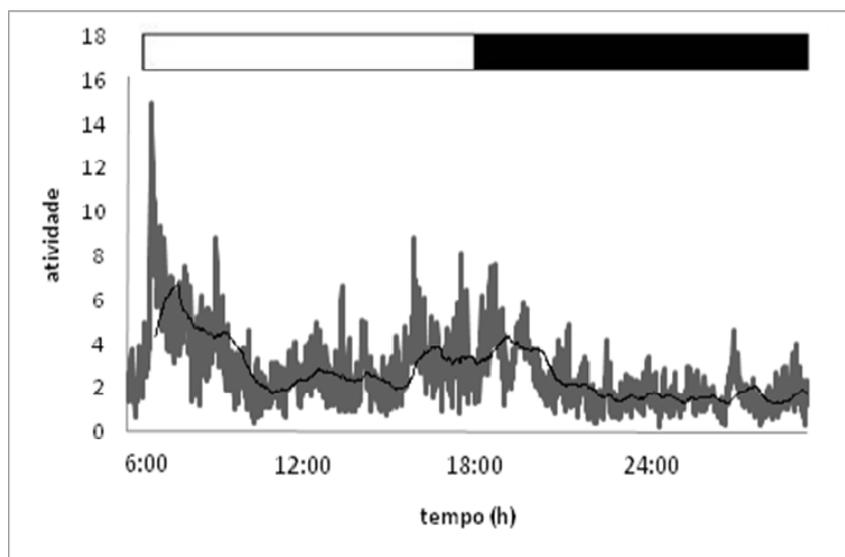


FIGURA 1 Atividade locomotora diária de lambari, *Astyanax bimaculatus*, a um fotoperíodo de 12:12 LE. A barra escura e branca na parte superior do gráfico indica, respectivamente, período de luz e escuro.

Todas as fêmeas de lambari responderam à indução hormonal, apresentando ovulação e ovócitos férteis. Os valores percentuais observados de vesículas germinativas periféricas (Tab. 1) indicam que os ovócitos estavam preparados para fertilização. A PPVG é o principal indicador de viabilidade dos ovócitos (Vazzoler, 1996).

Não foi verificada a influência do fotoperíodo sobre as características reprodutivas de lambari que receberam a indução hormonal com gonadorelina e EBHC, visto que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) nas características

dos exemplares testados entre os períodos de ML e ME (Tab.1). A FARP, contudo foi exceção, pois apresentou um maior ($P<0,05$) número de ovócitos nos grupos que receberam a indução em ML, independente do hormônio utilizado (Tab. 1) quando comparado ao grupo que recebeu a aplicação em ME. No entanto, vale ressaltar que a indução hormonal não influencia na quantidade de ovócitos e sim na maturação dos ovócitos já produzidos.

TABELA 1 Valores médios (\pm desvio padrão) das variáveis analisadas dos exemplares de lambari ($n=11$), submetidos à indução hormonal no período de metade de luz (ML) e metade de escuro (ME). FARP fecundidade absoluta relativa ao peso, FARC fecundidade absoluta relativa ao comprimento.

PARÂMETROS	HIPÓFISE (EBHC)		GONADORELINA (GnRH)	
	ML	ME	ML	ME
Fecundidade absoluta (FA)	7443 \pm 6501	5241 \pm 4660	5290 \pm 1769	4119 \pm 1170
FARP (n ovócitos/g de fêmea)	805 \pm 448 a	580 \pm 396 b	700 \pm 214 a	529 \pm 105 b
FARC (n ovócitos/cm de fêmea)	818 \pm 625	594 \pm 484	636 \pm 201	486 \pm 119
Diâmetro (μ m)	1066,5 \pm 142,2	1135,4 \pm 49,1 a	989,2 \pm 78,6	932,7 \pm 98,8 b
Índice gonadossomático (%)	18 \pm 7,9	14,0 \pm 9,3	14,2 \pm 3,3	10,6 \pm 2,4
Índice hepatossomático (%)	1,0 \pm 0,6	1,2 \pm 1	1,9 \pm 1,6	1,3 \pm 0,9
Vesícula geminativa periférica (%)	95 \pm 6 a	86 \pm 26	79 \pm 21 b	93 \pm 8

* Letras minúsculas diferentes na linha indica diferença significativa a 5 % pelo teste de Tukey.

Em tambaqui Muniz et al. (2008) observaram a influência do horário de aplicação hormonal no processo ovulatório dessa espécie após indução com a gonadorelina no início do dia e início da noite. Essa disparidade entre a observação de Muniz et al. (2008) e este trabalho pode ser devido ao horário de aplicação, que neste trabalho ocorreu na metade do período de luz e metade de escuro e não no início de luz e escuro, como é relatado para o tambaqui. Além

disso, espécies diferentes de peixes podem apresentar respostas específicas à indução hormonal.

Outro fato que pode ter contribuído para não verificarmos a influência do fotoperíodo em lambari é que a espécie possui ritmo de atividade motora com pico de atividade no início do dia, sugerindo que a reprodução desta espécie não é marcadamente influenciada pelo fotoperíodo, como no caso de zebrafish (Blanco-Vivez & Sanchez-Vázquez, 2009).

Os estudos do controle ambiental na reprodução de peixes têm sido focados quase exclusivamente nos papéis desempenhados pelos vários parâmetros do ambiente natural como a temperatura e o fotoperíodo, que podem afetar e definir o período de gametogênese, vitelogênese e maturação gonadal da maioria das espécies (Bromage et al., 2001; Miranda et al., 2008).

Os resultados observados indicam ser este o período reprodutivo dessa espécie (outubro a fevereiro), estando de acordo com Sato et al. (2006) que relatam este período como o reprodutivo para lambari. Como todas as fêmeas de lambari submetidas à indução hormonal com EBHC e gonadorelina responderam positivamente, os protocolos utilizados podem ser considerados satisfatórios para a reprodução artificial dessa espécie. Embora, em ML o EBHC proporcionou maior ($P < 0,05$) porcentagem de ovócitos com PPVG em relação ao grupo que recebeu a aplicação de gonadorelina.

Os lambaris que receberam a indução hormonal com EBHC no período de ML apresentaram ovulação em maior ($P < 0,05$) horas graus (333,9 HG °C) do que os peixes induzidos em ME (240,1 HG °C) [Fig. 2]. Os resultados obtidos também foram diferentes dos observados nos animais induzidos com gonadorelina em ML (250,3 HG °C). No entanto, os grupos tratados com gonadorelina não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) nas horas graus de liberação dos ovócitos em ML (250,3 HG °C) e ME (240,3 HG °C) nos exemplares testados. Mas, essa diferença na HG da ovulação parece não ter influenciado

negativamente nas características reprodutivas dos exemplares, visto que não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) nos parâmetros avaliados (Tab.1), com exceção da FARP.

A liberação de ovócitos dos exemplares que receberam a indução com EBHC em ML iniciou-se com 333,9 horas graus (=11 horas) após a aplicação da dose única do hormônio. Estes resultados estão próximos ao relatado por Sato et al. (2006) que obtiveram desovas de lambari com 331 horas-grau (= 12,8 h) utilizando os mesmos procedimentos com temperatura da água de 26°C. Essas diferenças no tempo de desova de lambari provavelmente estão relacionadas com a temperatura da água onde os animais foram mantidos durante os experimentos, pois o tempo de desova é influenciado por esses parâmetros podendo desempenhar um papel importante em espécies pecilotérmicas através da modulação dos processos fisiológicos e regulações endócrinas (Jalabert, 2005).

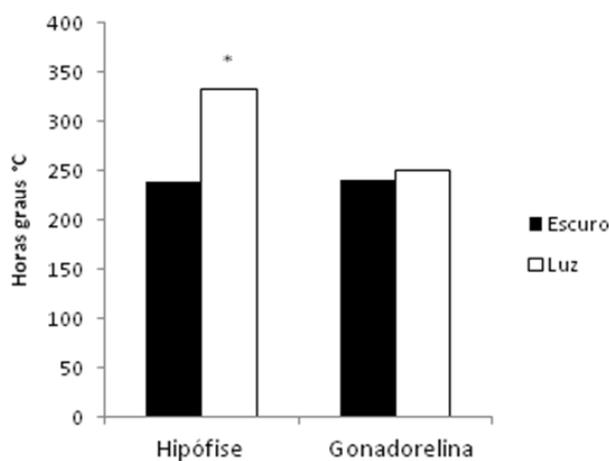


FIGURA 2 Ovulação de lambari, em horas graus.*diferença significativa a 5 % pelo teste de Tukey.

O maior valor de IGS de fêmeas de lambari que receberam a indução com EBHC em ML foi de 29,61%, sendo este um valor similar ao encontrado para essa espécie por outros autores como Sato et al. (2006), que obtiveram IGS de 20,6%. O IGS expressa a porcentagem das gônadas em relação ao peso total dos indivíduos, variando em função da espécie, do tipo de desova, da época do ano, das condições ambientais e do manejo, além de serem influenciadas pela capacidade fisiológica, bem como pelas condições ambientais (Ribeiro et al., 2007).

Por outro lado, o menor valor de IGS foi de 2,99% em fêmeas que receberam EBHC em ME. Este valor mínimo encontrado pode estar relacionado à falha na síntese de esteróides, que segundo Kime (1999) é o principal fator que causa o aumento da deposição de vitelogenina no ovócito e, conseqüentemente, do peso ovariano durante o desenvolvimento reprodutivo.

A fecundidade absoluta (FA) de lambari variou de 720 a 18157 ovócitos. Esta alta variação da FA, também foi verificada por Sato et al. (2006) para mesma espécie, onde os autores citam FA desta espécie variando de 11086 a 31720. Esta alta variação encontrada na FA pode ser devido à diferença individual do peixe. Vale ressaltar que a indução hormonal não atua na quantidade de ovócitos produzidos, mas somente no processo de maturação final dos ovócitos já produzidos (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Não foi verificada diferença ($P>0,05$) no índice hepatossomático (IHS) das fêmeas induzidas com o EBHC e gonadorelina. O IHS expressa a porcentagem que o fígado representa do peso total dos indivíduos. Esse índice é um indicador do período reprodutivo, quando correlacionado a outros fatores como o IGS (Ribeiro et al., 2007), visto que, durante a maturação gonadal, as fêmeas apresentam uma participação do fígado na síntese e secreção de substâncias hepáticas para formação do vitelo durante o processo de maturação ovocitária (Agostinho et al., 1990).

Na indução hormonal no período de ML quando se utilizou o EBHC observou-se uma maior porcentagem ($P>0,05$) de ovócitos com PPVG ($95\pm 6\%$) do que o grupo que recebeu a gonadorelina ($79\pm 21\%$) em ME. Estes resultados sugerem uma maior atuação do EBHC na indução hormonal para o processo de maturação final dos ovócitos, visto que a posição periférica da vesícula germinativa é fator crucial para o sucesso da fecundação.

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que o lambari possui um ritmo diário crepuscular.

A indução hormonal com EBHC e gonadorelina durante os períodos de ML e ME são eficientes para induzir a reprodução em lambari, indicando que a gonadorelina pode ser utilizada como hormônio alternativo na indução hormonal de lambari.

O fotoperíodo não influencia nas características reprodutivas de lambari induzidos com o EBHC e a gonadorelina.

6 AGRADECIMENTOS

À Tortuga Cia. Zootécnica Agrária pela concessão do hormônio gonadorelina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; BARBIERI, G.; VERANI, J. R. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis áspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 42, n. 9, p. 711-714, set. 1990.

BLANCO-VIVES, B.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronization to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 98, n. 3, p. 268-275, Sept. 2009.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 197, n. 1/4, p. 63-98, June 2001.

CLARK, R. W.; HENDERSON-ARZAPALO, A.; SULLIVAN, C. V. Disparate effects of constant and annually-cycling daylength and water temperature on reproductive maturation of striped bass (*Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, n. 1/4, p. 497-513, Sept. 2005.

GARUTTI, V. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* em cursos de água da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p. 114-120, 1989.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 45, n. 3, p. 261-279, May/June 2005.

KIME, D. E. Environmentally induced endocrine abnormalities in fish. **Issues in Environmental Science and Technology**, Cambridge, n. 12, p. 114-118, 1999.

LEVAVI-SIVAN, B.; MELAMED, P.; ROSENFELD, H. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 229, n. 1/4, p. 419-431, Jan. 2004.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A. Genera incertae sedis in characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JÚNIOR, C. J. (Ed.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

MIRANDA, L. A.; CASSARÁ, M. C.; SOMOZA, G. M. Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 15, p. 1473-1479, Nov. 2005.

MIRANDA, L. A.; STRÜSSMANN, C. A.; SOMOZA, G. M. Effects of light and temperature conditions on the expression of GnRH and GtH genes and levels of plasma steroids in *Odontesthes bonariensis* females. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 132, n.1, p. 576-581, Mar. 2008.

MUNIZ, J. A. S. M.; CATANHO, M. T. J. A.; SANTOS, A. J. G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 205-211, 2008.

OLIVEIRA, C. C. V. **Ritmos de reproducción en el lenguado senegalés: papel del órgano pineal y la melatonina como transductores de los ciclos ambientales diarios, lunares y estacionales.** 2009. 204 p. Thesis (Doctor Animal Physiology) - Universidad of Múrcia, Múrcia.

RIBEIRO, V. M. A.; SANTOS, G. B.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of steindachnerina insculpta (Fernandez-Yépez) (teleostei, Curimatidae) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 71-76, mar. 2007.

RZEMIENIECKI, A.; STORESR, T. I.; SPRANDO, R. L. Induced spermiation in 3-year-old sterlet, *Acipenser ruthenus* L. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 144-151, Jan. 2004.

SANTOS, R. A.; CAMPOS, E. C.; CAMARA J. C. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 18, p. 1-11, 1991. Suplemento.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. U.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 267-273, mar. 2006.

SHERWOOD, N.; EIDEN, L.; BROWNSTEIN, M. Characterization of a teleost gonadotropin releasing hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 80, n. 9, p. 2794-2748, May 1983.

SILVA, J. M. A. **Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Piracajuba (*Brycon orbignyanus*).** 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM/SBI, 1996. 169 p.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

CONCLUSÕES FINAIS

Com a realização destes trabalhos pode-se concluir que:

1. A toxicidade do eugenol em zebrafish é independente do período de exposição ao anestésico, apresentando-se mais tóxico quando os peixes são expostos ao período de luz.
2. O lambari apresenta um ritmo de atividade motora diária crepuscular.
3. A indução hormonal com EBHC e gonadorelina durante os períodos de ML e ME são eficientes para induzir a reprodução em lambari, indicando que a gonadorelina pode ser utilizada como hormônio alternativo na indução hormonal de lambari.
4. O fotoperíodo não influencia nas características reprodutivas de lambari induzidos com o EBHC e a gonadorelina.