



JOSÉ GILMAR DA SILVA SOUZA

**PHOTOPERIODS AND DIETS TO CONTROL OF CANNIBALISM IN
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) LARVICULTURE.**

LAVRAS-MG

2019

**PHOTOPERIODS AND DIETS TO CONTROL OF CANNIBALISM IN
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) LARVICULTURE.**

JOSÉ GILMAR DA SILVA SOUZA

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

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Prof. Dr. Carlos Antonio Martínez Palácios

Co-orientador

LAVRAS-MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, José Gilmar da Silva.

Photoperiods and diets to control of cannibalism in piracanjuba
(*Brycon orbignyanus*) larviculture. / José Gilmar da Silva Souza. -
2019.

60 p. : il.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Carlos Antonio Martínez Palácios.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Larvicultura. 2. Peixes. 3. Zootecnia. I. Solis Murgas, Luis
David. II. Martínez Palácios, Carlos Antonio. III. Título.

JOSÉ GILMAR DA SILVA SOUZA

**PHOTOPERIODS AND DIETS TO CONTROL OF CANNIBALISM
IN PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) LARVICULTURE.**

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

APROVADA em 24 de abril de 2019

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, UFLA.

Dra. Ana Paula Peconick, UFLA.

Dr. Marcos Ferrante, UFLA.

Dra. Mariana Martins Drumond, CEFET/MG.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

LAVRAS-MG

2018

*À minha mãe Maria da Conceição, ao meu pai Antônio Fernando, ao meu irmão Francisco e
à minha companheira Camila pelo apoio incondicional.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

À CAPES pelo financiamento da pesquisa.

À CEMIG Unidade de Itutinga-MG pelo apoio na doação das larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

Ao Setor de Sementes do Departamento de Agricultura, na pessoa da Professora Heloisa Oliveira e do Doutorando Rubens Diogo, pelo apoio durante as análises de qPCR.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Fisiologia de Água Doce e aos amigos de convivência no Biotério Central da UFLA e no Setor de Fisiologia e Farmacologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária pelos momentos de troca de sabres e de diversão.

Às amigas Isadora Paiva, Aline Ferreira e Tharyn Reichel pelo apoio durante às análises preliminares e preparação das amostras.

Ao orientador Luis David Solis Murgas e co-orientador Carlos Antonio Martínez Palácios pelo apoio e orientação científica.

Aos pesquisadores e amigos do Laboratório Nacional de Nutrigenômica e Microbiomica Digestiva Animal da Universidade Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México pela troca de conhecimentos e oportunidade de estágio.

Aos familiares e amigos que mesmo não estando no ambiente acadêmico torceram por mim e me apoiaram nesta caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Remember when you were young? You shone like the sun. Shine on, you crazy diamond!”

“Se lembra quando você era jovem? Você brilhou como o sol. Continue brilhando, seu diamante louco!”

- Trecho da música “Shine on, you crazy diamond”, Pink Floyd.

RESUMO

A larvicultura é considerada uma etapa crítica na produção de peixes devido às elevadas taxas de mortalidade ocorridas nas fases iniciais da vida dos peixes. As causas desta mortalidade estão relacionadas, principalmente, à questões alimentares e comportamentais como a adequação da dieta à etapa de desenvolvimento das larvas e a tendência ao canibalismo. A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie neotropical com grande aptidão à produção em cativeiro, porém esta espécie durante a fase larval apresenta intensa atividade canibal. O canibalismo na fase larval é apontado com um grande entrave no desenvolvimento da produção desta espécie. A manipulação do fotoperíodo e a utilização da dieta adequada são estratégias para redução do canibalismo já comprovadas em diversas espécies. Com o objetivo de reduzir as taxas de canibalismo na larvicultura de piracanjuba, avaliou-se o desempenho zootécnico e expressão quantitativa de *mLeptina* e *mBmall* na larvicultura inicial em diferentes fotoperíodos (12L:12D e 24L:00D) e dietas (náuplios de artêmia e microdieta artificial). Observou-se que existe influência da dieta e fotoperíodo no desempenho de larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) na fase inicial da larvicultura. A alimentação com náuplios de artêmia e o fotoperíodo de 24L:00D reduzem as taxas de canibalismo na larvicultura intensiva de piracanjuba. Larvas de piracanjuba mantidas sob luminosidade constante e alimentadas com náuplios de artêmia apresentam maiores níveis de expressão de *mLeptina*, o que está relacionado à redução nas taxas de canibalismo. A expressão do *mBmall* possui relação direta com o peso final das larvas.

Palavras-chave: Aquicultura; Canibalismo; *mLeptina*; *mBmall*; Zeitgeber.

ABSTRACT

Larviculture is a critical step in fish production for the high mortality rates occurring in the early stages of fish life. The causes of this mortality are linked to food and behavioral issues such as diet adequacy to larval development stage and the tendency to cannibalism. The piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) is a neotropical species with great aptitude for captive production, but this species during the larval phase presents intense cannibal activity. The cannibalism in the larval phase is pointed out with a great obstacle in the development of the production of this species. The manipulation of the photoperiod and the use of adequate diet are strategies to reduce cannibalism already proven in several species. In order to reduce the rates of cannibalism in piracanjuba larvae, we evaluated the zootechnical performance and quantitative expression of *mLeptina* and *mBmal1* in the initial larvae in different photoperiods (12L: 12D and 24L: 00D) and diets (artemia nauplii and artificial micro diet). It was observed that diet and photoperiod influence on the performance of piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) in the initial phase of larviculture. Feeding with artemia nauplii and 24L: 00D photoperiod reduce the rates of cannibalism in intensive piracanjuba larvae. Larvae of piracanjuba kept under constant luminosity and fed with artemia nauplii present higher levels of expression of *mLeptina*, which is related to the reduction in cannibalism rates. The expression of *mBmal1* is directly related to the final weight of the larvae.

Keywords: Aquiculture; Cannibalism; *mLeptin*; *mBmal1*; Zeitgeber

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1. Exemplar de piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>).....</p>	<p>14</p>
<p>Figura 2: Principais componentes da teia do ciclo circadiano de peixes. O ritmo circadiano em peixes é um complexo mecanismo acionado pelos <i>zeitgebers</i> (<i>inputs</i>), intermediado por interação hormonal, outputs cíclicos como ritmos endócrino, comportamental e metabólico.....</p>	<p>18</p>
<p>Figure 3: Cannibalism (A) and uniformity (B) rates observed during initial feeding experiment of piracanjuba larvae (<i>Brycon orbignyanus</i>) in different photoperiods. Boxes with different letters differ from each other (Mann-Whitney test, $p < 0.05$).....</p>	<p>44</p>
<p>Figure 4: Ocular diameter (A) and mouth opening (B) of post-larvae of piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) after experiment of initial feeding in different photoperiods in larviculture. There was no significant effect of treatments on these variables (ANOVA, $p > 0.05$).....</p>	<p>44</p>
<p>Figure 5: Histogram of total lengths of piracanjuba post-larvae (<i>Brycon orbignyanus</i>) after experiment of different initial diets and photoperiods in larviculture. A-12L: 12E fed with artemia nauplii; B-24L: 00D fed with artemia nauplii; C-12L: 12D fed with micro aggregated diet; D-24L: 00D fed with micro aggregated diet.....</p>	<p>47</p>
<p>Figure 6: Effect of diet (A) and photoperiod (B) on the expression of <i>mLeptin</i> in larvae of piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) in larval experiment; $n = 4$ post-larvae / treatment. Boxes accompanied by asterisks differ by Mann-Whitney test ($p < 0.05$).....</p>	<p>50</p>
<p>Figure 7: Expression of <i>mLeptin</i> in piracanjuba larvae (<i>Brycon orbignyanus</i>) after larval experiment with different initial diets and photoperiods; $n = 4$ post-larvae / treatment. Boxes accompanied by different letters, differ by Mann-Whitney test ($p < 0.05$).....</p>	<p>50</p>
<p>Figure 8: Effect of photoperiod (A) and diet (B) on the expression of <i>mBmal1</i> in larvae of piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) in larval experiment; $n = 4$ post-larvae / treatment. The treatments did not differ by Mann-Whitney test ($p > 0.05$).....</p>	<p>51</p>
<p>Figure 9: <i>Bmal1</i> expression in larvae of piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) after larval experiment with different initial diets and photoperiods, $n = 4$ post-larvae / treatment. Boxes accompanied by different letters, differ by Mann-Whitney test.....</p>	<p>51</p>
<p>Figure 10: Biplot graph of main components analysis (PCA) of the interaction of <i>Leptin</i> and <i>Bmal1</i> transcription with survival rate, final weight and cannibalism rate of piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) larvae after larviculture in different photoperiods and different diets.....</p>	<p>52</p>

LISTA DE TABELAS

Table 1: Bromatological composition of diets used during initial feeding experiment of piracanjuba larvae (<i>Brycon orbignyana</i>) in different photoperiods.....	38
Table 2: Water quality variables analyzed during initial feeding experiment of piracanjuba larvae (<i>Brycon orbignyana</i>) in different photoperiods.....	41
Table 3: Zootechnical performance in experiment of initial feeding of piracanjuba larvae (<i>Brycon orbignyana</i>) in different photoperiods.....	43
Table 4: Correlation between performance indicators and morphometric variables of post-larvae of piracanjuba (<i>Brycon orbignyana</i>) after initial feeding experiment in different photoperiods in larviculture.....	46
Table 5: Sequences used for quantitative expression of target transcripts, amplicon size, and efficiency and aligned sequences to obtain primers.....	49

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. A piracanjuba (<i>Brycon orbignyana</i>).....	14
2.2. Larvicultura de peixes de água doce.....	15
2.3. Uso de alimento vivo e microdietas na larvicultura de peixes.....	15
2.4. Fotoperíodo e ritmos biológicos.....	17
2.4.1. Melatonina.....	18
2.4.2. Orexina.....	19
2.4.3. Leptina.....	20
2.4.4. Grelina.....	20
2.4.5. Cortisol.....	20
2.5. Efeito do fotoperíodo sobre o crescimento e comportamento alimentar de peixes.....	21
2.6. Regulação molecular da cronobiologia em peixes.....	24
2.6.1. Leptina.....	25
2.6.2. Bmal1.....	25
2.7. Considerações finais.....	25
CAPÍTULO II.....	34
3. FOTOPERÍODOS E DIETAS PARA O CONTROLE DO CANIBALISMO NA LARVICULTURA DE PIRACANJUBA, <i>Brycon orbignyana</i> (Valenciennes, 1850).....	34

1. INTRODUÇÃO

Acompanhando a crescente população mundial, a demanda por pescado também é maior ao longo dos anos e a aquicultura, devido à estagnação da capacidade produtiva dos estoques pesqueiros naturais, é a alternativa para suprir esta demanda. Em relação à aquicultura do Brasil, a Organização das Nações Unidas prospecta um crescimento de mais de 80% na produção até 2030, esta projeção baseia-se no potencial hídrico e no histórico produtivo recente (FAO, 2018). No Brasil, a produção aquícola é predominantemente representada pela piscicultura, e a espécie mais produzida é a tilápia, porém a produção de espécies nativas apresentou crescimento em relação aos outros anos (IBGE, 2016).

A oferta de formas jovens de peixes é crucial para o sucesso da produção e a larvicultura é um ponto crítico (CONCEIÇÃO et al, 2010; AJIBOYE et al, 2011). Durante a fase larval, os peixes passam por intensas transformações morfológicas e apresentam alta sensibilidade ao estresse do manejo, podem sofrer predação e, para algumas espécies, apresentam intensa atividade canibal (NAUMOWICZ et al, 2017; PEREIRA; AGOSTINHO; WINEMILLER, 2017). O canibalismo na larvicultura é um entrave para a produção de diversas espécies nativas do Brasil com grande potencial para a produção aquícola como o dourado (*Salminus brasiliensis*) (DAIRIKI et al, 2013; VOLKOFF et al, 2016), os bagres do gênero *Pseudoplatystoma* (BARAS et al, 2011; NUÑEZ et al, 2011) e os peixes do gênero *Brycon* (GOMES et al, 2013; LANDINES et al, 2013; SOUZA et al, 2014).

A piracanjuba (*Brycon orbignianus*) é uma espécie nativa das Bacias do Rio da Prata e Rio Grande, possui grande aptidão para a produção em cativeiro devido seu rápido crescimento e adaptação às condições de criação (FELIZARDO et al, 2010). Quando adultos, possuem hábito alimentar onívoro (SEIXAS FILHO et al, 2001). Porém, durante a fase larval, apresentam hábito alimentar carnívoro e intensa atividade canibal (REYNALTE-TATAJE et al, 2002) o que é apontado como um dos principais entraves para a produção de alevinos desta espécie. Devido à relação entre cronobiologia e atividade alimentar (COWAN et al, 2017), a manipulação do fotoperíodo e a oferta de dietas específicas são estratégias já comprovadas para diversas espécies (BARAS et al, 1999; BARAS et al, 2000; ALMAZÁN-RUEDA et al, 2005; SALARO et al, 2006).

Esta tese aborda os efeitos da manipulação do fotoperíodo e do tipo de alimento na larvicultura de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), sob as hipóteses de que a luminosidade (24L:00D) constante reduz o canibalismo em larvas de piracanjuba e que é possível a inserção precoce da

dieta inerte na larvicultura desta espécie. E o objetivo geral dos experimentos descritos nesta tese foi avaliar os efeitos do fotoperíodo e da dieta ofertada sobre o desempenho zootécnico e canibalismo na larvicultura da piracanjuba.

CAPÍTULO 1

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae) (Fig.: 1) é uma espécie neotropical migradora originária da bacia do Paraná-Uruguai, encontrada principalmente nos rios Paraná e Grande (CASTAGNOLI, 1992; GANECO et al, 2001). Esta espécie está listada entre as espécies de peixes ameaçadas de extinção no Brasil (ICMBio,2016).



Figura 1: Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Fonte: www.fishbase.org

É uma espécie de rápido desenvolvimento embrionário e comportamento canibal durante a fase larval (MACIEL et al, 2010), com eclosão ocorrendo entre 14 e 18 horas pós-fertilização (temperatura entre 25 e 28°C) (REYNALTE-TATAJE et al, 2004; MACIEL et al, 2010; NAKATAMI et al, 2001). Como em outras espécies de peixes, a velocidade de desenvolvimento embrionário está diretamente relacionada com a temperatura da água, de forma que quanto mais elevada a temperatura da água, mais rápido será o desenvolvimento embrionário. Para a piracanjuba, Maciel et al (2010) observaram que a completa metamorfose ocorre 172 horas após a eclosão (temperatura de 26,0°C), quando é finalizado o estágio larval e inicia-se a fase juvenil que se estende até a maturidade sexual que, segundo Zaniboni Filho; Schulz (2003), em condições naturais se dá aos 2 anos de idade para machos e 3 anos para fêmeas.

Possui grande aptidão para a produção em cativeiro devido seu rápido crescimento e adaptação às condições de criação (FELIZARDO et al, 2010). Quando adultos, possuem

hábito alimentar onívoro (SEIXAS FILHO et al, 2001). Porém, durante a fase larval, apresentam hábito alimentar carnívoro e intensa atividade canibal (REYNALTE-TATAJE et al, 2002) o que é apontado como um dos principais entraves para a produção de alevinos desta espécie.

2.2. Larvicultura de peixes de água doce

Larvicultura é o conjunto de técnicas utilizadas para a criação de peixes entre a fase de eclosão dos ovos até o fim da fase larval. Compreende-se como fase larval o período em que se inicia com a eclosão dos ovos e se estende até a metamorfose das larvas, quando os peixes assumem a conformação de um indivíduo adulto (BLAXTER, 1988). É considerada uma fase crítica para a produção de peixes, sendo que a alimentação merece atenção especial. A alimentação natural é muito importante no desenvolvimento dos peixes, principalmente nos estágios iniciais, especialmente para espécies que são de desenvolvimento altricial onde o animal nasce sem os órgãos complementares desenvolvidos (PORTELLA et al., 2014), por tanto nesta fase, a alimentação inadequada pode causar elevadas taxas de mortalidade e crescimento reduzido.

O objetivo da larvicultura é incrementar as taxas de sobrevivência e de crescimento a partir do oferecimento de condições ambientais adequadas, entre elas a definição de uma estratégia alimentar que garanta a quantidade e a qualidade dos alevinos (ATENCIO-GARCIA et al., 2003). A larvicultura torna-se ainda mais crítica quando a espécie a ser criada apresenta comportamento canibal (HECHT; PIENAAR, 1993; PORTELLA, et al., 2014).

A piracanjuba é uma espécie nativa do Brasil com grande potencial para a produção em cativeiro apresentam comportamento canibal durante fase larval e existem muitos estudos sobre as estratégias para a redução das perdas durante esta fase. Dentre os fatores que influenciam sobre os índices de canibalismo os mais estudados são a densidade de estocagem, frequência alimentar, natureza do alimento e fotoperíodo (SCHÜTZ et al, 2007; PORTELLA et al., 2014).

2.3. Uso de alimento vivo e microdietas na larvicultura de peixes

Em geral, larvas de peixes dependem da disponibilidade de organismos vivos para pleno desenvolvimento, devido ao fato de o alimento natural contribuir com nutrientes essenciais para o crescimento e sobrevivência, uma vez que não possuem sistema digestivo plenamente desenvolvido. Então, a disponibilidade de alimento, é de grande importância para assegurar o sucesso da larvicultura durante a fase inicial (SOARES et al., 2000).

A utilização de alimento vivo é uma alternativa na alimentação de larvas e pode reduzir a incidência de canibalismo (WACHTER *et al.*, 2009). Dentre os organismos vivos utilizados como alimento, a artêmia tem se destacado pela fácil produção laboratorial, e tecnologia de cultivo conhecida, de modo que pode se tornar uma alternativa viável, devido a seu elevado valor proteico (DIEMER, 2010). A importância do alimento vivo na larvicultura de peixes é evidenciada em diversos experimentos. Soares *et al.*, (2000) observaram que a alimentação exclusiva com alimento vivo ou combinada com alimento artificial proporcionou melhores resultados quanto ao desempenho zootécnico do que o uso de ração formulada na larvicultura do kinguio (*Carassius auratus*). Piedras; Pouey (2004) observaram o mesmo na larvicultura do pejerrey (*Odontesthes bonariensis*).

Para as espécies nativas, os resultados são semelhantes. Pedreira *et al.*, (2015) constataram que larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentadas com alimento vivo durante a larvicultura são apresentam melhor desempenho do que as larvas alimentadas exclusivamente com ração. Assim como ocorrido com o tambaqui, a oferta de alimento vivo maximizou a sobrevivência e crescimento de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (PORTELLA *et al.*, 2014), jundiá (*Rhamdia quelen*) (BORGES NETO et al., 2014) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (PEREIRA; OLIVEIRA et al., 2003).

Como alternativa ao uso de alimento vivo, as microdietas -dietas micro encapsuladas ou micro agregadas- são uma tecnologia para fornecimento de nutrientes para larvas de peixes, porém muitos aspectos de sua utilização e funcionalidade necessitam de esclarecimentos. Para fase de larvicultura de peixes, a dieta ainda é um dos maiores entraves no sistema de produção, pois estas ainda apresentam problemas de estabilidade, atratividade e de composição (HONORATO et al., 2016).

A combinação de dietas naturais e artificiais vem sendo utilizada para otimizar o sistema de produção intensiva de larvas de peixes neotropicais (JOMORI *et al.*, 2013; SALARO *et al.*, 2006). Contudo, o sistema intensivo apresenta uma grande dependência por

alimentos vivos (artêmia) e a transição deste para o inerte ainda representa um entrave para sua produção.

Estudos vêm sendo conduzidos para se obter microdietas que possam substituir satisfatoriamente o alimento natural durante a fase larval de alguns peixes neotropicais e os resultados mostram que ainda existem aspectos relacionados à composição e forma de utilização para as muitas espécies nativas como piracanjuba, traíra, dourado que precisam ser elucidados (HONORATO *et al.*, 2016). A literatura que aborde a utilização de microdietas na larvicultura de espécies nativas que apresentem hábito alimentar carnívoro durante a fase larval ou que sejam canibais nesta fase, como as espécies do gênero *Brycon*, ainda é muito escassa.

2.4. Fotoperíodo e ritmos biológicos

Ritmo biológico pode ser definido como frequência temporal de qualquer evento fisiológico que se repete de forma cíclica. A definição de um ritmo biológico é resultante do esforço adaptativo do organismo às mudanças ambientais como ciclo luz/escuro, oferta de alimento e ciclos de temperatura. Os agentes que modulam o ritmo biológico são denominados *Zeitgeber* e dentre os sincronizadores do ritmo biológico, o fotoperíodo é considerado o mais importante e mais estudado (VERAS *et al.*, 2013). Os ritmos biológicos podem ser classificados de acordo com a sua duração em: ultradianos (até 20 horas); circadianos (entre 20 e 28 horas) e infradianos (acima de 28 horas) (HERRERO *et al.*, 2003; SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006).

Em vertebrados, o controle dos ritmos biológicos ocorre no núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo, que é considerado o centro do relógio biológico. Acreditava-se que o “relógio circadiano” se encontrava exclusivamente no sistema nervoso central, mas evidências apontam que a determinação do ritmo biológico conta com um aparato periférico muito complexo que envolve a interação de hormônios tanto em mamíferos quanto em peixes (ISORNA *et al.*, 2017).

Hormônios são substâncias proteicas ou esteroides com a principal função de controlar o funcionamento fisiológico. A adaptação às alterações ambientais e regulação dos ciclos biológicos é realizada por meio da ação de alguns hormônios que promovem a interação de eixos endócrinos relacionados à homeostase (hipotalâmico-hipofisário), estresse

(hipotalâmico-hipofisário-interrenal), crescimento (hipotalâmico-hipofisário-fígado), metabolismo energético (hipotalâmico-hipofisário-tireóide) e reprodução (hipotalâmico-hipofisário-gônadas) (COWAN et al, 2017). Alguns hormônios merecem maior destaque devido à sua ligação direta com o ciclo luz/escuridão e a oferta de alimento, importantes *zeitgebers* para peixes. Estes hormônios são a melatonina, orexina, cortisol, leptina e grelina (Fig. 2).

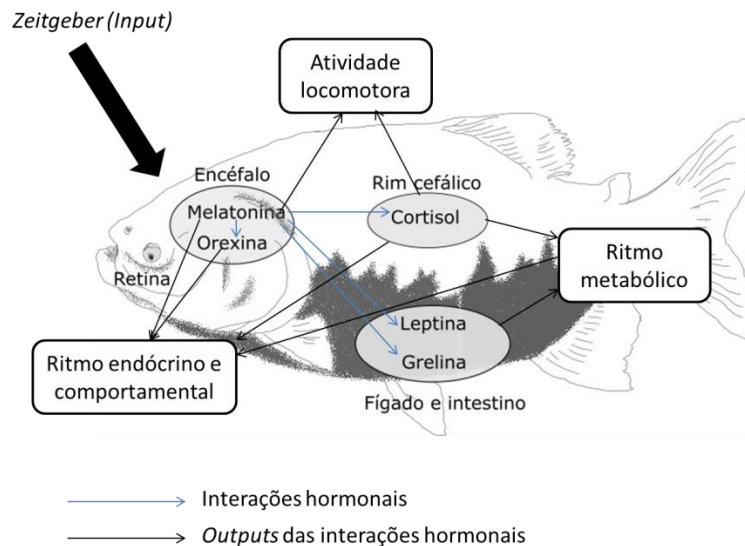


Figura 2: Principais componentes da teia do ciclo circadiano de peixes. O ritmo circadiano em peixes é um complexo mecanismo acionado pelos *zeitgebers* (*inputs*), intermediado por interação hormonal, outputs cíclicos como ritmos endócrino, comportamental e metabólico. Adaptado de Isorna et al (2017).

2.4.1. MELATONINA

A melatonina é um hormônio proteico, cujo precursor é o triptofano, produzido na glândula pineal. É considerado o principal hormônio relacionado ao ciclo luz/escuridão e seus picos de produção ocorrem durante os períodos de menor luminosidade (EKSTRÖMN; MEISSEL, 1997) e possui relação com todos os outros hormônios relacionados à determinação do ciclo circadiano. Em peixes, já é sabido que este hormônio está relacionado com a atividade imunológica (ÁNGELES-ESTEBAN et al, 2013; REN et al, 2015), reprodução (PRAYOGO et al 2012; MAITRA et al, 2013), consumo de alimento (PICCINETTI et al, 2013), reação ao estresse (DIAS et al, 2013; LÓPEZ-PATIÑO et al, 2013) e crescimento (SINGH et al, 2012). Em mamíferos, existem evidências de que a melatonina atua moduladora da apoptose, tendo ação anti-apoptótica

em alguns tecidos por sua ação anti-oxidante (FERREIRA et al, 2010) e é possível que a melatonina também apresente esta ação em peixes.

De forma geral, é possível constatar na literatura que a melatonina é determinante para a homeostase dos peixes, refletindo diretamente na redução do estresse e na migração de células imunológicas e, por ser um sinalizador temporal das estações do ano, informam ao sistema endócrino sobre as condições para a reprodução da espécie causando influência direta sobre a maturação gonadal em muitas espécies de peixes. Outro efeito de grande interesse para a aquicultura é a modulação da síntese de hormônios relacionados ao crescimento. A literatura sobre os efeitos da melatonina ou fotoperíodo sobre os níveis de hormônios relacionados ao crescimento em larvas de peixes é menos numerosa, porém Fálcon et al (2003) observaram que existe efeito modulatório da melatonina sobre a produção de hormônio de crescimento (GH) em cultivo *in vitro* de células da glândula pineal de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Taylor et al (2008) constataram influência da luminosidade e do implante de melatonina na liberação de IGF-I, hormônio relacionado á síntese proteica, na corrente sanguínea de juvenis de truta-arco-íris.

2.4.2. OREXINA

A orexina é um neuropeptídeo que é produzido no hipotálamo e sua atuação como regulador da atividade locomotora e consumo de alimento já é amplamente estudada (LIN et al, 2000). Assim como em mamíferos, a atuação da orexina como agente de incremento de consumo de alimento já é bem conhecida em peixes, porém os estudos que investigam a importância deste neuropeptídeo no ciclo circadiano são recentes. Appelbaum et al (2010) observaram em zebrafish (*Danio rerio*), que assim como em mamíferos o principal sítio de produção de orexina é na região lateral do hipotálamo e que a superexpressão deste neuropeptídeo provocou redução no efeito promotor do sono causado pela melatonina. Elbaz et al (2013), também para zebrafish, constataram que a plasticidade do eixo de liberação de orexina é regulado pelo relógio circadiano. Nisembaum et al (2014) observaram que a injeção de orexina em juvenis de kinguio (*Carassius auratus*) influencia na expressão de transcritos relacionados ao ciclo circadiano, demonstrando que a orexina também funciona como *input* fisiológico para relógio biológico.

2.4.3. LEPTINA

A leptina é um neuropeptídeo que regula o consumo de alimento e balanço energético em mamíferos e peixes (GRILL, 2010; COPELAND et al, 2011; LI, 2011). Em peixes, a leptina é sintetizada, principalmente, no fígado e se expressa também no cérebro e em outros tecidos periféricos (KUROKAWA; MURASHITA, 2009; FRØILAND et al, 2010; TINOCO et al, 2012) e o efeito anoréxico da leptina já é conhecido em peixes (VOLKOFF et al. 2003; DE PEDRO et al, 2006). Apesar de estar relacionada ao consumo de alimento e a oferta de alimento ser um dos fatores determinantes para sincronização do relógio circadiano, existem evidências que a oferta de alimento e a produção de leptina isoladamente não afetam o relógio circadiano em peixes (TINOCO et al, 2012). Por outro lado, Piccinetti et al (2010) constataram que existe uma influência da melatonina na produção de leptina, em zebrafish (*Danio rerio*), de forma que a injeção de melatonina causou maior produção do transcrito *leptina* mRNA, responsável pela produção de leptina. Assim, a leptina é um fator de sincronização do relógio circadiano desde que em associação com outros hormônios como a melatonina e o cortisol (ISORNA et al, 2017).

2.4.4. GRELINA

A grelina é um hormônio de múltiplas funções relacionado à regulação do crescimento, alimentação e regulação do metabolismo. Em peixes, a sua função como reguladora do consumo de alimento é muito estudada, e embora que para mamíferos a grelina seja apontada como um dos hormônios relacionado ao esvaziamento gástrico e aumento do consumo de alimento (ROMERO; ZANESCO, 2006; KOWALSKI et al. 2014) a sua função como regulador do consumo de alimento varia de acordo com a espécie. Blanco et al (2017) observaram que a grelina possui função de incremento do consumo de alimento para kinguio (*Carassius auratus*). Por outro lado, Zhou et al (2016) constataram que este mesmo hormônio pode ter ação anorexigênica em carpa-da-Prússia (*Carassius a. gibelio*). Assim como a leptina, a grelina em interação com hormônios como a melatonina (PICCINETTI et al, 2010) e cortisol (ISORNA et al, 2017) é considerado um dos sincronizadores do relógio circadiano estando relacionado aos ciclos de alimentação.

3.4.5. CORTISOL

O cortisol é um hormônio esteroide que possui grande importância nas reações ao estresse e no metabolismo energético, promovendo o catabolismo de reservas de glicogênio e lipídeos. A sua função como indicador do estresse e seus efeitos metabólicos já são conhecidos e estudados para peixes (CAO et al, 2017; WATZ, 2017), e a sua ação sobre a atividade locomotora e metabolismo energético estão intimamente ligados ao ciclo circadiano. A maioria dos estudos aponta que a liberação de cortisol na corrente sanguínea ocorre de forma rítmica, e em peixes diurnos observou-se que os picos de cortisol ocorrem durante o período de luminosidade (NIKAIDO et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2013). Nikaido et al (2010) demonstraram que a injeção de melatonina causou redução nos níveis de cortisol plasmático em tilápia (*Oreochromis niloticus*), indicando que houve ação antagônica do cortisol à da melatonina. Para juvenis do linguado (*Dicologlossa cuneata*), De la Roca et al (2017) observaram que a maior atividade de consumo de alimento e de natação ocorreu durante o período de escuridão, porém, assim como em peixes diurnos, os maiores níveis de cortisol ocorreram nos períodos de exposição à luminosidade. A influência da interação entre a melatonina e o cortisol sobre o ciclo circadiano em peixes de hábito noturno é pouco estudada.

2.5. Efeito do fotoperíodo sobre o crescimento e comportamento alimentar de peixes

O fotoperíodo é um dos mais importantes estímulos externos para determinação do ritmo circadiano e a manipulação deste fator causou resultados relevantes na produção de peixes, sobretudo na produção de formas jovens. Shahkar et al (2015) observaram que para larvas de *Rutilus rutilus* obtiveram maior crescimento em fotoperíodos de maior luminosidade (24L:00E e 18L:6E), os autores associam o sucesso destes fotoperíodos à relação entre maior luminosidade e aumento do apetite e consumo de alimento. Sales et al (2016) também constataram a influência positiva da exposição à luminosidade por longos períodos (24L:00E e 20L:04E) sobre o crescimento de larvas de *Betta splendens* e relacionam tal resultado ao incremento do consumo de alimento e a correlação positiva entre maiores períodos de luminosidade e liberação de hormônios relacionados ao crescimento. Fotoperíodos com luminosidade elevadas também melhorou o desempenho de larvas de *Pterophyllum scalare* (VERAS et al, 2016) e Mendonça et al (2009) constataram correlação positiva entre a taxa de eficiência proteica e o aumento da luminosidade para juvenis de tambaqui.

Segundo Lazado et al (2014), a manipulação do fotoperíodo (24 horas de luz) causou aumento na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular (*myo18a_2* e *myo18b_2*) e, conseqüentemente, incremento nos índices de crescimento de juvenis de bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*). A influência do fotoperíodo sobre o desempenho das larvas de peixes varia de acordo com as espécies. Reynalte-Tataje et al (2002) observaram que o fotoperíodo não exerce influência sobre o crescimento de larvas de *Brycon orbignyanus*, também de hábito diurno, havendo forte influência do fotoperíodo sobre as taxas de canibalismo que foram menores em fotoperíodos de elevada luminosidade.

As espécies citadas anteriormente são espécies de hábito diurno, fato que pode ter conduzido aos resultados positivos dos fotoperíodos de maior luminosidade. Para espécies de hábito noturno e crepuscular, a literatura mostra resultados divergentes. Rahmah et al (2014) a manipulação do fotoperíodo não influenciou no crescimento das larvas do bagre *Mystus nemurus*, assim como para juvenis de *Lophiosilurus alexandri*, outra espécie de hábito noturno, também não foi observada influência do fotoperíodo sobre os parâmetros de crescimento (KITAGAWA et al, 2015). Demonstrando que estas espécies poderiam ser criadas tanto em completa escuridão quanto sob luminosidade constante.

Para juvenis de trairão (*Hoplias lacerdae*), de hábito crepuscular e noturno, em que o fotoperíodo não exerceu influência significativa sobre os índices de crescimento, porém observou-se influência do fotoperíodo sobre o comportamento alimentar dos peixes, a taxa de canibalismo que foi menor em fotoperíodo de escuridão total (SALARO et al, 2006). Para larvas de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), Campagnolo; Nuñez (2008) concluíram que a ausência de luz é benéfica nos primeiros cinco dias após o início da alimentação exógena e que após este período a ausência de luz é prejudicial ao crescimento das larvas, sendo recomendado fotoperíodos intermediários (entre 10 e 14 horas de luz) após os primeiros cinco dias de escuridão intermitente.

Outra forma de manipulação de fotoperíodo que tem mostrado eficiência é a inversão do fotoperíodo habitual da espécie. Para o bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), espécie marinha de hábito predominantemente noturno (Keats, 1990), Lazado et al (2014) constataram que a luminosidade constante causou aumento na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular (*myo18a_2* e *myo18b_2*) e, conseqüentemente, incremento nos índices de crescimento. Fato corroborado por Nagasawa et al (2012), que

observaram aumento na expressão de transcritos relacionados à miogênese (*myf-5*, *pax7* e *myog*) em fotoperíodo de luminosidade constante. De maneira geral, a manipulação do fotoperíodo na larvicultura tem demonstrado muitas vantagens.

Devido à forte ligação do fotoperíodo com eventos fisiológicos relacionados ao crescimento, sua manipulação pode gerar, também, resultados negativos sobre o desenvolvimento dos peixes. Wargelius et al (2009) compararam os efeitos da exposição prolongada (seis meses) à luminosidade constante e a o fotoperíodo natural em juvenis de salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) e observaram aumento na ocorrência de deformidades na coluna vertebral dos juvenis submetidos à luminosidade constante. Posteriormente, Fjellidal et al (2012) observaram que a luminosidade constante reduz a mineralização da coluna vertebral de juvenis de salmão-do-Atlântico, acarretando malformações e mortalidade em peixes que receberam alimentação pobre em fósforo.

Blanco-Vives et al (2010) constataram que a luminosidade intermitente causa maior taxa de deformações na mandíbula após a metamorfose para larvas de linguado-do-Senegal (*Solea senegalensis*). Villamizar et al (2009) observaram também que a manipulação do fotoperíodo causou efeitos negativos na formação de estruturas essenciais como dentes, bexiga natatória e nadadeiras de larvas de *Dicentrarchus labrax*, sendo que os melhores resultados foram encontrados em fotoperíodo próximo ao natural (12 horas de luz e 12 horas de escuridão). Para larvas de *Argyrosomus regius* a elevada intensidade luminosa prejudicou a formação da bexiga natatória (VALLÉZ; ESTÉVEZ, 2013).

Estudos que abordem os efeitos negativos da manipulação do fotoperíodo sobre o desenvolvimento embrionário não são tão numerosos quanto os realizados com larvas ou juvenis, mas é possível observar autores que apontem efeitos negativos da exposição à fotoperíodos extremos durante o desenvolvimento embrionário sobre a integridade de larvas de peixes. Villamizar et al (2014) observaram que o fotoperíodo de total escuridão prejudica o desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*, acarretando em elevada taxa de malformações. Além do fotoperíodo, estes autores observaram significativa influência do espectro luminoso sobre a super-expressão de genes relacionados ao desenvolvimento notocordal e surgimento de deformidades em larvas desta espécie.

Somado às possíveis desvantagens fisiológicas, a manipulação de fotoperíodo é uma tecnologia que pode aumentar o custo de produção de larvas e juvenis. Este é um ponto negativo da aplicação desta tecnologia que deve ser considerado mesmo se a espécie em

questão possui bom desempenho em fotoperíodo diferente do natural. A literatura sobre o impacto da manipulação do fotoperíodo sobre o custo de produção de larvas e formas jovens em peixes é escassa.

2.6. Regulação molecular da cronobiologia em peixes

Os estudos sobre a regulação gênica do ciclo circadiano em peixes foram precedidos pelos estudos deste tipo em mamíferos. Estes mostram que o centro molecular do controle do ciclo circadiano está relacionado à interação entre duas proteínas, as proteínas *Clock* e *Bmal1*. De forma geral- não observando as particularidades biológicas de cada grupo taxonômico- pode-se dizer que, a heterodimerização destes dois fatores de transcrição ativam a transcrição de genes dos grupos *Period* (*Per1*, *Per2* e *Per3*) e *Cryptochrome* (*Cry1* e *Cry2*). Os criptocromos são proteínas fotorreceptoras do espectro de luz azul (400 a 500nm) (CASHMORE et al, 1999; BREEDLOVE, 2000) e as proteínas *Period* são as principais responsáveis pela determinação da duração do ciclo circadiano (em torno de 24 horas) (EDERY et al, 1999; GOLDBETER, 2002). O complexo proteico formado pelos transcritos dos grupos *Period* e *Cryptochrome* unem-se ao complexo CLOCK:BMAL1 e inibem a transcrição, formando um *looping* de *feedbacks* negativos levando à uma transcrição rítmica de mRNA.

A base para os estudos do mecanismo molecular para a regulação do relógio biológico foi construída tendo como modelo a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), para vertebrados os primeiros estudos foram utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) e ratos. Nos peixes, foram observados detalhes não detectados nos outros modelos. A duplicação do genoma ocorrido durante a evolução dos teleósteos causa a presença de mais isoformas dos genes-chave para o ciclo circadiano. Em teleósteos já foram identificadas seis formas do gene *Cry* (*Cry1a*, *1b*, *2a*, *2b*, *3* e *4*), quatro formas para o gene *Per* (*Per1a*, *1b*, *2* e *3*), três para o gene *Clock* (*Clock1a*, *1b* e *3*) e três para o gene *Bmal* (*1a*, *1b* e *2*) (HIRAYAMA et al., 2003; ISHIKAWA et al., 2002; WANG, 2008; VELARDE et al, 2009; WANG, 2009).

O centro molecular do relógio biológico interage com outros transcritos relacionados à atividade locomotora, consumo de alimento, crescimento e outros. Esta interação causa todos os fenômenos externos rítmicos e de interesse para os estudos da cronobiologia aplicada. Se tratando de larvicultura de peixes, transcritos relacionados ao consumo de alimento e crescimento possuem importância especial.

2.6.1. LEPTINA

Como descrito neste capítulo, a leptina é um hormônio diretamente relacionado à regulação de consumo de alimento. Os estudos sobre a síntese e função da leptina em peixes é relativamente recente. Este polipeptídeo teve sua presença em peixes ósseos evidenciada, onde sua produção ocorre no fígado e no tecido adiposo (JOHNSON; JOHNSON; LONDRAVILLE, 2000). A primeira vez em que este hormônio foi estudado a nível molecular em peixes teleósteos no ano de 2005 (KUROKAWA et al., 2005; HUISING et al., 2006) e em peixes cartilagosos em 2010 (GAMBARDELLA et al, 2010). O sequenciamento e clonagem do transcrito de leptina em peixes possibilitou aprofundamentos nos estudos dos aspectos fisiológicos deste hormônio.

Pfundt; Sauerwein (2009) utilizando as técnicas de qPCR, *Western blot* e imunohistoquímica detectaram a expressão de mRNA da leptina no fígado e tecido adiposo em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os últimos estudos sobre a distribuição da expressão do mRNA de leptina e de receptores de leptina em peixes indicam que, além do fígado e do tecido adiposo, o baço contribui com a produção de *mLeptina* e que os receptores do polipeptídeo leptina ocorre majoritariamente no encéfalo (GONG et al, 2013; ZHANG et al, 2013; TANG et al, 2013).

2.6.2. BMAL1

O fator de transcrição Bmal1 atua conjuntamente com a proteína CLOCK na modulação do ciclo circadiano, e este fator de transcrição pode ser estudado apenas após o advento das técnicas de biologia molecular, o que faz com que todos os estudos referentes à sua função e mecanismos de ação sejam muito recentes tanto em mamíferos quanto em peixes (LOWREY et al, 2000; WANG, 2009) e é transcrito principalmente no encéfalo e secundariamente nos músculos e pele (RHEE et al, 2014; WANG et al, 2017). O fotoperíodo afeta o padrão quantitativo de expressão do Bmal1 de maneiras diferentes entre as espécies de peixes, mas os estudos publicados mostram que os pontos de máxima e mínima expressão ocorrem no momento da transição entre claridade e escuridão (CERMAKIAN et al, 2000; PATIÑO et al, 2011; MARTÍN-ROBLES et al, 2012).

2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dieta e o fotoperíodo são os principais osciladores do relógio circadiano, importante modulador dos ritmos endócrinos relacionados à atividade e comportamento alimentares.

Em se tratando da larvicultura de peixes, uma fase crítica da produção, a manipulação eficiente destes fatores podem ser eficientes ferramentas para melhoria de índices zootécnicos relacionados ao crescimento e sobrevivência de larvas de peixes. Outro ponto de grande importância para a aquicultura é o uso de técnicas de análise de biologia molecular como ferramenta na pesquisa. Apesar de ferramentas consolidadas para espécies de peixes de clima temperado, para espécies neotropicais ainda são escassos. O que faz com que haja uma lacuna a ser preenchida pela ciência quando se trata de avaliar a influência da manipulação do fotoperíodo sobre transcritos relacionados à atividade alimentar e metabolismo de larvas de peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOYE, O. O. et al. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 21, n. 2, p. 225-246, 2011.

ALMAZÁN-RUEDA, P. et al. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v.67, n.4, p. 1029-1039. 2005.

ÁNGELES-ESTEBAN, M. et al. Influence of melatonin on the immune system of fish: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7979-7999, 2013.

APPELBAUM, S.; RØNNESTAD, I. Absorption, assimilation and catabolism of individual free amino acids by larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v.230, p.313-322, 2004.

BARAS, E. et al. How many meals a day to minimize cannibalism when rearing larvae of the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer*? The cannibal's point of view. **Aquatic Living Resources**, v. 24, n. 4, p. 379-390, 2011.

BARAS, E. et al. Sibling cannibalism among juvenile vundu under controlled conditions: Part II. Effect of body weight and environmental variables on the periodicity and intensity of type II cannibalism. **Journal of Fish Biology**, n. 54, p. 106–118, 1999.

BARAS, E. et al. Sibling cannibalism in dorada under experimental conditions. Part II. Effect of initial size heterogeneity, diet and light regime on early cannibalism. **Journal of Fish Biology**, n. 57, p.1021–1036, 2000.

BLANCO, A. M. et al. Unniapan, S. Ghrelin suppresses cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine, and attenuates the anorectic effects of CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (*Carassius auratus*). **Hormones and Behaviour**, v. 93, p. 62–71, 2017.

BLANCO-VIVES, B. et al. Effect of daily thermo-and photo-cycles of different light spectrum on the development of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquaculture**, v. 306, n.1, p. 137-145, 2010.

BLAXTER, J. H. S. Pattern and variety in development: Eggs and larvae. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish physiology**. 11^a ed. San Diego: Academic Press, Cap. 01, p. 01-58, 1988.

BORGES-NETO, P. G. et al. Crescimento e sobrevivência de larvas do jundiá, *Rhamdia quelen*, alimentadas com alimento vivo enriquecido e dieta artificial. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 20, n. 4, p. 216-221, 2013.

CAMPAGNOLO, R.; NUÑER, A. P. O. Survival and growth of *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces-Pimelodidae) larvae: effect of photoperiod. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.6, p.1511-1516, 2008.

CAO, Y.; TVETEN, A. K.; STEVE, A. Establishment of a non-invasive method for stress evaluation in farmed salmon based on direct fecal corticoid metabolites measurement. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 317-324, 2017.

CASHMORE, A. R. et al. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. **Science**, v. 284, n. 5415, 760-765, 1999.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal, FINEP, 189p. 1992.

CONCEIÇÃO, L. E. et al. Live feeds for early stages of fish rearing. **Aquaculture research**, v. 41, n. 5, p. 613-640, 2010.

COPELAND, D.L. et al. Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. **Frontiers on Physiology**, v. 2, n. 26, 2011.

COWAN, M.; AZPELETA, C.; LÓPEZ-OLMEDA, J. F. Rhythms in the endocrine system of fish: a review. *Journal of Comparative Physiology*, p.1-33, 2017.

DAIRIKI, J. K. et al. Lysine and arginine requirements of *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1012-1020, 2013.

DE PEDRO, N.; MARTINEZ-ALVAREZ, R.; DELGADO, M. J. Acute and chronic leptina reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Endocrinology*, v. 188, p. 513–520, 2006.

DIAS, C. A. G. M. et al. Luz, melatonina e estresse oxidativo na piscicultura. *Biota Amazonica*, v. 3, n. 3, p. 169-176, 2013.

DIEMER, O. et al. Manejo alimentar na larvicultura do mandi-pintado (*Pimelodus britskii*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 3, 2010.

ELBAZ, I. et al. Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish. *Frontiers on neural circuits*, v. 17, 2013.

EKSTRÖM, P.; MEISSL, H. The pineal organ of teleost fishes. *Fish Biology and Fisheries*, v. 7, p. 199–284, 1997.

FALCÓN, J. et al. Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinology*, n. 144, v. 10, p. 4648-4658, 2003.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome, 2018.

- FELIZARDO, V. O. et al. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p.648-652, 2010.
- FERREIRA, C. S. et al. Melatonina: modulador de morte celular. *Revista da Associação Médica Brasileira*, n. 56, v. 6, p. 715-718, 2010.
- FJELLDAL, P. G. et al. Continuous light induces bone resorption and affects vertebral morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a phosphorous deficient diet. *Aquaculture Nutrition*, n. 18, v. 6, p. 610-619, 2012.
- FRØILAND, E. et al. Leptin and ghrelin in anadromous Arctic charr: cloning and change in expressions during a seasonal feeding cycle. *General Comparative Endocrinology*, n. 165, p. 136–143, 2010.
- GAMBARDELLA, C. et al. First evidence of a leptin-like peptide in a cartilaginous fish. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, n. 293, v. 10, p. 1692-1697, 2010.
- GANECO, L. N. et al. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n.2, p. 131-138, 2001.
- GRILL, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. **Frontiers of Neuroendocrinology**, v. 31, p. 61–78, 2010.
- GOLDBETER, A. Computational approaches to cellular rhythms. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 238-245, 2002.
- GOMES, R. Z. et al. Early development of *Brycon orthotaenia* (Pisces: Characidae). **Zygote**, v. 21, n. 1, p. 11-20, 2013.
- GONG, Y. et al. Characterization and tissue distribution of leptin, leptin receptor and leptin receptor overlapping transcript genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 182, p. 1–6, 2013. doi:10.1016/j.ygcen.2012.11.006
- HECHT, T.; PIENAAR, A. G. A review of cannibalism and its implications in fish larviculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, n. 2, p. 246-261, 1993.
- HERRERO, M. J.; MADRID, J. A.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. (2003). Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). **Chronobiology International**, v. 20, p. 1001–1017, 2003.
- HONORATO, C. A. et al. Crescimento e sobrevivência de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentadas com microdietas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.23, n.1-2, p.71-75, 2016.
- HUISING, M.O. et al. Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. **Endocrinology**, v. 147, p. 5786–5797, 2006.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 44, 2016. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf, acessado em 16/04/2019.

ICMBio. Ministério do Meio Ambiente. **Sumário Executivo: Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 2016. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf, acessado em: 24/04/2017.

ISORNA, E. et al. Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. **Journal of Endocrinology**, n. 232, v. 3, p.141-159, 2017.

JOHNSON, R. M.; JOHNSON, T. M.; LONDRVILLE, R. L. Evidence for leptin expression in fishes. **Journal of Experimental Zoology**, n. 286, v. 7, p. 718-724, 2000.

JOMORI, R. K. et al. Água levemente salinizada aumenta a eficiência da larvicultura de peixes neotropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 48, v. 8, p. 809-815, 2013.

KEATS, D. W. A nocturnal inshore movement of juvenile cod *Gadus morhua* L. in eastern Newfoundland. **Journal of Marine Biology and Ecology**, v. 139, p. 167-173, 1990.

KITAGAWA, A. T. et al. Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 211-218, 2015.

KOWALSKI, L. H. et al. Leptina e grelina na produção de ruminantes. *Revista de Ciências Agrárias*, n. 37, v. 4, p. 375-383, 2014.

KUROKAWA, T.; MURASHITA, K. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **General Comparative Endocrinology**, v. 161, p. 229–237, 2009.

KUROKAWA, T.; UJI, S.; SUZUKI, T. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. **Peptides**, v. 26, p. 745–750, 2005.

LANDINES, M. A., et al. The influence of triiodothyronine (T₃) on the early development of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1291-1296, 2010.

LAZADO, C. C. et al. Circadian rhythmicity and photic plasticity da myosin gene transcription in fast skeleton muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Marine Genomics**, v. 18, p. 21-29, 2014.

LIN, X. et al. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 126, p. 415–434, 2000.

LI, M.D. Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 84, p. 1–7, 2011.

- LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Melatonin partially minimizes the adverse stress effects in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, v. 388-391, n. 15, p. 165-172, 2013.
- LOWREY, P. L. et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, v. 288, n. 5465, p. 483-491, 2000.
- MACIEL, C. M. R. R. et al. Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 5, p. 961-970, 2010.
- MAITRA, S. K. et al. Melatonin: A potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. *General and Comparative Endocrinology*, v. 181, n. 1, p. 215-222, 2013.
- MARTÍN-ROBLES, Á. J. et al. Cloning, tissue expression pattern and daily rhythms of Period1, Period2, and Clock transcripts in the flatfish Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Comparative Physiology B*, n. 182, v. 5, p. 673-685, 2012.
- MENDONÇA, P. P. et al. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Archivos de zootecnia*, v. 58, n. 223, p. 323-33, 2009.
- NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento manual de identificação de ovos e larvas de peixes brasileiros de água doce**. Maringá, EDUEM. 378p. 2001.
- NAGASAWA, K.; GIANNETTO, A.; FERNANDES, J. M. Photoperiod influences growth and mll (mixed-lineage leukaemia) expression in Atlantic cod. *PLoS One*, n. 7, v.5, 2012.
- NAUMOWICZ, K. et al. Intracohort cannibalism and methods for its mitigation in cultured freshwater fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 27, n. 1, p. 193-208, 2017.
- NIKAIDO, Y. et al. Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A, n. 155, p. 84-90, 2010.
- NISEMBAUM, L. G. et al. Orexin as an input of circadian system in goldfish: Effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides*, n. 52, p. 29–37, 2014.
- NÚÑEZ, J. et al. Hatching rate and larval growth variations in *Pseudoplatystoma punctifer*: maternal and paternal effects. *Aquaculture Research*, n. 42, v. 6, p. 764-775, 2011.
- PEREIRA, L. S.; AGOSTINHO, A. A.; WINEMILLER, K. O. Revisiting cannibalism in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, n. 27, v. 3, p. 499-513, 2017.
- PEREIRA, A. S.; OLIVEIRA NUÑER, A. P. Utilização de diferentes densidades, dietas e formatos de tanque na larvicultura da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 Characiformes, Characidae. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, n. 25, v. 1, p. 55-61, 2003.
- PFUNDT, B.; SAUERWEIN, H.; MIELENZ, M. Leptin mRNA and Protein Immunoreactivity in Adipose Tissue and Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Immunohistochemical Localization in Liver. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, v. 38, n. 6, p. 406–410, 2009. doi:10.1111/j.1439-0264.2009.00951.x

- PICCINETTI, C. C. et al. Melatonin and peripheral circuitries: insights on appetite and metabolism in *Danio Rerio*. **Zebrafish**, v. 10, n. 3, p. 275-282, 2013.
- PORTELLA, M. C. et al. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. **Aquaculture**, n. 432, p. 402-417, 2014.
- PRAYOGO, N. A. et al. Effect of photoperiods on melatonin levels, the expression of cGnRH-II and sGnRH genes and estradiols level in hard-lipped barb (*Osteochilus hasselti* C.V.). **Global Veterinaria**, v. 8, n. 6, p. 591-597, 2012.
- RAHMAH, S. et al. Improved survival and growth performances with photoperiod and feeding schedule manipulation in bagrid catfish *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes 1840) larvae. *Aquaculture research*, v. 45, n.3, p. 501-508, 2014.
- RHEE, J.S. et al. Cloning of circadian rhythmic pathway genes and perturbation of oscillation patterns in endocrine disrupting chemicals (EDCs)-exposed mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 164, p. 11–20, 2014. doi:10.1016/j.cbpc.2014.04.001
- REN, D. L. et al. Exogenous melatonin inhibits neutrophil migration through suppression of ERK activation. *Journal of endocrinology*, n. 227, v. 1, p. 49-60, 2015.
- REYNALTE-TATAJE, D. et al. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 439-443, 2002.
- REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 26, n.1, 67-71. 2004.
- ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel da leptina e da grelina na gênese da obesidade, *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.
- SALARO, A. L. et al. Desenvolvimento de alevinos de trairão (*Hoplias lacerdae*) na ausência de luz. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v.28, n.1, p. 47-50, 2006.
- SALES, A. D. et al. Fotoperíodo e frequência alimentar na larvicultura do peixe beta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 4, p. 1062-1068, 2016.
- SEIXAS FILHO, J. T. D. et al. Determinação do sistema endócrino difuso nos intestinos de três Teleostei (pisces) de água doce com hábitos alimentares diferentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 30, v. 5, p. 1403-1408, 2001.
- SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. D. O. Growth and survival of dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 50, v.3, p. 435-444, 2007.
- SCHULZ, U. H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, n. 66, v.2A, p. 565-574, 2006.
- SHAHKAR, E. et al. Effects of photoperiod manipulation on growth performance and hematological responses of juvenile Caspian Roach *Rutilus rutilus caspicus*. **Fisheries and Aquatic Science**, v. 18, n. 1, p. 51-56, 2015.

- SINGH, R.; SINGH, A. K.; TRIPATHI, M. Melatonin induced changes in specific growth rate, gonadal maturity, lipid and protein production in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, n. 25, v. 1, p. 37-43, 2012.
- SOARES, C. M. et al. Plâncton, Artemia sp, dieta artificial e suas combinações no desenvolvimento e sobrevivência do quinguio (*Carassius auratus*) durante a larvicultura. **Acta Scientiarum**, n. 22, v. 2, p. 383-388, 2000.
- SOUZA, E. C. M. et al. Aggressiveness and locomotion activity related to hatching time in Matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Applied Animal Behaviour Science**, n. 157, p. 146-151, 2014.
- TANG, Y. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of multiple leptin genes in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, n. 166, v. 2, p. 133–140, 2013. doi:10.1016/j.cbpb.2013.07.009
- TAYLOR, J. F. et al. Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-I levels in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, n. 142, p. 169–185, 2005.
- TINOCO, A.B. et al. Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. **Peptides**, v. 34, p. 329–335, 2012.
- VALLÉS, R.; ESTÉVEZ, A. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture**, v. 376, p.15-19, 2013.
- VELARDE, E. et al. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina, liver, and gut. **Journal of biological rhythms**, n. 24, v. 2, p. 104-113, 2009.
- VERAS, G. C. et al. Influence of photoperiod on growth, uniformity, and survival of larvae of the Amazonian ornamental *Heros severus* (Heckel, 1840). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 7, p. 422-426, 2016.
- VILLAMIZAR, N.; GARCÍA-ALCAZAR, A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Effect of light spectrum and photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture**, v. 292, n. 1, p. 80-86, 2009.
- VILLAMIZAR, N.; VERA, L. M.; FOULKES, N. S.; Sánchez-Vázquez, F. J. Effect of lighting conditions on zebrafish growth and development. **Zebrafish**, v. 11, n. 2, 2014.
- VOLKOFF, H., EYKELBOSH, A.J., PETER, R.E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. **Brain Research**, v. 972, p. 90–109, 2003.
- VOLKOFF, H. Appetite regulating factors in dourado, *Salminus brasiliensis*: cDNA cloning and effects of fasting and feeding on gene expression. **General and comparative endocrinology**, n. 237, p. 34-42, 2016.
- WANG, H. Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 67, n. 1, p. 29-40, 2008.
- WANG, H. Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes. **Genetica**, v. 136, n.1, p. 149-161, 2009.

WANG, Y. et al. Molecular cloning, characterisation, tissue distribution, and mRNA expression changes under different light regimes of brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) in *Columba livia*. **Avian Biology Research**, v. 10, n. 3, p. 156-163, 2017.

WARGELIUS, A. et al. Continuous light affects mineralization and delays osteoid incorporation in vertebral bone of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 656-661, 2009.

WATZ, J. Stress responses of juvenile brown trout under winter conditions in a laboratory stream. **Hydrobiologia**, pp. 1-10, 2017.

ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory Fishes of the Uruguay River. In' CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C. AND BAER, A. (Eds.) Migratory Fishes of the South America' Biology, Social Importance and Conservation Status. **World Fisheries Trust**, p. 157- 194. 2003.

ZHANG, H. et al. Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **General and comparative endocrinology**, v. 181, p. 295-305, 2013.

ZHOU, C. et al. Evidence that ghrelin may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), **Fish Physiology Biochemistry**, v. 42, p. 1637–1646, 2016.

CAPÍTULO 2

This article was written following the norms of the Aquaculture journal, available at: <https://www.elsevier.com/journals/aquaculture/00448486/guide-for-authors>

PHOTOPERIODS AND DIETS TO CONTROL THE CANNIBALISM IN THE LARVICULTURE OF PIRACANJUBA, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850)

Authors: José Gilmar da Silva Souza¹; Mariana Almeida Torquete¹; Carlos Antonio Martínez-Plácios²; Luis David Solis-Murgas¹

¹Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacan, México.

Abstract

Photoperiod and diet are the main synchronizers of the biological clock and exert great influence on the zootechnical performance. The objective of this work was to evaluate the effects of different photoperiods (12L: 12D and 24: 00D) and diets (artemia nauplii and microaggregated diet) on the initial larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Piracanjuba larvae with initial weight of 1.26 ± 0.24 mg, total length of 3.98 ± 0.43 mm, standard length of 3.57 ± 0.38 mm and height of 0.65 ± 0.08 mm. The larvae were stored in plastic trays with two liters of water at storage density of 15 larvae / liter and kept in cabins with controlled photoperiod for 10 days. It was observed that the photoperiod did not influence the zootechnical parameters ($p > 0.05$) and the diet influenced the percentage of survival ($p < 0.05$). Regarding the cannibalism rate, it was observed that, independently of the photoperiod in which they were kept, larvae fed with artemia nauplii presented lower cannibalism rate ($p < 0.05$) and fish fed with a micro aggregated diet created in 12L: 12D photoperiod have higher rates of cannibalism. Cannibalism rate is linked to larval uniformity are linked, where higher rates of cannibalism were observed in experimental units where uniformity is lower. In conclusion, diet and photoperiod influence on the performance of piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) in the early stages of larval farming. Feeding with artemia nauplii and 24L: 00D photoperiod reduce the rates of cannibalism in intensive piracanjuba larvae.

Keywords: Cannibalism; Aquaculture; Neotropical fishes; Luminosity; Growth.

1. Introduction

The cannibalism during larviculture always has been a concern for several species of fishes (Hecht et al., 2003; Naumowicz et al., 2007), and as old and frequent as the concern are the efforts to minimize the negative effects of this behavior. Research on techniques and technologies to reduce cannibalism rates in fish larvae is proportional to the commercial importance of the target species. Following the growing trend in Neotropical fish production, the attention and research have turned to the quest for reducing cannibalism in species with aquaculture potential.

The cannibalism in larviculture is associated with several factors, but most of the literature associates with the welfare conditions (MANLEY et al, 2014; SHOURBELA; WALEED; EL-RAHMAN, 2016) and nutritional factors (ALTAFF; JANAKIRAMAN, 2013; MANLEY et al. to 2015). However, some Neotropical fishes listed as great potentials for aquaculture have cannibal behavior during the young stages, such as dourado (*Salminus brasiliensis*), *Pseudoplatystoma* catfish and *Brycon* fish. The literature shows that the manipulation of the photoperiod and the diet offered influence the rates of cannibalism (PUVANENDRAN; BROWN, 2002; GIRI, et al, 2002; TUCKER et al., 2006; KRÓL; ZIELIŃSKI, 2015).

Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) is a neotropical species with great potential for production and is founded naturally in the Rio da Prata basin, which includes Brazil, Argentina and Uruguay. This species exhibits cannibal behavior during the larval phase, which begins after the opening mouth and, under normal conditions, reduce over time. Efforts to mitigate cannibalism losses should focus on the first days of life. Despite their productive potential, studies that aim to minimize the effects of cannibalism on piracanjuba larviculture are still scarce.

Reynalte-Tataje et al. (2002) observed that piracanjuba larvae in total darkness (photoperiod 00L: 24D) present high rates of cannibalism, recommending constant luminosity as appropriate. However, the authors do not correlate with the diet offered, making it necessary to investigate the possible effects of the initial diet and its combination with the effects of photoperiod manipulation. Another important point is the viability of the early insertion of inert food. Although little studied in Neotropical species, the costs of acquiring and producing live food (whether larvae of fish species with less

economic value or artemia nauplii) make it necessary to clarify the effects of the early replacement of live food by artificial food.

The photoperiod and the food supply are two of the main oscillating factors of the circadian clock, and the interaction of these can interfere with the biological rhythm, in order to alter the feeding behavior of fish affecting the cannibalism rates (TUKER et al., 2006; SCHÜTZ; NUÑER, 2007). Molecular tools are being widely used to clarify unexplained points at macroscopic or microscopic levels, explaining phenotypic observations more accurately.

Leptin is a hormone related to food satiety, acting as an appetite suppressant, and its presence in fish (KUROKAWA; UJI; SUZUKI, 2005; PROKOP et al, 2012; GORISSEN; FILK, 2014) related to cannibalism (FRENCH et al, 2009). The Bmal1 (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1-ARNTL1*) is a transcription factor, a component of the circadian cycle machinery, that when heterodimerized originates the Period (*mPer*) and Cryptochrome (*mCry*) transcripts proteins (CARDONE et al, 2005; Hirayama et al., 2007). Bmal1 is an important factor in the perception of changes in environmental luminosity, an abiotic factor pointed out as one of the main circadian synchronizers. Another function associated with Bmal1 is its metabolic function, and its low expression is associated with low body weight (SCHIAFFINO; BLAAUW; DYAR, 2016).

This work is pioneer in associating the transcription of *mLeptina* and *mBmal1* and cannibalism in fishes. This study have as hypothesis the manipulation of the photoperiod and the supply of adequate diet reduce cannibalism rates without harming the performance of animals. That the rates of cannibalism will be inversely proportional to the levels of expression of *mLeptina*, and that the expression levels of *mBmal1* oscillation presentation as a function of the photoperiod. The objective of this work was to find the best combination between photoperiod and diet to reduce rates of cannibalism among piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*).

2. Materials and methods

2.1. Ethical precepts

The Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Lavras, approved the methodology of this experiment, certificate 017/16.

2.2. Experimental methodology

We performed this experiment at the Central Biotério of the Federal University of Lavras, Minas Gerais, Brazil, with a total duration of 10 days. A total of 480 larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) were used, initial weight 1.26 ± 0.14 mg, total length of 3.98 ± 0.43 mm, standard length of 3.57 ± 0.38 mm and height of 0.65 ± 0.08 mm ($n = 24$). The body weight was determined by analytical balance; model AY220, we take the morphometric measurements by stereoscopic loupe (3X magnification) and the larvae photographed were measured using the Motic Image Plus 2.0® software.

The larvae were adapted to the laboratory conditions for five days, in a tank with a total volume of 100 liters and constant oxygenation, in a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness. During this period, the Piracanjuba larvae ate larvae of Curimba (*Prochilodus lineatus*) and *Artemia nauplii*, *ad libitum*. After the adaptation period, the larvae were randomly distributed one by one in the experimental units, plastic trays of total volume of 3 liters containing 2 liters of water. The experimental units were placed in enclosed cabins for insulation from the external environment and photoperiod control. The larvae were stored in the experimental units at a density of 15 larvae / liter (JOMORI et al, 2013), totaling 30 larvae per experimental unit.

We carried out this experiment in a completely randomized design and organize the treatments in a 2x2 factorial arrangement; each treatment had four replicates, totaling 16 experimental units. Two photoperiods were tested: 12 hours of light: 12 hours of darkness (12L: 12D) and 24 hours of light and 00 hours of darkness (24L: 00D) along with two types of food (Tab. 1): micro aggregated diet and *artemia nauplii*. The micro aggregated diet (Fig. 3) was offered *ad libitum*, observing the minimum limit of 15% of the live weight of each larva and offered until apparent satiety (indicated when the larvae did not show interest in the food, not addressing the food when offered). The *artemia nauplii* was offered in the amount of 1250 *Artemia nauplii* / day / larva (JOMORI et al, 2013). In the photoperiod booth, 1060-lux tubular fluorescent lamps and analog timer controlled the photoperiod.

Table 1: Bromatological composition of diets used during initial feeding experiment of piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) in different photoperiods.

Diet	Crude protein, %	Lipids, %	Humidity, %	Ashes, %	Size, μm
Micro aggregated diet	52.0	19.0	3.5	9.8	<100
<i>Artemia nauplii</i>	44.0	22.0	-	10.0	300-500

Micro aggregated diet: experimental diet elaborated by the Laboratory of Nutrigenomics and Microbiology Digestive Animal of the Michoacan University of San Nicolás de Hidalgo, Mexico. Artemia nauplii: newly hatched artemia nauplii, following protocol proposed by the supplier.

During the experimental period, we monitored the water temperature (digital thermometer Incoterm©), pH (digital parameter PH-009©), dissolved oxygen (microprocessed oximeter model AT-155©), total and toxic ammonia (colorimetric kit LabconTest©). At the end of the experiment were quantified survival, apparent cannibalism, specific growth rate, standard and total length, ocular diameter, maximum mouth opening and batch uniformity. The rate of apparent cannibalism was determined by subtracting the number of dead larvae found from the absolute mortality recorded at the end of the experiment. The specific growth rate, lot uniformity and mouth size using following equations:

$$SGR(\%/day) = \left(\frac{nlfW - nliW}{t} \right) * 100$$

SGR: specific growth rate; *nl*: is natural logarithm; *iW*: is the starting weight; *fW*: is final weight; *t*: experimental time.

$$U(\%) = \left(\frac{N \pm 10\%}{tN} \right) * 100$$

U: uniformity rate; *N ± 10%*: number of larvae that are within the weight range of 10% around the mean; *Nt*: total number of larvae.

$$mmo = sml * \sqrt{2}$$

mmo: maximum mouth opening; *sml*: superior maxillary length (SHIROTA, 1970).

2.3. Extraction, purification, quantification of total RNA and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from post-larvae frozen pool samples (n = 3 larvae/ pool), thus pooling each experimental unit (n = 4) using the commercial kit ReliaPrep™ RNA Tissue Prep System (Promega), following the manufacturer's recommendations. The total RNA obtained was quantified using NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). We performed

the reverse transcriptase (RT-PCR) reactions to obtain single-strand cDNA templates using the GoScript™ Reverse Transcription System Kit (Promega) commercial kit, following the manufacturer's recommendations. The obtained cDNA was stored at -20 °C and then used for the quantitative real-time PCR assay (RT-qPCR).

2.4. Design and validation primers

The forward and reverse sequences for each transcript designed based on conserved regions of nucleotide sequences from the *mLeptine* and *mBmall* transcripts of different fish species deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. For the localization and selection of conserved regions, we aligned such sequences with the online tool EMBL-EBI ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment Tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Then, the primer sequences were evaluated for their characteristics using the Primer Quest Tool program. In addition, we check the primers for their specificity, comparing them, through the BLAST program, with the database deposited in the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

To assess the linearity and efficiency of the primers, standard curves with serial dilutions (1: 5, 1:25, 1: 125, 1: 625 and 1: 3125) of the cDNA were determined. The levels of Leptin and Bmall mRNA were determined in the 7500 Fast™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), the reaction consisting of Platinum™ SYBR™ Green (Applied Biosystems®), 0.5 ng cDNA and 0.4 μM each primer (forward and reverse). The pair of primers, amplicon size obtained by PCR, for each of the genes of interest, showed in Table 8.

2.5. Statistical analyzes

The data of zootechnical performance and morphometry were submitted to the Shapiro-Wilk normality test, the data that did not meet the normality parameters were analyzed by generalized linear models procedure, and the comparisons between treatments performed through the non-parametric Mann-Whitney. When the assumptions were met for parametric analysis, Two-way ANOVA was applied and when the significance was verified ($p < 0.05$). To verify the correlation between the variables we used Pearson's correlation test. To evaluate possible correlations between the expression of *mLeptina* and *mBmall* and the performance variables the analysis of main components was applied.

Statistical analyzes were performed using software R 3.5.0 (R CORE TEAM, <https://www.r-project.org/>) and Past 3.22 © (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

3. Results

The water quality data during the experiment are in the table below (Tab. 2).

Table 2. Water quality variables analyzed during initial feeding experiment of piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) in different photoperiods.

	12L:12D		24L:00D	
	Artemia nauplii	Micro diet	Artemia nauplii	Micro diet
Water temperature (°C)	24.24±0.73	24.28±0.77	25.65±0.91	25.64±0.64
pH	6.70±0.17	6.50±0.18	6.56±0.20	6.42±0.18
Dissolved oxygen (mg/L)	4.07±1.17	3.17±0.76	4.27±1.24	2.58±0.91
Toxic ammonia (ppm)	0.002±0.001	0.002±0.001	0.003±0.002	0.002±0.002

Mean ± standard deviation of mean. 12L: 12D- 12 hours of light and 12 hours of darkness; 24L: 00D- 24 hours of light and 00 hours of darkness. Artemia- Feeding using artemia nauplii; Micro diet- Food with micro aggregated artificial diet.

The larvae fed with artemia had a higher survival rate ($p < 0.05$) (Table 3). For the variables related to morphometry and final weight, the treatments did not exert a significant effect ($p > 0.05$). For the cannibalism rate (Fig. 3A) and uniformity rate (Fig. 3B), there was a significant effect of the interaction ($p < 0.05$) between the diet and the photoperiod to which the larvae were submitted. For ocular diameter (Fig. 4A) and mouth opening (Fig. 4B) no significant effect ($p > 0.05$) of the treatments was observed. Variables related to weight gain and morphometry show a high degree of positive correlation between them (Tab.4). On the other hand, survival and uniformity rates show a negative correlation with the rate of cannibalism (Tab.4). The larval length distribution of the larvae after the experiment (Fig. 5) indicates that fish fed with artemia nauplii (Fig. 5A and B), independently of the photoperiod, present a high uniform distribution of fish size.

Table 3: Zootechnical performance in experiment of initial feeding of piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) in different photoperiods.

	Artemia nauplii		Micro diet		Diet	<i>p-value</i>	
	12L:12D	24L:00D	12L:12D	24L:00D		Photoperiod	Diet*Photoperiod
Survival, %	79.17±6.58	88.33±0.96	12.50±5.34	16.67±4.30	0.000*	0.187ns	0.610ns
Total length, mm	5.95±0.07	6.10±0.04	6.48±1.17	4.87±0.31	0.561ns	0.240ns	0.163ns
Standard length, mm	5.18±0.05	5.22±0.05	5.47±0.89	4.28±0.14	0.492ns	0.228ns	0.196ns
Final weight, mg	31.61±1.73	36.17±1.90	45.56±19.33	15.36±2.17	0.659ns	0.251ns	0.120ns
Weight gain, mg	30.31±1.73	34.87±1.73	42.26±19.33	14.06±2.17	0.659ns	0.251ns	0.120ns
Specific growth rate, %/day	39.83±0.69	41.52±0.63	38.53±7.15	30.53±1.62	0.122ns	0.410ns	0.214ns

Mean ± standard error of the mean. 12L: 12D- 12 hours of light and 12 hours of darkness; 24L: 00D- 24 hours of light and 00 hours of darkness. Artemia- Feeding using artemia nauplii; Microdieta- Feeding using micro aggregated artificial diet; * significant (ANOVA, $p < 0.05$); ns non-significant (ANOVA, $p > 0.05$).

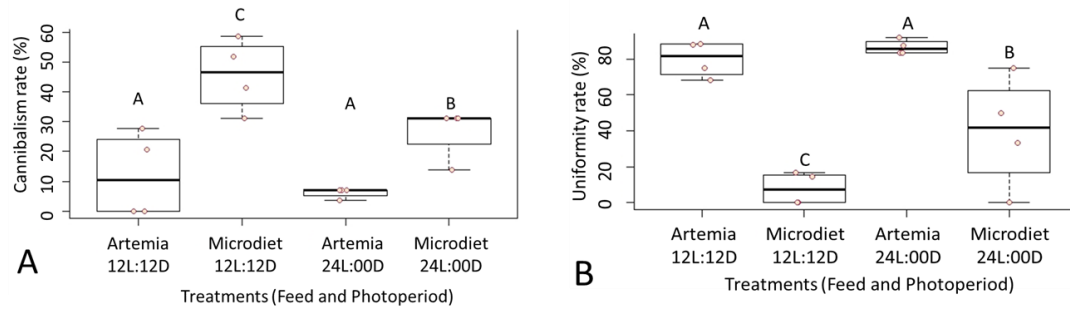


Figure 3. Cannibalism (A) and uniformity (B) rates observed during initial feeding experiment of piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) in different photoperiods. Boxes with different letters differ from each other (Mann-Whitney test, $p < 0.05$).

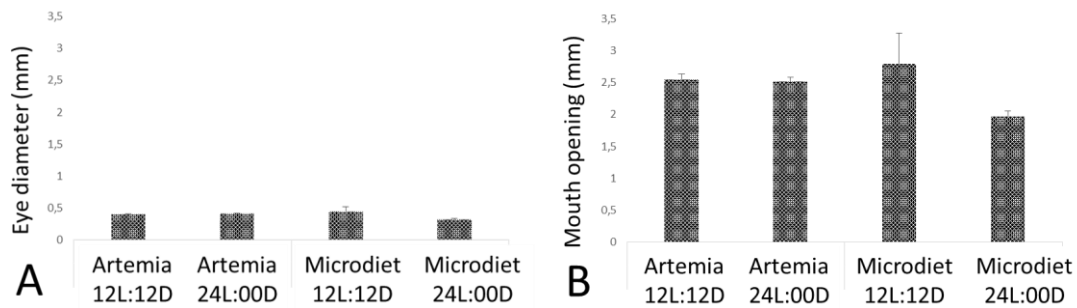


Figure 4: Ocular diameter (A) and mouth opening (B) of post-larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) after experiment of initial feeding in different photoperiods in larviculture. There was no significant effect of treatments on these variables (ANOVA, $p > 0.05$).

Table 4: Correlation between performance indicators and morphometric variables of post-larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) after initial feeding experiment in different photoperiods in larviculture.

	Final weight	Weight gain	Specific growth rate	Survival	Cannibalism rate	Uniformity rate	Total length	Standart length	Ocular diameter	Opening mouth
Final weight	-									
Weight gain	1.00*	-								
Specific growth rate	0.95*	0.95*	-							
Survival	-0.02 ^{ns}	-0.02 ^{ns}	0.23 ^{ns}	-						
Cannibalism rate	0.25 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.00 ^{ns}	-0.84*	-					
Uniformity rate	-0.15 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.87*	-0.76*	-				
Total length	0.99*	0.99*	0.96*	0.01 ^{ns}	0.21 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	-			
Standart length	0.99*	0.99*	0.96*	0.03 ^{ns}	0.19 ^{ns}	-0.07 ^{ns}	0.99*	-		
Ocular diameter	0.97*	0.97*	0.94*	0.04 ^{ns}	0.19 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.97*	0.98*	-	
Opening mouth	0.97*	0.97*	0.94*	0.00 ^{ns}	0.26 ^{ns}	-0.12 ^{ns}	0.98*	0.98*	0.97*	-

Pearson's correlation, * significant (p <0.05) ns non-significant (p > 0.05).

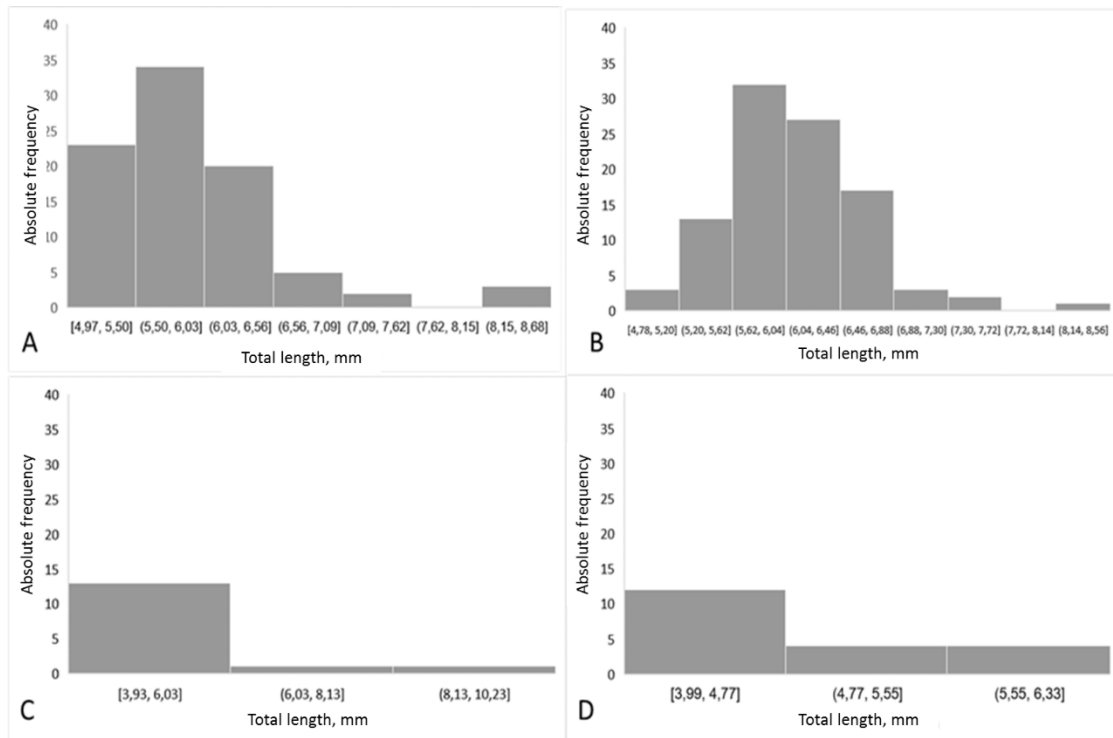


Figure 5: Histogram of total lengths of piracanjuba post-larvae (*Brycon orbignyanus*) after experiment of different initial diets and photoperiods in larviculture. A-12L: 12E fed with artemia nauplii; B-24L: 00D fed with artemia nauplii; C-12L: 12D fed with micro aggregated diet; D-24L: 00D fed with micro aggregated diet.

3.1. *mLeptin* and *mBmall* expression

There was an effect of diet and luminosity ($p < 0.05$) on *mLeptin* expression (Fig. 6), and interaction effect ($p < 0.05$) between these factors. Larvae maintained in constant luminosity and fed with artemia presented higher expression of *mLeptin* (Fig. 7). For the *mBmall* transcript, only the interaction between diet and photoperiod was observed ($p < 0.05$), the highest levels of expression were observed in larvae kept in constant luminosity and fed with artemia nauplii and larvae kept in 12 hours light: 12 hours of darkness and fed with micro aggregated diet (Fig. 8). The clustering analysis, by major components (Fig. 9), shows the expression of *mLeptin* is highly related to the survival rate of the larvae and is inversely proportional to the rate of cannibalism. The expression of *mBmall* has a great correlation with the final weight of the piracanjuba larvae (Fig. 10).

Table 5: Sequences used for quantitative expression of target transcripts, amplicon size, and efficiency and aligned sequences to obtain primers.

Transcript	Sequence (<i>Forward e reverse</i>)	Amplicon size	R ²	Efficiency	Aligned sequences
<i>Leptina</i>	5'- ACT CCC AGA ATC CAG AAA CAC AG -3' 5'- ATG GGT TTA TCA GAC GGC AGC -3'	101pb	0.796	97.00%	<i>Oryzias latipe</i> (AB193548.2); <i>Hippocampus erectus</i> (KP888952.1); <i>Takifugu rubripes</i> (AB193547.1); <i>Pelteobagrus fulvidraco</i> (JQ288727.1); <i>Danio rerio</i> (NM_001128576.1); <i>Ctenopharyngodon idella</i> (EU719623.1); <i>Culter alburnos</i> (KC782834.1); <i>Carassius auratus</i> (FJ534535.1); <i>Labeo rohita</i> (GU365868.1).
<i>Bmall</i>	5'- CGA CGA AGA CAA TGA AGA ACC -3' 5'- TCA CCC TGA TGT CTG CCA -3'	116pb	0.914	99.91%	<i>Danio rerio</i> (NM_131577.1); <i>Siniperca chuatsi</i> (KP702269.1); <i>Halichoeres trimaculatus</i> (HQ893882.2); <i>Sparus aurata</i> (JQ965013.1); <i>Astatotilapia burtoni</i> (DQ923858.1).
<i>Efa1</i>	5'- GGC TGG TAT CTC CAA GAA CGG A -3' 5'- GAT AAG CTG CTT CAC TCC CAG G -3'	76pb	0.985	90.92%	<i>Scyliorhinus canicula</i> (KU310672.1); <i>Danio rerio</i> (L23807.1); <i>Platycephalus bassensis</i> (KP893716.1).
<i>β-actina</i>	5'- CTG GTT GTT GAC AAC GGA T -3' 5'- TGT CCT TCT GGC CCA TAC -3'	133pb	0.942	99.91%	<i>Sinibotia reevesae</i> (KC513485.1); <i>Rhodeus uyekii</i> (KJ867513.1); <i>Elopichthys bambusa</i> (JN102135.1); <i>Carassius auratus</i> (AB039726.2); <i>Onychostoma macrolepis</i> (JN254630.1); <i>Channa argus</i> (KX925979.1); <i>Dicentrarchus labrax</i> (AJ537421.1); <i>Tilapia mossambica</i> (AB037865.1); <i>Sebastes schlegelii</i> (JN226153.1); <i>Platichthys stellatus</i> (JN226149.1); <i>Larimichthys crocea</i> (GU584189.1); <i>Trachurus japonicus</i> (JN226154.1); <i>Girella punctata</i> (JN226151.1); <i>Oplegnathus fasciatus</i> (FJ975145.1) ; <i>Pagrus major</i> (JN226150.1)

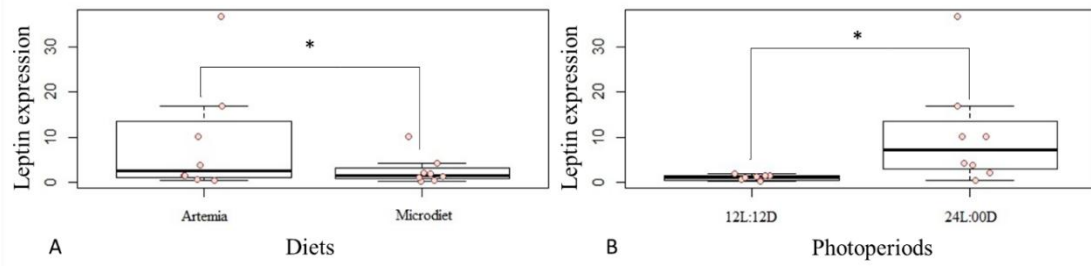


Figure 6. Effect of diet (A) and photoperiod (B) on the expression of *mLeptin* in larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) in larval experiment; n = 4 post-larvae / treatment. Boxes accompanied by asterisks differ by Mann-Whitney test (p<0.05).

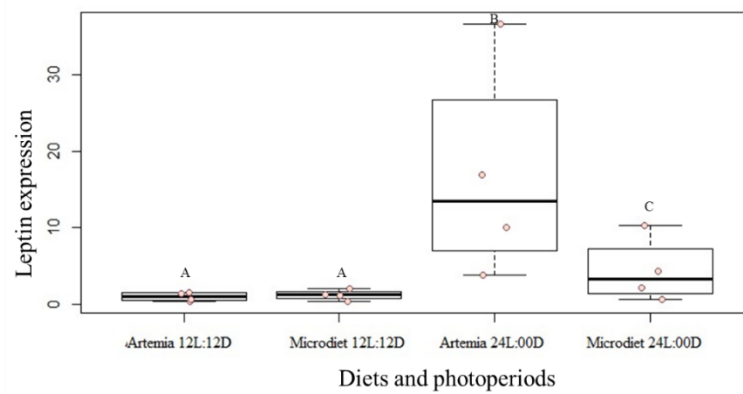


Figure 7. Expression of *mLeptin* in piracanjuba larvae (*Brycon orbignyanus*) after larval experiment with different initial diets and photoperiods; n = 4 post-larvae / treatment. Boxes accompanied by different letters, differ by Mann-Whitney test (p<0.05).

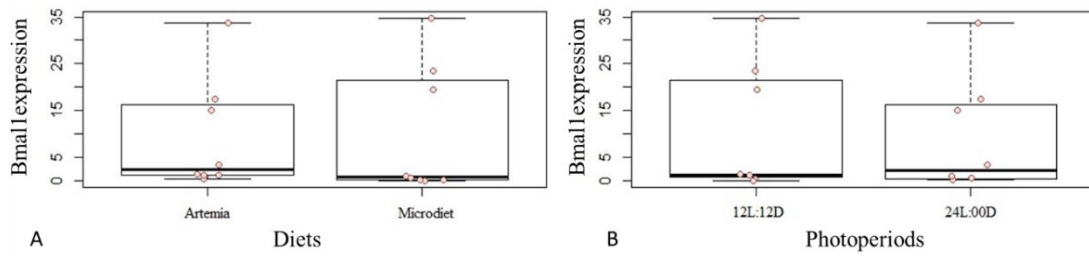


Figure 8. Effect of photoperiod (A) and diet (B) on the expression of *mBmall* in larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) in larval experiment; n = 4 post-larvae / treatment. The treatments did not differ by Mann-Whitney test ($p > 0.05$).

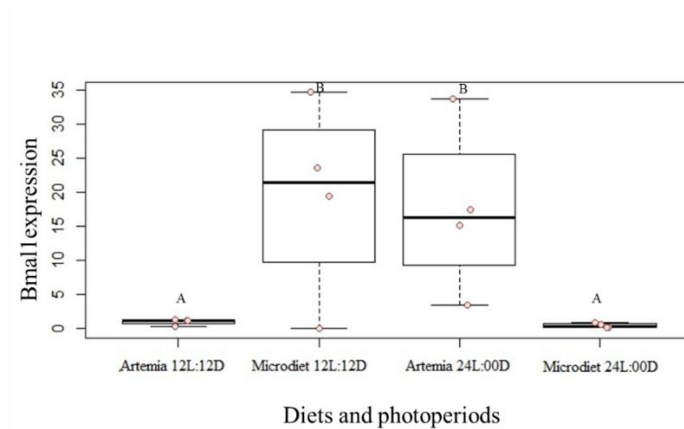


Figure 9. *Bmall* expression in larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) after larval experiment with different initial diets and photoperiods, n = 4 post-larvae / treatment. Boxes accompanied by different letters, differ by Mann-Whitney test.

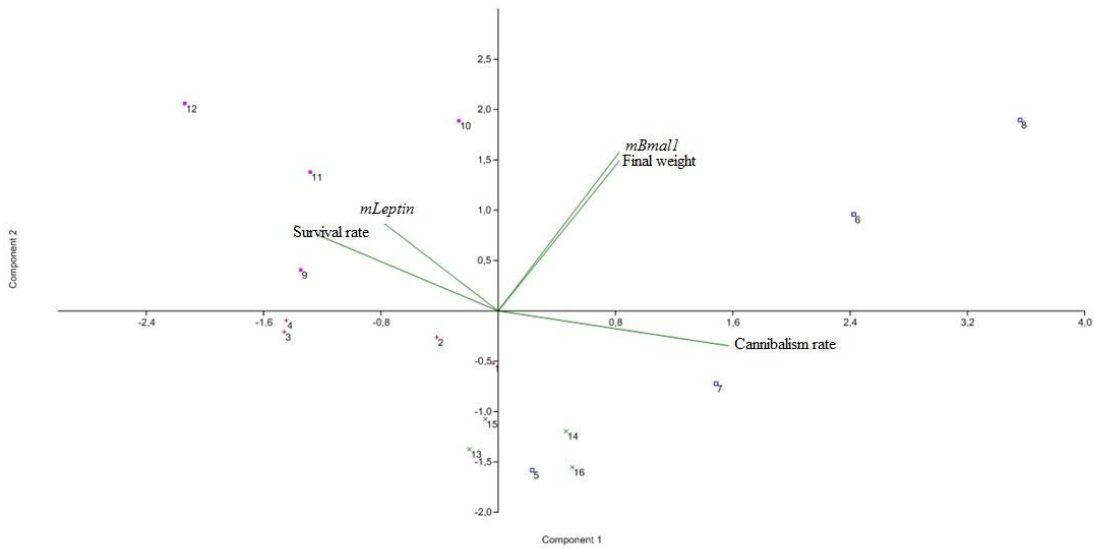


Figure 10. Biplot graph of main components analysis (PCA) of the interaction of Leptin and Bmal1 transcription with survival rate, final weight and cannibalism rate of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) larvae after larviculture in different photoperiods and different diets.

4. Discussion

4.1. Zootechnical performance

The water quality parameters were within the tolerance range for tropical fish (PEDREIRA et al, 2008; PEDREIRA et al, 2012; BOYD and TUKER, 2012). The good zootechnical performance and high survival rates among larvae fed with artemia (from 79.17% to 88.33%) were also observed in other species of tropical and temperate fish (SOARES et al., 2000; PRIETO et al, 2006; MAMCARZ et al, 2011; LUI et al 2015; LIGHT and PORTELLA, 2015; PEREIRA et al, 2016). After consumption of live food vitelline reserves is the best nutritional source for altricial larvae additionally, according Conceicao et al (2010), regardless of nutritional value, live food handling feature - which facilitates its detecção- and have high digestibility.

The larvae of piracanjuba (*B. orbignyanus*) are of altricial development (REYNALTE-TATAJE et al, 2004), thus, hatching of eggs with incomplete development (BALON, 1981), having a rudimentary gastrointestinal tract (DABROWSKY et al., 1979; DABROWSKY, 1984) and total dependence of yolk reserves as a source of nutrients in the first days of life. In general, co-feeding is a successful feeding management for many species of fish (ROSENLUND et al., 1997) and exclusive feeding with live feed should be carried out for a minimum period of 10-20 days as demonstrated to *Solea senegalensis* (CAÑAVATE; FERNANDEZ-DÍAZ, 1999),

Paralichthys orbignyanus (ROCHA et al, 2008), *Piaractus mesopotamicus* (LEITÃO et al, 2011) *Betta splendens* (FOSSE et al, 2013), *Pterolophyllum scalare* (PEREIRA et al, 2016), *Pseudopleuronectes americanus* (BÉLANGER et al, 2018). Trials performed with Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) larvae showed that the 10-day period with exclusive use of artemia and a 5-day co-feeding period did not affect the performance of the larvae (not published yet).

It is possible that cannibalism influenced the values of morphometric characteristics (total and standard length, ocular diameter and mouth size). In a larval experiment with matrinxã (*Brycon amazonicus*), Dias et al (2011) observed that deficient feeding caused high rates of cannibalism. The authors observed high coefficients of variation in larval growth rates and that cannibalism may contribute considerably to weight gain and larval growth. The potential effect of cannibalism on growth rates in larvae was observed by Costa et al (2013) to piabanha-do-Pardo larvae (*Brycon* sp.) In which the authors observe different rates of cannibalism among treatments, however there was no significant difference between treatments for weight gain and final weight. The same effect may have occurred for the final weight and weight gain indexes in the present study. These observations suggest that the variables related to growth were not good indicators of performance of the larvae under the conditions tested. Due to the great importance of cannibalism for this species, cannibalism and uniformity rates better reflected the efficiency of the evaluated treatments.

Some factors may potentiate and cause cannibal activity, especially fish size heterogeneity and fish nutritional status (SMITH; REAY, 1991; NETCH; PIENAAR, 1993; BARRAS; JOBLING et al, 2002; KESTEMONT et al, 2003; PEREIRA et al, 2017). However, it is important to note that the early insertion of inert food during larvae is an agent that can raise rates of cannibalism (ALTENCIO-GARCIA; ZANIBONI-FILHO, 2006). Ramos et al (2018) have shown that high rates of unevenness are related to high rates of cannibalism in juvenile traíra (*Hoplias lacerdae*). Palinzka-Zarska et al. (2014) observed that the early insertion of artificial food in burbot larvae (*Lota lota*) raised rates of cannibalism.

The photoperiod had no significant effect on any of the zootechnical, morphometric and behavioral variables evaluated. However, the effects of the interaction between photoperiod and feed offered ($p < 0.05$) were verified on the rate of cannibalism. The treatment that remained in 12L: 12D receiving the micro aggregated diet presented higher rate of cannibalism.

The influence of photoperiod on growth - related variables in fish larviculture varies among species. The photoperiod did not influence the performance of young forms of several species,

such as Asian sea bass (*Lates calcarifer*) (APPELBAUM and AROCKIARAJ, 2010), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (MENDONÇA et al, 2009), lambari (*Astyanax bimaculatus*) (NAVARRO et al, 2014). On the other hand, for other species, the photoperiod exerts a great influence on its performance. In the present study, the most important species were the *Pterophyllum scalare* (VERAS et al., 2016), *Betta splendens* (SALES et al, 2016), pejeri (*Odontesthes argentensis*) (FREITAS et al.) and *Takifugu obscurus* (SHI et al 2010).

Studies about the effects of photoperiod manipulation on larval species of Brycon species are scarce, and those that have already been reported indicate inter-specific differences. Pedreira et al. (2018) found that photoperiods between 6 and 12 hours of light provide better growth in Pardoba (*Brycon vonoi*) larvae. For larvae of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Reynalte-Tataje et al (2002) did not observe significant effect of photoperiod on larval growth, corroborating the results obtained in this work. The effects of exposure to light on morphometric parameters are related to exposure time. In the experiments mentioned above, the influence of the evaluated photoperiods was evidenced from 15 to 20 days of exposure. In experiments lasting less than 15 days, there is no significant effect of light on larval growth.

In the present study, it was observed that the photoperiod exerts influence on cannibal activity in young forms of several species, as demonstrated for catfish (*Heterobranchus longifilis*), African catfish (*Clarias gariepinus*) (BARA et al, 1999), dorada (*Sparus aurata*) (BARA et al, 2000) (ALMAZÁN-RUEDA et al, 2005), trairão (*Hoplias lacerdae*) (SALARO et al, 2006). On the other hand, for neotropical species that present problems with cannibalism in larviculture and the use of luminosity as a strategy to minimize the problem are scarce. In the case of species of the genus Brycon, besides scarcity, because they do not objectively evaluate the cannibal activity, they are not conclusive.

Pedreira et al. (2018) suggest that the photoperiod of 9 hours of light and 15 hours of darkness, raise survival rates and, indirectly, conclude that it reduces cannibal activity in Bryan vonoi. Lopes et al. (2018) concluded that the low light incidence (around 17 lux) reduces the frequency of agonistic interactions among matrinxã (*Brycon amazonicus*) larvae, but the frequency of cannibalism (partial or total) was not evaluated in the study. For the piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), Reynalte-Tataje et al (2002) observed that constant luminosity reduced rates of cannibalism to levels below 15%.

The results of this experiment are partially corroborated by Reynalte-Tataje (2002), cannibalism rates of 10% were observed (Fig. 1A). Considering that in this experiment the

interaction between initial diet and photoperiod was evaluated, it is possible to affirm that the diet had a decisive influence on the results of the cannibalism rate. The supply of live food may have provided an adequate condition of satiety to the point that to cancel the influence of the photoperiod, in the treatments that were not fed with artemia, the exposure to the photoperiod of 24 hours of light reduced the cannibalism indexes. These results lead us to believe that nutritional status is more prevalent than photoperiod manipulation in reducing cannibalism rates for piracanjuba (*B. orbignyanus*).

4.2. *mLeptin* expression

In mammals, *mLeptin* transcription is mediated by the energy reserve condition and circulating levels of leptin in the bloodstream (HAMILTON et al, 1995, LONNQVIST et al 1995, MAFFEI et al 1995, AHIMA et al 2000). As in mammals and birds, leptin has an appetite regulating function and fish feed intake (VOLKOFF, 2006). Studies on the leptin functionality fish are not as numerous as in mammals, but the published literature indicates that this hormone acts as food consumption reducer, being related to food satiety (VOLKOFF et al, 2003; PETER et al, 2006; KLING et al, 2009; LI et al, 2010; MURASHITA et al, 2011; FUENTES et al, 2012; WON et al, 2012; YUAN et al, 2014).

The explanations about the presence and function of leptin and its gene expression in fish are recent and studies directed to neotropical species are scarce. However, the functionality of leptin has been shown to be similar for these fish groups, as demonstrated in pacu (*Piraractus mesopotamicus*), dourado (*Salminus brasiliensis*) and pirapitnga (*Piaractus brachypomus*) (VOLKOFF, 2015; VOLKOFF et al., 2016; VOLKOFF et al 2017). The efficiency of the use of artemia as food in larvae has already been demonstrated in several species and the present experiment shows that the supply of artemia nauplii leads to greater expression of *mLeptina*, indicating a greater satiety.

The photoperiod exerted influence on the transcription of *mLeptin* in the piracanjuba larvae. This influence was observed in other species (VIVAS et al, 2011; TINOCO et al, 2014). There was a high expression of *mLeptine* in fed larvae kept in constant luminosity, which may have been caused by the fact that fish of the genus Brycon exhibit greater swimming activity and feed during periods of high luminosity (SOUZA et al., 2014; LOPES et al., 2018). The relationship between *mLeptin* expression, leptin synthesis and photoperiod is poorly studied.

The studies carried out indicate that the influence of the photoperiod on food satiety is related to food habits (VOLKOFF et al, 2006). Studies are needed to relate *mLeptin* expression and locomotor and feeding activities in fish. Stress-related hormones are related to locomotor activity, but the influence of the hormone Leptin on stress in fish is controversial. Exogenous leptin injection has been shown to reduce stress in common carp (*Cyprinus carpio*) (GORISSEN et al, 2012), but not in kinguio (*Carassius auratus*) (VIVAS et al, 2011).

The results obtained regarding the levels of expression of *mLeptin* and cannibalism lead to believe that larvae maintained in constant luminosity and fed with artemia nauplii presented greater satiety food and, consequently, lower rates of cannibalism. The reduction of cannibalism rates in piracanjuba larvae is related to the elevated expression of *mLeptin*, this was the first work that related *mLeptin* expression levels and cannibalism in fish. In rodents, it has been observed that a deficit feeding raises the rates of maternal cannibalism (ZAMIRI, 1978; GROSVENOR and MENA, 1983; BRONSON and MARSTELLAR, 1985; KANAREK et al., 1986; SCHNEIDER and WADE, 1992). the hormone leptin levels, via injection, reduces maternal cannibalism (FRENCH et al, 2009). The comparison between the results obtained in this research and the published literature indicate that the reduction of cannibalism rates has a strong relation with food satiety.

4.3. *mBmall* expression

The non-significance of the isolated photoperiod effect on the expression of *mBmall* ($p > 0.05$) may be related to the time of sample collection, performed during the light period for all treatments. In fish, this transcript presents a natural oscillation throughout the day (MIGAUD et al, 2010; PATIÑO et al, 2011; MATA-DOTRES et al, 2015). The diet offered alone did not affect the expression of this transcript ($p > 0.05$). The literature addressing the effects of diet and food status on the expression of *mBmall* in fish makes it clear that the expression of this transcript can be influenced by diet and indirectly by the interaction of *mBmall* with growth-related factors (HSU, WANG, HU, 2001; JOHNSTON, BOWER, MACQUEEN, 2011; KIM, WHITE, DELVIN, 2014). In fish, in addition to the regulatory role of biological rhythms related to environmental changes, the *Bmall* transcription factor is related to energy metabolism and homeostasis (RUDIC et al, 2004; KOHSAKA and BASS, 2007; MARCHEVA et al., 2010; JACOBI et al. (HARFFMAN et al., 2016).

In this experiment, a significant effect of the interaction between the treatments evaluated ($p < 0.05$) and a great relation between the expression of *mBmal1* and the final weight of the larvae were observed, the treatments that presented higher *mBmal1* expression indexes were the ones that provided greater final weight (larvae kept at 24L: 00D fed with artemia nauplii and larvae kept in 12L: 12D fed with microdieta). For rats, Shimba et al (2005) demonstrated that *mBmal1* overexpression stimulates lipogenesis and adipogenesis. Also for rats, knockout individuals for the *Bmal1* gene were found to have reduced muscle and body weight scores (SCHIAFFINO; BLAAUW; DYAR, 2016). Another finding, in knockout rats for the *Bmal1* gene, was that these individuals present a pattern of differentiated locomotor activity of common individuals (MIEDA; SAKURAI, 2011). The literature indicates that the functionality of the *Bmal1* gene in fish and mammals is similar, however this is the first study to analyze this transcript in a species of the genus *Brycon*.

Possibly cannibalism, characteristic of fish larvae of this genus, has influenced the expression of *mBmal1* since intra-cohort cannibalism is a strategy of supplying a deficit feeding. The results found in this experiment of *piracanjuba* larviculture demonstrate that the expression of *mBmal1* is not directly related to the expression of *mLeptina*, indicating that, at the molecular level, food satiety is more prevalent in the reduction of cannibalism in *piracanjuba* larvae than the manipulation of the photoperiod.

5. Conclusions

Diet and photoperiod influence the performance of *piracanjuba* larvae (*Brycon orbignyanus*) in the initial stage of larval farming. Feeding with *Artemia* nauplii and 24L: 00D photoperiod reduce the rates of cannibalism in intensive *piracanjuba* larvae.

Larvae of *piracanjuba* (*Brycon orbignyanus*) kept under constant luminosity and fed with *artemia* nauplii present higher levels of expression of *mLeptina*, which is related to the reduction in cannibalism rates. The expression of *mBmal1* is directly related to the final weight of the larvae.

REFERENCES

- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annual review of physiology**, n. 62, v.1, p. 413-437, 2000.
- BRONSON, F. H.; MARSTELLAR, F. A. Effect of short-term food deprivation on reproduction in female mice. **Biology of Reproduction**, n. 33, p. 660-667, 1985.
- CARDONE, L. et al. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. **Science**, n. 309, v. 5739, p. 1390-1394, 2005.
- CONSIDINE R. V. et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. **New England Journal of Medicine**, n. 334, v. 5, p. 292– 95, 1996.
- FRENCH, S. et al. Leptin increases maternal investment. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, n. 276, v. 1675, p. 4003-4011, 2009.
- FUENTES, E.N. et al. Plasma leptin and growth hormone levels in the fine flounder (*Paralichthys adspersus*) increase gradually during fasting and decline rapidly after refeeding. **General Comparative Endocrinology**, n. 177, p. 120–127, 2012.
- GORISSEN, M. et al. Recombinant human leptin attenuates stress axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **General and comparative endocrinology**, n. 178, v.1, p. 75-81, 2012.
- GORISSEN, M.; FLIK, G. Leptin in teleostean fish, towards the origins of leptin physiology. **Journal of chemical neuroanatomy**, 61, 200-206, 2014.
- GROSVENOR, C. E.; MENA, F. Effect of under feeding upon the rate of milk ejection in the lactating rat. **Journal of Endocrinology**, n. 96, v. 2, p. 215- 222, 1983.
- HAMMOND, K. A.; DIAMOND, J. Limits to dietary nutrient intake and intestinal nutrient uptake in lactating mice. **Physiology and Zoology**, n. 67, v. 1, p. 282-303, 1994.
- HAMILTON B. S. et al. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. **Nature Medicine**, n. 1, v.9, p. 53– 56, 1995.
- HARFMANN, B. D. et al. Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis. **Skeletal muscle**, n. 6, v. 1, 12 p., 2016.
- HIRAYAMA, J. et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. **Nature**, n. 450, v. 7172. 2007.
- HSU, H. J.; WANG, W. D.; HU, C. H. Ectopic expression of negative ARNT2 factor disrupts fish development. **Biochemical and biophysical research communications**, n. 282, v. 2, p. 487-492, 2001.
- JACOBI, D. et al. Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness. **Cell metabolism**, n. 22, v. 4, p. 709-720, 2015.
- JOHNSTON, I. A.; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, n. 214, v. 10, p. 1617-1628, 2011.

- KANAREK, R. B., SCHOENFELD, P. M.; MORGANE, P. J. Maternal malnutrition in the rat: effects on food intake and body weight. **Physiology and Behavior**, n. 38, v. 4, p. 509-515, 1986.
- KIM, J. H., WHITE, S. L., DEVLIN, R. H. Interaction of growth hormone overexpression and nutritional status on pituitary gland clock gene expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Chronobiology International**, n. 32, v. 1, p. 113–127, 2014. doi:10.3109/07420528.2014.958160
- KLING, P., et al. A homologous salmonid leptin radioimmunoassay indicates elevated plasma leptin levels during fasting of rainbow trout. **General Comparative Endocrinology**, n. 162, v. 3, p. 307–312, 2009.
- KOHSAKA, A.; BASS, J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, n. 18, v. 1, p. 4-11. 2007.
- KUROKAWA, T.; UJI, S.; SUZUKI, T. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. **Peptides**, n. 26, v. 5, p. 745-750, 2005.
- LI, G.G. et al. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin. **General Comparative Endocrinology**, n. 166, v. 1, p. 117–127, 2010.
- LONNQVIST F. et al. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. **Nature Medicine**, n. 1, v. 9, p. 50–53, 1995.
- LOPES, A. C. C., VILLACORTA-CORREA, M. A., CARVALHO, T. B. Lower light intensity reduces larval aggression in matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Behavioural processes**, n. 151, p. 62-66, 2018.
- MAFFEI M. J. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight-reduced subjects. **Natural Medicine**, n. 1, v. 11, p. 55– 61, 1995.
- MATA-SOTRES, J. A. et al. Daily rhythms of clock gene expression and feeding behavior during the larval development in gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Chronobiology International**, n. 32, v. 8, p. 1061–1074, 2015. doi:10.3109/07420528.2015.1058271
- MARCHEVA, B. et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. **Nature**, n. 466, v. 7306, p. 627, 2010.
- MIEDA, M.; SAKURAI, T. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. **Journal of Neuroscience**, n. 31, v. 43, p. 15391–15396, 2011. doi:10.1523/jneurosci.2801-11.2011
- MURASHITA, K. et al. Leptin reduces Atlantic salmon growth through the central pro-opiomelanocortin pathway. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, n.158, p. 79–86, 2011.
- PATIÑO, M. A. L. et al. Daily rhythmic expression patterns of Clock1a, Bmal1, and Per1 genes in retina and hypothalamus of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. **Chronobiology International**, n. 28, v. 5, p. 381–389, 2011. doi:10.3109/07420528.2011.566398
- PEDREIRA, M. M. et al. Larvicultura de matrinxã em tanques de diferentes cores. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 43, v. 10, p. 1365-1369, 2008.

- PEDRO, N., MARTINEZ-ALVAREZ, R., DELGADO, M. J. Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*). **Journal of Endocrinology**, n. 188, p. 513–520, 2006.
- Prokop, J. W., Duff, R. J., Ball, H. C., Copeland, D. L., & Londraville, R. L. (2012). Leptin and leptin receptor: analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides*, 38(2), 326-336.
- RUDIC, R. D. et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. **PLoS biology**, n. 2, v. 11, e377, 2004.
- SHIMBA, S. et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 102, v. 34, p. 12071–12076, 2005. doi:10.1073/pnas.0502383102
- SCHIAFFINO, S., BLAAUW, B., DYAR, K. A. The functional significance of the skeletal muscle clock: lessons from Bmal1 knockout models. **Skeletal muscle**, n. 6, v. 1, p. 33, 2016.
- SCHNEIDER, J. E.; WADE, G. N. Effects of ambient temperature and body fat content on maternal litter reduction in Syrian hamsters. *Physiology and Behavior*, n. 49, p. 135-139, 1992.
- SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. D. O. Growth and survival of dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 50, v.3, p. 435-444, 2007.
- SOUZA, E. C. M. et al. Aggressiveness and locomotion activity related to hatching time in Matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Applied Animal Behaviour Science**, n. 157, p. 146-151, 2014.
- TUCKER, B. J. et al. Effects of photoperiod and feeding frequency on performance of newly weaned Australian snapper *Pagrus auratus*. **Aquaculture**, n. 258, v. 1-4, p. 514-520, 2006.
- VOLKOFF, H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, n. 144, v. 3, p. 325-331, 2006.
- VOLKOFF, H.; EYKELBOSH, A.J.; PETER, R.E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. **Brain Research**, n. 972, p. 90–109, 2003.
- VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Feeding behavior of fish and its control. **Zebrafish**, n. 3, v.2, p.131-140, 2006.
- VOLKOFF, H. Cloning and tissue distribution of appetite-regulating peptides in pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Journal of animal physiology and animal nutrition**, n. 99, v.5, p. 987-1001, 2015.
- VOLKOFF, H. et al. Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, n. 203, p. 241-254, 2017.

VOLKOFF, H.; SABIONI, R. E.; CYRINO, J. E. P. Appetite regulating factors in dourado, *Salminus brasiliensis*: cDNA cloning and effects of fasting and feeding on gene expression. **General and comparative endocrinology**, n. 237, p. 34-42, 2016.

DENGYUE Y. et al. Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: Molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to periprandial changes and fasting. **General and Comparative Endocrinology**, n. 204, p. 13–24, 2014.

WON, E. T. et al. Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): control of feeding and regulation by nutritional state. **General and comparative endocrinology**, n. 178, v. 1, p. 98-107, 2012.

ZAMIRI, M. J. Effects of reduced food intake upon reproduction in mice. **Australian Journal of Biological Science**, n. 31, p. 629-639, 1978.