



**LUCIANA CREPALDI LUNKES**

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE OS  
PARÂMETROS DE LOCOMOÇÃO E ESTRESSE  
EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**LUCIANA CREPALDI LUNKES**

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE OS PARÂMETROS DE  
LOCOMOÇÃO E ESTRESSE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

**LAVRAS - MG**

**2015**

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

Lunkes, Luciana Crepaldi.

Influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção e estresse em Zebrafish (*Danio rerio*) / Luciana Crepaldi Lunkes. –  
Lavras: UFLA, 2015.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Peixes. 2. Locomoção. 3. Estresse oxidativo. 4. Ritmos  
biológicos. 5. Influência hormonal. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título

**LUCIANA CREPALDI LUNKES**

**INFLUÊNCIA DA MELATONINA SOBRE OS PARÂMETROS DE  
LOCOMOÇÃO E ESTRESSE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015.

Dra. Alessandra de Castro Souza

UNILAVRAS

Dra. Viviane De Oliveira Felizardo

UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2015**

*Ao meu amado pai Érico, por ser o merecedor de todo o meu reconhecimento e gratidão diante de qualquer conquista.*

*Aos meus queridos avós Canísio e Marília (in memoriam), meus anjos da guarda.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Apreendi que a gratidão é um dos sentimentos mais nobres que existem. E eu, definitivamente, não teria chegado aonde cheguei se não fosse a ajuda de tantas pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Prof. Luis Murgas, por ter me proporcionado essa oportunidade, e por toda sua confiança. E também à Universidade Federal de Lavras – UFLA, bem como à Rede Mineira de Bioterismo e à CAPES pela colaboração e apoio financeiro.

De maneira muito especial e com muito carinho, agradeço à Lu, que mostrou para sua “filhinha” o caminho para a realização desse desejo tão sonhado de ser mestre.

Agradeço imensamente aos meus companheiros de equipe do Biotério. Em especial, àqueles que participaram ativamente do grupo do Zebrafish, fazendo com que o acontecimento destes experimentos fosse possível: Isadora Marques, Tássia, Carol, Renata, Paula, Isadora Assis, Laís, Jonathan, Bruno, Aline, Dani, Estefânia, Vivi, Wesley, Fidélis, Gilmar. Além disso, agradeço aos colaboradores de outros departamentos, que fizeram com que este trabalho pudesse ser finalizado: Renan Paulino e sua equipe (Shirley, Mayara, Ariane), Allan Fernandes e Prof. Júlio Bueno.

Agradeço a paciência daqueles que conviveram comigo nos bastidores destes dois anos, com tantos momentos de indecisão, insegurança e dificuldade. Meu pai Érico, meu irmão Rodrigo, meus tios Christiane e Argenta, meus primos Anna Caroline e Luiz Felipe. E também às flores que completam nossa família, minha grande amiga e “boadrasta” Alessandra, minha irmã Juliana e minha cunhadinha Gabrielle.

Agradeço ao Lucas, meu amor, por despertar em mim os melhores sentimentos, e por me fazer o melhor que eu posso ser. Você completa um

espaço que faltava, e assim, tudo se encaixa. “Amar profundamente uma pessoa nos dá força. Ser amado profundamente por alguém nos confere coragem.” (Lao-Tsé).

“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina



## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção e estresse em Zebrafish (*Danio rerio*). Foram divididos 400 Zebrafish em dois grupos (animais submetidos e não submetidos ao estresse), nos quais foram testadas diferentes doses de melatonina (0M = 0; 1M = 10 nM; 2M = 0,001 mM; 3M = 0,1 mM). No Experimento 1, foram analisadas as variáveis bioquímicas: glicose plasmática (perfuração ventricular), lactato corporal (maceração/kit comercial) e cortisol corporal (maceração/kit comercial). No Experimento 2, foram analisadas as variáveis comportamentais: atividade locomotora (contagem da mudança de quadrantes) e ansiedade (tempo de permanência na profundidade do aquário). Os resultados encontrados para a glicose plasmática (mg/dL) e para o lactato corporal (mg/g) não foram significativos ( $p > 0,05$ ), sugerindo que, apesar de serem parâmetros indicadores de estresse, talvez para o Zebrafish não sejam muito aplicáveis. Já em relação ao cortisol (ng/g), houve diferença significativa entre as doses de melatonina ( $p < 0,01$ ), que apresentaram um efeito quadrático. Os resultados encontrados para a mudança de quadrantes foi significativo ( $p < 0,05$ ), onde também a dose mais alta de melatonina (3M = 0,1 mM) foi capaz de conter o aumento da atividade locomotora dos animais estressados. A maioria dos animais permaneceu na profundidade do aquário, e, de maneira significativa ( $p < 0,05$ ), a dose mais alta de melatonina (3M = 0,1 mM) foi capaz de conter o aumento da ansiedade. Assim, os resultados obtidos permitem concluir que apenas a dose de melatonina 0,1 mM foi determinante na contenção do aumento dos níveis de cortisol corporal, atividade locomotora e ansiedade em Zebrafish (*Danio rerio*) submetidos ao estresse.

Palavras-chave: Peixes. Locomoção. Estresse oxidativo. Ritmos biológicos. Influência hormonal.

## ABSTRACT

This work had the objective of investigating the influence of melatonin over locomotion parameters and stress of Zebrafish (*Danio rerio*). We divided 400 Zebrafish into two groups (animals subjected and not subjected to stress), on which we tested different doses of melatonin (0M = 0; 1M = 10 nM; 2M = 0.001 mM; 3M = 0.1 mM). In Experiment 1, we analyzed biochemical variables: plasma glucose (ventricular perforation), body lactate (maceration/commercial kit) and body cortisol (maceration/commercial kit). In Experiment 2, we analyzed behavioral variables: locomotive activity (quadrant change count) and anxiety (time of permanence at the bottom of the aquarium). The results found for plasma glucose (mg/dL) and body lactate (mg/g) were insignificant ( $p > 0.05$ ), suggesting that, despite being stress indicating parameters, perhaps they are not applicable to Zebrafish. Regarding the cortisol (ng/g), there was significant difference between melatonin doses ( $p < 0.01$ ), which presented quadratic effect. The results found for quadrant change were significant ( $p < 0.05$ ), in which the highest dose of melatonin (3M = 0.1 mM) was capable of containing the increase in locomotive activity of the stressed animals. Most animals remained at the bottom of the aquarium and, the highest dose of melatonin (3M = 0.1 mM) was capable of, significantly ( $p < 0.05$ ), containing the increase of anxiety. Therefore, the results obtained allowed us to conclude that only the melatonin dose of 0.1 mM was determining in containing the increase in the levels of body cortisol, locomotive activity and anxiety in Zebrafish (*Danio rerio*) subjected to stress.

Keywords: Fish. Locomotion. Oxidative stress. Biological rhythms. Hormonal influence.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento experimental caracterizado por oito tratamentos, utilizando diferentes doses de melatonina (0M, 1M, 2M, 3M) em animais estressados e não estressados .....	28
Figura 2	Representação esquemática da situação em que os animais foram submetidos durante a condição de estresse .....	30
Figura 3	Posicionamento da câmera e do aquário durante o processo de filmagem .....	33
Figura 4	Aquário utilizado para o processo de filmagem. A: marcação do quadrante; B: marcação da linha divisória.....	34
Figura 5	Modelo ajustado para o nível de cortisol corporal (ng/g) (eixo y) em função das diferentes doses de melatonina (eixo x), independente da condição de estresse .....	40
Figura 6	Eixo x: Doses de melatonina; Eixo y: níveis de cortisol total .....	41
Figura 7	Tratamentos realizados e níveis de cortisol total .....	41
Figura 8	Tratamentos realizados e níveis de lactato total .....	44
Figura 9	Efeito de observador. Eixo x: avaliadores; Eixo y: valores referentes à diferença entre as avaliações.....	45
Figura 10	Diferença no efeito das doses de melatonina sobre a contagem de quadrantes dentro do grupo E (animais submetidos ao estresse).....	46
Figura 11	Efeito de observador. Eixo x: avaliadores; Eixo y: valores encontrados para o tempo de permanência na profundidade do aquário.....	49
Figura 12	Diferença no efeito das doses de melatonina sobre o percentual de tempo na profundidade do aquário dentro do grupo E (animais submetidos ao estresse).....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentrações plasmáticas médias de glicose (mg/dL) em Zebrafish submetidos e não submetidos ao estresse, mantidos em diferentes doses de melatonina.....	36
Tabela 2	Concentrações médias dos níveis de cortisol corporal (ng/g) em Zebrafish submetidos e não submetidos ao estresse, mantidos em diferentes doses de melatonina.....	38
Tabela 3	Concentrações médias de lactato corporal (mg/g) em Zebrafish submetidos e não submetidos ao estresse, mantidos em diferentes doses de melatonina .....	43

## ANEXO A

Tabela 1	Análise de variância para a glicose .....	66
Tabela 2	Análise de variância para o cortisol .....	66
Tabela 3	Análise de variância para o lactato .....	66
Tabela 4	Análise de variância para a atividade locomotora (contagem da mudança de quadrantes) .....	67
Tabela 5	Análise de variância para a ansiedade (tempo de permanência na profundidade) .....	67

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	Ritmos biológicos: natureza rítmica dos processos regulatórios do organismo .....	15
2.2	Situação de estresse e sua resposta em peixes .....	16
2.3	A atividade locomotora em peixes .....	19
2.4	Melatonina em peixes .....	20
2.5	Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ): o modelo experimental em estudo .....	22
3	OBJETIVOS .....	24
3.1	Objetivo Geral .....	24
3.2	Objetivos Específicos .....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1	Local, animais e instalações .....	25
4.2	Delineamento experimental .....	26
4.3	Exposição à melatonina .....	28
4.4	Resposta ao estresse .....	29
4.5	Experimento I: “Influência da melatonina sobre os parâmetros bioquímicos de estresse em Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )” .....	30
4.5.1	Procedimentos de coleta e análises bioquímicas: Glicose, Cortisol e Lactato .....	31
4.6	Experimento II: “Influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção em Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )” .....	32
4.6.1	Variáveis comportamentais .....	32
4.6.1.1	Registro da atividade locomotora .....	33
4.6.1.2	Registro da ansiedade .....	34
4.7	Análises estatísticas .....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1	Experimento I: “Influência da melatonina sobre os parâmetros bioquímicos de estresse em Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )” .....	36
5.2	Experimento II: “Influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção em Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )” .....	45
6	CONCLUSÃO .....	52
	REFERÊNCIAS .....	53
	ANEXOS .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Os achados na literatura relacionados à ação da melatonina em peixes ainda não são totalmente conclusivos. Portanto, faz-se necessária a realização de estudos que busquem esclarecer ainda mais seus efeitos. A melatonina é um hormônio sintetizado pela glândula pineal, e desempenha um papel crucial na regulação dos ritmos biológicos de animais vertebrados, incluindo peixes. Possui destaque entre os hormônios, e estudos envolvendo sua ação e suas consequências para os organismos são desenvolvidos no mundo todo. Tais estudos traduzem uma relevância considerável para os meios acadêmico, científico e profissional. No entanto, os estudos ainda são controversos quanto às funções e mecanismos de ação.

Acredita-se que a melatonina possa desencadear uma série de respostas no metabolismo de peixes, interferindo na ingestão de alimentos, na osmorregulação, no crescimento e na reprodução. Nestes animais, existem evidências sobre o efeito da secreção de glicocorticoides e atividade locomotora envolvendo a melatonina, bem como sobre um papel antiestresse, tanto em nível central quanto periférico (AZPELETA et al., 2010; FALCÓN et al., 2010; LÓPEZ-PATIÑO et al., 2013).

Os efeitos da melatonina variam com os hábitos diários do animal. No caso dos peixes, existem pontos controversos e pouco esclarecidos envolvendo a diferença na ação do hormônio em espécies diurnas e noturnas. A melatonina também é conhecida por afetar a atividade locomotora, que é reduzida na maioria das espécies diurnas, enquanto que em espécies noturnas parece não influenciar (BERMUDEZ; FORBES; INJIDI, 1983; MURAKAMI et al., 2001; ZHDANOVA et al., 2002).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos da melatonina sobre a atividade locomotora em vertebrados permanecem desconhecidos. Estudos em peixes têm

demonstrado que a administração de melatonina em Goldfish reduz os níveis de cortisol sob condições estressantes (AZPELETA et al., 2007; HERRERO et al., 2007). Além disso, as possíveis interações de regulação da melatonina sobre a alimentação e sobre a atividade locomotora em peixes não foram estudadas até o momento, em que não é possível afirmar se o possível efeito inibitório da melatonina sobre a ingestão de alimentos é dependente da redução da atividade locomotora ou se a ação anorexígena sugerida pela ação da melatonina é o fator de diminuição da atividade locomotora (FALCÓN et al., 2007).

O Zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno peixe tropical de água doce que possui características que o fazem popular dentro da aquarofilia, como, por exemplo, sua tolerância a grandes variações ambientais e à facilidade com que se reproduz e é mantido em cativeiro. Nos últimos anos, este peixe tem sido um dos mais importantes modelos de organismos vertebrados para pesquisas biológicas, inclusive na área da saúde humana. Atualmente, tornou-se um modelo experimental igualmente valorizado quando comparado a ratos frente à ciência e prevalência em programas de pesquisa (PETERSON et al., 2008).

O objetivo do presente trabalho foi investigar a influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção e estresse em Zebrafish (*Danio rerio*).

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Ritmos biológicos: natureza rítmica dos processos regulatórios do organismo**

Denomina-se ritmo biológico qualquer evento que se repita de maneira regular em um organismo. Os ritmos mais estudados são aqueles relacionados às mudanças ambientais, nas quais um evento cíclico caracteriza um ambiente no qual o animal pode se adaptar (MORGAN, 2004; VERAS et al., 2013).

Um ser vivo expressa sua reação aos estímulos ambientais através de sua organização temporal, sendo capaz de promover ajustes por meio de mecanismos biológicos na tentativa de antecipar mudanças ambientais previsíveis, otimizando sua sobrevivência. Tais mecanismos são específicos e limitadamente definidos em cada espécie. Seu desenvolvimento, crescimento e reprodução podem sofrer influência direta do ambiente em que vive (BEZERRA et al., 2008; FÁLCON et al., 2010; OLIVEIRA, 2009).

A maioria dos eventos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais dos seres vivos é rítmica (NAVARRO, 2010). À medida que acontecem de maneira periódica, os ritmos biológicos podem ser classificados em: Ultradiano, no qual os ciclos se repetem em intervalos de até 20 horas, como no caso de organismos que efetuam deslocamentos ao longo do dia de acordo com o ciclo da maré; Circadiano, no qual os ciclos se repetem em intervalos de 20 até 28 horas, como aqueles sincronizados ao ciclo claro/escuro e Infradiano, no qual os ciclos se repetem em intervalos maiores do que 28 horas, como os ciclos sazonais de migração. Considerando as possíveis variações relacionadas às espécies, para a maioria, o ciclo circadiano é considerado o mais importante (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003; VERA et al., 2009).



Em peixes, o ciclo circadiano corresponde ao período de aproximadamente um dia (24 horas), sendo o principal responsável pelo ciclo biológico. A maioria dos organismos adapta seu comportamento diante das variações diárias a partir de sistemas de sinalização externos, como fotoperíodo, temperatura, disponibilidade de alimento, chuva e salinidade da água (FÁLCON et al., 2010).

O ritmo diário em peixes vem sendo estudado com ênfase no comportamento locomotor, reprodutivo e alimentar, além dos ritmos de secreção de fatores neuroendócrinos. Em relação ao tipo de ritmo, as espécies de peixes podem ser classificadas em diurnas, noturnas ou crepusculares, dependendo da hora do dia em que exercem seu pico de atividade. Em peixes, o relógio circadiano parece estar localizado na pineal, uma glândula fotossensível envolvida no controle da síntese de melatonina (OLIVEIRA, 2009).

## **2.2 Situação de estresse e sua resposta em peixes**

Quando um organismo é submetido a situações em que um desafio pode resultar em um perigo real ou simbólico para sua integridade, emprega-se, por definição, o termo estresse (TORT, 2011). De acordo com McEwen e Wingfield (2003), o estresse descreve eventos que representam ameaça, desencadeando respostas fisiológicas e comportamentais como parte da alostase, somadas àquelas que já são impostas pelo ciclo de vida normal.

A resposta ao estresse integra uma variedade de mecanismos, envolvendo o metabolismo e os sistemas endócrino, imunológico, neural e comportamental, em que o objetivo do organismo frente a este evento generalizado é baseado na reintegração do equilíbrio e no reestabelecimento da homeostasia através de reações de fuga ou luta e arranjos energéticos (TORT,

2011). Em peixes, uma situação de estresse, assim como sua resposta, pode variar de maneira considerável entre as espécies (ØVERLI et al., 2007).

Schreck (2010) afirma que o estresse é um estímulo que faz com que o estado fisiológico e bioquímico do animal seja deslocado para além dos intervalos normais de flutuação, em que, comumente, na tentativa de compensar um agente estressor, o sistema oscila antes de se estabilizar. Sabe-se que existe uma forte relação entre a sobrevivência do animal e o intervalo de oscilação, que deve ser estabelecido dentro dos limites fisiológicos considerados suficientes para a manutenção do organismo.

Considerando a origem, a percepção e a duração do evento, os agentes estressores podem ser classificados de acordo com inúmeros critérios. Em peixes, os agentes podem ser classificados em estressores físicos e ambientais (lesões físicas, manipulações, temperatura, fotoperíodo, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, presença de contaminantes, etc.); estressores sociais e simbólicos (produzidos por interações de dominância e hierarquia e percepção e avaliação do estresse) e em estressores agudos e crônicos (TORT, 2011).

De acordo com Silveira, Logato e Pontes (2009), a falta de oxigênio dissolvido na água está incluída na categoria de fatores estressantes químicos, podendo acontecer quando o número de peixes no tanque está acima da capacidade de suporte do viveiro, o que aumenta a demanda por oxigênio na água.

Os agentes estressores são capazes de ameaçar o equilíbrio homeostático e causar respostas integradas, envolvendo alterações tanto fisiológicas quanto comportamentais. De acordo com Barton (2002), a resposta ao estresse pode ser considerada como um mecanismo adaptativo, que permite ao peixe lidar com os agentes estressores.

A chave da adaptação ao agente estressor está relacionada ao metabolismo energético, em que há realocação de energia para longe de

atividades de alta demanda energética, como crescimento e reprodução, e em direção a atividades que requerem intensificação para restaurar a homeostase, tais como respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos (LIMA et al., 2006).

As respostas fisiológicas frente ao evento estressor podem caracterizar respostas primárias, secundárias e terciárias. Na resposta primária, ocorre a percepção do estresse e consequente ativação dos centros cerebrais e eixos neuroendócrinos, estimulando a liberação de catecolaminas e corticosteroides. Durante as respostas secundárias, ocorre canalização das ações destes hormônios e efeitos imediatos em nível sanguíneo e tecidual, associadas ao aumento da atividade muscular e respiratória (aumento dos batimentos cardíacos, da absorção de oxigênio e mobilização de substratos energéticos), além de alterações cardiovasculares – eventos acionados após a liberação de altos níveis de catecolaminas, liberação de cortisol pela glândula inter-renal e aumento dos níveis circulantes de glicose. As respostas terciárias estendem-se ao organismo e se manifestam em nível populacional, traduzindo a inibição do crescimento, da reprodução e da resposta imune, com limitação da capacidade do animal em tolerar estressores subsequentes ou adicionais (LIMA et al., 2006; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; TORT, 2011; WENDELAAR BONGA, 1997).

Em grande parte, as alterações ambientais podem agir como potenciais fontes de estresse em animais, incluindo peixes, comprovado por alterações hormonais, diferentes concentrações plasmáticas de substratos, além de alterações nos parâmetros de contagem celular sanguínea (BISWAS et al., 2004). De acordo com Khaliq, Rahman e Javed (2013), a resposta ao estresse fisiológico é comum a todos os vertebrados, e pode ser caracterizada por alterações nos parâmetros sanguíneos bioquímicos, incluindo a glicose, o cortisol e o lactato.

O cortisol é considerado, em peixes, como sendo o principal corticosteroide indicador para avaliação de estresse (BARTON, 2002), sendo que sua ação é essencial para a regulação metabólica frente a um agente estressor. Ramsay et al. (2006) afirmam que o estresse por alta densidade pode aumentar os níveis de cortisol de maneira significativa, e de acordo com Wendelaar Bonga (1997), isso acontece principalmente durante as primeiras 24 horas.

### **2.3 A atividade locomotora em peixes**

A atividade locomotora de um peixe aparece de maneira padronizada em resposta aos diferentes ritmos biológicos, que sofrem influências da produção de substâncias e liberação de hormônios, como as concentrações plasmáticas de cortisol, glicose e insulina (NAVARRO, 2010). Considerando uma situação de estresse agudo, em geral, os níveis de cortisol aumentados em peixes fazem com que a atividade locomotora do animal aumente, principalmente durante a primeira hora. Porém, após 48 horas, ainda sob situação de estresse, a locomoção e a agressividade diminuem (ØVERLI; KOTZIAN; WINBERG†, 2002). Os peixes que respondem com moderada elevação do cortisol durante uma situação de estresse, na maioria das vezes, caracterizam-se como dominantes quando comparados àqueles que respondem com níveis muito elevados de cortisol (POTTINGER; CARRICK, 2001).

Espécies com hábitos diurnos, como Zebrafish (*Danio rerio*), Goldfish (*Carassius auratus*) e Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), apresentam maior atividade locomotora durante o período de luz. Por outro lado, Tenca (*Tinca tinca*) e Linguado (*Solea senegalensis*) demonstram atividade locomotora predominante no período escuro, sendo consideradas espécies de hábito noturno (NAVARRO, 2010).

Algumas espécies de peixes teleósteos não expressam de maneira tão clara seu padrão diário de atividade, podendo haver variabilidade dentro da mesma espécie. Essa diferença pode estar associada à herança genética ou a adaptações aos diferentes habitats (disponibilidade de alimento e predação), além da dependência de fatores sensoriais (visão para captura de alimento). A fase de desenvolvimento do animal também deve ser levada em consideração, bem como o fotoperíodo (NAVARRO, 2010; OLIVEIRA et al., 2009; VERA et al., 2009).

#### **2.4 Melatonina em peixes**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula-chave envolvida no controle dos ritmos circadianos e sazonais em vertebrados. Em peixes, todo o processo é mediado por um sistema neuroendócrino composto por sensores e osciladores circadianos, como o órgão pineal, os olhos laterais e os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo. A liberação deste hormônio ocorre de maneira semelhante em mamíferos e peixes. O conteúdo plasmático de melatonina é maior durante a noite. Sua liberação reflete o fotoperíodo vigente, que sofre alterações de acordo com as estações, constituindo um indicador da duração de ambos (FALCÓN et al., 2007; MAITRA et al., 2013; REITER et al., 2009).

A melatonina é liberada ritmicamente e sincroniza as funções animais, agindo sobre uma complexa rede de regulação envolvendo mecanismos centrais e periféricos estreitamente coordenados, a fim de manter a integridade fisiológica (PEIRSON; HALFORD; FOSTER, 2009; WHITMORE et al., 1998; WHITMORE; FOULKES; SASSONE-CORSI, 2000; ZHDANOVA; REEBS, 2006). As células de peixes possuem receptores específicos para este hormônio, sugerindo sua participação em vários processos fisiológicos

(KULCZYKOWSKA et al., 2006; LI et al., 2013; LÓPEZ-PATIÑO et al., 2008). Uma informação neural é transmitida da retina ao diencéfalo ventral através do trato retino-hipotalâmico-pineal respectivamente (FALCÓN et al., 2010). De acordo com Oliveira et al. (2009), estudos realizados *in vitro* sugerem que a maioria das espécies de teleósteos possui osciladores endógenos intrapineais que controlam o ritmo da produção de melatonina.

A melatonina parece estar ligada à ingestão de alimentos, crescimento e atividade locomotora de vertebrados, além de influenciar alguns ritmos comportamentais ligados à reprodução e à digestão (FALCÓN et al., 2010; LÓPEZ-PATIÑO et al., 2011; PICCINETTI et al., 2010). Acredita-se que este hormônio possa desencadear uma série de respostas no metabolismo dos peixes: agindo diretamente sobre receptores do eixo hipotálamo-hipófise; modulando a ação de esteroides sexuais; agindo como antioxidante sobre os tecidos gonadais e atuando diretamente em células alvo através da ativação de receptores (GALL; STEHLE; WEAVER, 2002; SHI et al., 2004; TAMURA et al., 2009).

Zhdanova et al. (2001, 2008) demonstraram que a melatonina promove um estado semelhante ao sono em Zebrafish, e este efeito parece ser mediado através de receptores específicos de melatonina. Uma redução da atividade locomotora em Dourado (teleósteo diurno) e nenhuma alteração em Tenca (teleósteos noturno) foram observadas após uma injeção intraperitoneal de melatonina (LÓPEZ-OLMEDA; MADRID; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2006). Portanto, diferentes efeitos da melatonina sobre a atividade locomotora em peixes pode depender do seu ritmo circadiano, como ocorre em outros grupos de vertebrados.

Alguns fatores envolvem a ação da melatonina em peixes, como a dependência das respostas envolvendo tratamentos com esse hormônio ser relacionada a inúmeros fatores envolvendo a espécie e sua condição, como o gênero, o estado reprodutivo, a hora do dia e a estação do ano, o histórico do

animal, o modo de administração, as doses e o tempo de meia vida da melatonina (FALCÓN et al., 2010).

### **2.5 Zebrafish (*Danio rerio*): o modelo experimental em estudo**

O Zebrafish (*Danio rerio*), também conhecido como peixe-zebra ou paulistinha, é um teleosteo de água doce de pequeno tamanho (cerca de 3 - 4 cm), pertencente à família *Cyprinidae*. Caracteriza-se por um padrão de coloração distinto, com fenótipo baseado na presença de listras horizontais que se alternam entre claras e escuras (SPENCE et al., 2008).

Esta espécie possui inúmeros atributos que o tornam apropriado para a manipulação experimental tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PITTMAN; ICHIKAWA, 2013). Alguns aspectos o tornam um modelo de fácil manipulação, como seu baixo custo e um pequeno espaço exigido para sua manutenção em cativeiro, além de sua alta fertilidade, rápido desenvolvimento e ciclo biológico (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 2011; SPENCE et al., 2008). Assim, a utilização do Zebrafish é favorável como modelo para estudos toxicológicos (YANG et al., 2009), genéticos, teratológicos (BECKER; BECKER, 2008), farmacológicos (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; EGAN et al., 2009), neurocomportamentais (MATHUR; GUO, 2010; SISON; GERLAI, 2011) e para desvendar mecanismos de diversas doenças humanas, além de testes para novos agentes terapêuticos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

O Zebrafish possui alta capacidade de absorção de compostos adicionados à água, considerando seu rápido metabolismo e sua sensibilidade a agentes químicos. Dessa maneira, tratamentos utilizando protocolos invasivos são dispensados (BERGHMANS et al., 2007; KARLOVICH et al., 1998). Alguns procedimentos envolvendo a manipulação genética são facilitados

quando se utiliza essa espécie como modelo, considerando que, em outras espécies como ratos, os procedimentos são mais complicados e onerosos economicamente (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 2011). E ainda, quando comparados em sua sequência, os genes desses peixes apresentam alto grau de semelhança aos genes de humanos e de camundongos (BARBAZUK et al., 2000).

Em estudos relacionados à cronobiologia, o Zebrafish aparece como uma ferramenta útil para estabelecer bases moleculares do ritmo circadiano de vertebrados (CAHILL, 2002). Análises envolvendo atividade locomotora, agressividade, estresse, interação social e aprendizado são alguns exemplos comportamentais já descritos para esta espécie (CHAMPAGNE et al., 2010; EGAN et al., 2009; KURTA; PALESTIS, 2010; PIATO et al., 2011; SEIBT et al., 2010). Considerando sua ampla utilização na área biomédica, é essencial que sejam desenvolvidos cada vez mais estudos que o utilizem como modelo para experimentação comparado a humanos, bem como em comparações com outras espécies de peixes.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção e estresse em Zebrafish (*Danio rerio*).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos que constituíram os experimentos foram:

- a) Avaliar a atividade locomotora dos animais após a indução do estresse mediante exposição a diferentes concentrações de melatonina;
- b) Avaliar a ansiedade dos animais após a indução do estresse mediante exposição a diferentes concentrações de melatonina;
- c) Analisar o nível de glicose sanguínea dos animais após a indução do estresse mediante exposição a diferentes concentrações de melatonina através da coleta de sangue;
- d) Analisar os níveis de cortisol e lactato do organismo dos animais após a indução do estresse mediante exposição a diferentes concentrações de melatonina através da maceração de corpo inteiro;
- e) Verificar a possibilidade de utilização da melatonina como medida preventiva das manifestações decorrentes do estresse.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local, animais e instalações**

O experimento foi realizado no Biotério da Universidade Federal de Lavras, MG. Previamente, todos os procedimentos deste projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS e aprovados pelo protocolo 006/2014.

Foram utilizados 400 Zebrafish de ambos os sexos em idade adulta com peso médio de 0,4817 g e proporção macho-fêmea aproximada 1:1. Os animais foram adquiridos diretamente de um produtor, localizado na Fazenda São Domingos, no município de Muriaé - MG. O número de animais utilizado incluiu o mínimo necessário para que fossem realizadas as análises estatísticas adequadas, seguindo os princípios gerais propostos pela Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DIRETRIZ..., 2013).

Os animais foram mantidos em uma caixa de água de 500 L durante trinta dias em período de aclimação, mantidos em densidade de estocagem de dois animais por litro. A temperatura foi mantida a 26 °C utilizando termostatos e os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8h e 16h) até a saciedade com ração comercial floculada em concentrações nutricionais adequadas para a espécie. As condições de manutenção foram propostas como sendo ideais para a manutenção do bem estar dos animais.

Para a condução dos experimentos, foram utilizados oito aquários de vinte litros, com bombas de oxigenação individuais, onde a temperatura foi controlada e mantida por termostato. Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos de acordo com Castro (2014), tanto para o período de aclimação como durante o período experimental, sendo eles: temperatura 26 °C, pH 7,0 e

oxigênio dissolvido 7,5 mgO<sub>2</sub>/L, que foram monitorados diariamente; e concentração de amônia (ideal = 0), que foi monitorada uma vez por semana. O fotoperíodo foi mantido em 14:10 (14 horas de luz, com luz acesa às 7h; e 10 horas de escuro, com luz apagada às 21h), que é o indicado para espécies como o Zebrafish, que possuem hábitos mais diurnos (CASTRO, 2014).

#### **4.2 Delineamento experimental**

O período experimental foi dividido em dez blocos, sendo um dia de experimento para cada bloco, totalizando dez dias. Foi utilizado um delineamento em blocos casualizados com dez repetições, em esquema fatorial 2 x 4 (duas condições – animais submetidos e não submetidos ao estresse – e quatro doses diferentes de melatonina).

Os procedimentos foram divididos em dois experimentos: o Experimento 1, do qual foram coletados os dados referentes às variáveis bioquímicas (glicose plasmática, cortisol e lactato corporais), e o Experimento 2, do qual foram coletados os dados referentes às variáveis comportamentais (atividade locomotora e ansiedade).

Seguindo a metodologia proposta por Wang et al. (2014), os tratamentos foram compostos de diferentes doses de melatonina em grupos de animais submetidos e não submetidos ao estresse (Figura 1), sendo o animal em análise a unidade experimental. Cada bloco foi composto pelos seguintes tratamentos:

- a) Tratamento 1 (E0M): animais submetidos ao estresse com 0 de melatonina;
- b) Tratamento 2 (E1M): animais submetidos ao estresse com 10 nM de melatonina;

- c) Tratamento 3 (E2M): animais submetidos ao estresse com 0,001 mM de melatonina;
- d) Tratamento 4 (E3M): animais submetidos ao estresse com 0,1 mM de melatonina;
- e) Tratamento 5 (NE0M): animais não submetidos ao estresse com 0 de melatonina;
- f) Tratamento 6 (NE1M): animais não submetidos ao estresse com 10 nM de melatonina;
- g) Tratamento 7 (NE2M): animais não submetidos ao estresse com 0,001 mM de melatonina;
- h) Tratamento 8 (NE3M): animais não submetidos ao estresse com 0,1 mM de melatonina.

Os animais foram selecionados a partir da matriz contendo o total de 400 Zebrafish. Em cada bloco, foram alocados cinco animais pertencentes a cada tratamento, dos quais foram analisados:

- a) No Experimento I: um animal eutanasiado através da imobilização por submersão em gelo para coleta de sangue e análise de glicose; um animal eutanasiado através da imobilização por submersão em gelo e posterior congelamento a -80 °C para análise de cortisol total; um animal eutanasiado através da imobilização por submersão em gelo e posterior congelamento a -80 °C para análise de lactato corporal.
- b) No Experimento II: – um animal para análise de filmagem (atividade locomotora e ansiedade).

Os animais restantes de cada bloco foram utilizados em situações em que foi necessário repetir o procedimento, como por exemplo, durante a coleta da glicose, que em alguns casos não foi possível obter o resultado por falha do aparelho. Nos casos em que o animal restante não foi utilizado, o mesmo foi retirado da amostra final, e junto aos animais que passaram pelo procedimento de filmagem, foram alocados em um novo aquário após o término de cada bloco, onde as condições ambientais foram controladas e mantidas pelas condições indicadas por Castro (2014).

Durante o período experimental, à medida que eram retirados os animais do tanque, de maneira proporcional também era retirada a quantidade de água do tanque de estocagem. Assim, os animais utilizados para os blocos seguintes estariam mantidos nas mesmas condições.

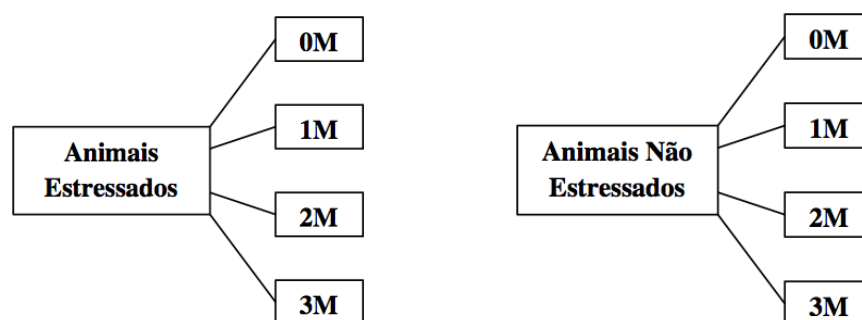


Figura 1 Delineamento experimental caracterizado por oito tratamentos, utilizando diferentes doses de melatonina (0M, 1M, 2M, 3M) em animais estressados e não estressados

### 4.3 Exposição à melatonina

Com base na metodologia testada por Wang et al. (2014), realizada em condições ambientais semelhantes, foram dissolvidos 0,2323 g de melatonina em 10 mL de etanol. Na sequência, foi realizado um processo de diluição

utilizando quatro aquários de 20 L, preenchidos com a quantidade adequada de água destilada para que fossem atingidas as concentrações de melatonina (0; 10 nM; 0,001 mM; 0,1 mM).

Para cada bloco, utilizando materiais e técnicas adequados para a espécie, os animais foram selecionados aleatoriamente do tanque de estocagem e transportados para os recipientes contendo as diferentes doses de melatonina, referentes a cada tratamento. Considerando que as concentrações mais baixas de melatonina no organismo do animal ocorrem durante o início do período de luz, a exposição à melatonina ocorreu às 7h, exatamente no momento em que a luz acendeu. Os animais permaneceram sob o efeito das diferentes doses de melatonina durante as 3 horas que seguiram, de maneira concomitante ao tempo em que foram submetidos ao estresse.

#### **4.4 Resposta ao estresse**

Com base em uma metodologia aceita pela comunidade científica previamente testada em Zebrafish (RAMSAY et al., 2006), o mecanismo indutor do estresse em ambos os experimentos foi a superpopulação.

Durante o período experimental, os animais pertencentes aos grupos que foram submetidos ao estresse foram mantidos sob condição de hipóxia por alta densidade de estocagem, em que a quantidade estocada foi de cinco animais por 125 mL de água, mantendo uma proporção de quarenta animais por litro durante três horas. Este mecanismo é considerado eficiente e foi previamente testado em Zebrafish (BARRIONUEVO; FERNANDES; ROCHA, 2010; MUSTAFA; DHAWALE; DHAWALE, 2008). Os animais foram mantidos em jejum nas 24h antecedentes à execução do experimento, como sugerido e realizado por Wang et al. (2014).

Para proporcionar tais condições experimentais, foram utilizados cinco animais por tratamento em cada bloco. Nos tratamentos onde houve submissão ao estresse, os cinco animais foram estocados em recipientes de 500 mL contendo 125 mL de água, mantidos na proporção de quarenta animais por litro de água, referente à condição de estresse por alta densidade de estocagem. Nos tratamentos onde não houve submissão ao estresse, os cinco animais foram estocados em aquários de 3 L contendo 2,5 L de água, mantidos na proporção de dois animais por litro de água, que é o ideal indicado para a espécie (CASTRO, 2014) (Figura 2).

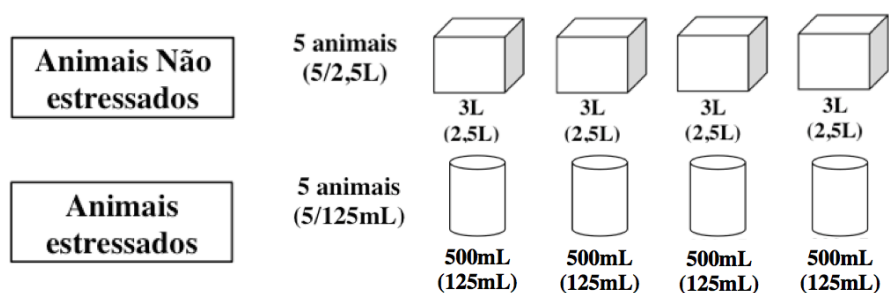


Figura 2 Representação esquemática da situação em que os animais foram submetidos durante a condição de estresse

#### 4.5 Experimento I: “Influência da melatonina sobre os parâmetros bioquímicos de estresse em Zebrafish (*Danio rerio*)”

Serão descritos os procedimentos de coleta e análises bioquímicas (glicose, cortisol e lactato), os quais foram realizados no Experimento I.

#### **4.5.1 Procedimentos de coleta e análises bioquímicas: Glicose, Cortisol e Lactato**

Para que fosse realizada a coleta de sangue, foram eutanasiados através da imobilização por submersão em gelo 80 animais ao final dos dez blocos, e seguiu-se o protocolo proposto por Eames et al. (2010), que utiliza a técnica de perfuração direta do coração. Os peixes foram anestesiados, e, em seguida, foi realizado um corte anterior à articulação da nadadeira peitoral utilizando uma tesoura, atingindo diretamente o coração.

O sangue total foi analisado imediatamente após a coleta através do equipamento Breeze 2<sup>®</sup>, e foram obtidos os valores de glicose sanguínea (mg/dL) através da leitura de fitas colorimétricas contendo uma gota de sangue.

O tamanho reduzido do Zebrafish não permite que os níveis de cortisol e lactato sejam analisados através da coleta sanguínea. Sendo assim, seguiu-se a metodologia proposta por diversos autores (DHANASIRI; FERNANDES; KIRON, 2013; SFAKIANAKIS; LERIS; KENTOURI, 2012; THOMAS et al., 2013; YEH; GLÖCK; RYU, 2013), na qual a análise em Zebrafish foi baseada na técnica de maceração do corpo inteiro, também denominada como “*whole-body*”.

Ao final de cada período, foram eutanasiados dois animais de cada tratamento através da imobilização por submersão em gelo, aceita pelo guia de eutanásia em zebrafish como uma das técnicas indicadas. Os animais foram mantidos em situação de congelamento em freezer sob temperatura de -80 °C. Posteriormente, os animais foram submetidos ao processo de maceração de corpo inteiro, com procedimentos de extração e análise baseados em protocolos específicos para cada variável, descritos a seguir.

Para a extração do cortisol, seguiu-se o protocolo proposto por Canavello et al. (2011), em que as amostras foram maceradas em nitrogênio



líquido utilizando um cadinho de porcelana, diluídas em solução fosfato-salino (PBS), dissolvidas em éter dietílico, centrifugadas por 5 minutos a 3.500 rpm, secas em vapor de nitrogênio e mantidas resfriadas a -20 °C. Para o procedimento de leitura, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de PBS e a montagem da placa seguiu as instruções do fabricante. O kit utilizado para leitura em placa foi o de ELISA (Cortisol ELISA kit – USA Diagnóstica), testado e validado para utilização em peixes por Velasco-Santamaría e Cruz-Casallas (2007).

Para a extração do lactato, o protocolo seguido foi o de Sancho et al. (2009). De maneira semelhante, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido utilizando um cadinho de porcelana. Foi adicionado, no volume de 5 x o peso do animal, uma solução de fosfato, e as amostras foram centrifugadas a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído de acordo com a curva de calibração. Na sequência, a montagem da placa seguiu as instruções do fabricante (Ref. 138, Labtest), previamente testado em peixes, inclusive em zebrafish (TONI et al., 2014; ZENKI et al., 2014).

#### **4.6 Experimento II: “Influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção em Zebrafish (*Danio rerio*)”**

Serão descritos os procedimentos de coleta e análises comportamentais (atividade locomotora e ansiedade), os quais foram realizados no Experimento II.

##### **4.6.1 Variáveis comportamentais**

A análise comportamental incluiu a avaliação da atividade locomotora e da ansiedade. Baseando-se na metodologia proposta por Pittman e Ichikawa

(2013), a avaliação consistiu em um processo de filmagem com duração de cinco minutos, realizada com oito câmeras semiprofissionais, posicionadas a 30 cm de distância de cada aquário e com ajuste de foco (Figura 3). Em cada bloco, apesar das câmeras serem do mesmo modelo, cada aquário foi filmado por uma câmera diferente, evitando quaisquer interferências em virtude do material utilizado.



Figura 3 Posicionamento da câmera e do aquário durante o processo de filmagem

#### 4.6.1.1 Registro da atividade locomotora

Os animais foram avaliados individualmente através da técnica dos quadrantes, utilizada e recomendada por diversos estudos (CAMPOS, 2009; CARMO et al., 2010; MERIGHE et al., 2004; MIYAI, 2013). Cada aquário foi dividido em doze quadrantes, enumerados da esquerda para a direita e de cima para baixo (Figura 4, A).

A avaliação consistiu na contagem dos quadrantes ocupados pelo animal durante os cinco minutos de filmagem, chegando a um valor numérico final referente à frequência de mudança de quadrantes. A avaliação foi realizada por dois avaliadores que não acompanharam o processo de filmagem durante o experimento. A análise foi realizada de maneira totalmente cega, ou seja, nenhum avaliador tinha conhecimento do tratamento que estava sendo avaliado.

#### 4.6.1.2 Registro da ansiedade

Com base na metodologia realizada por Pittman e Ichikawa (2013), sob as mesmas condições individuais, os aquários foram demarcados por um marcador permanente de cor diferente daqueles utilizados para demarcar os quadrantes. Cada aquário tinha uma marcação ao meio da coluna de água (Figura 4, B).



Figura 4 Aquário utilizado para o processo de filmagem. A: marcação do quadrante; B: marcação da linha divisória

Durante os cinco minutos de filmagem, o tempo de permanência na superfície ou na profundidade do aquário por parte do animal foi quantificado, atingindo um valor numérico final em minutos e segundos.

#### **4.7 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas com base em análises de variância através do teste F com significância ao nível de 5%. O programa utilizado foi o R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). Quando diferenças significativas foram observadas na análise de variância, foi realizada a regressão linear.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Experimento I: “Influência da melatonina sobre os parâmetros bioquímicos de estresse em Zebrafish (*Danio rerio*)”

Para a análise da glicose plasmática (mg/dL) não houve diferença significativa na interação entre os grupos (animais estressados e não estressados) e as doses de melatonina testadas (0M, 1M, 2M, 3M). Ou seja, os fatores atuam de maneira independente. Quando observados de maneira isolada, também não houve diferença significativa entre os grupos estressado e não estressado e entre as doses de melatonina. A Tabela 1 demonstra os valores médios encontrados para a glicose plasmática nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 1 Concentrações plasmáticas médias de glicose (mg/dL) em Zebrafish submetidos e não submetidos ao estresse, mantidos em diferentes doses de melatonina

DOSE DE MELATONINA (NS)	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE GLICOSE (mg/dL)	
	CONDIÇÃO DE ESTRESSE (NS)	
	Estressado	Não estressado
0	120	148
10 nM	202	140
0,001 mM	129	157
0,1 mM	173	151

NS: Teste f não significativo a nível de 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ).

Pode-se observar que os valores encontrados estiveram acima do parâmetro para a glicose plasmática basal em Zebrafish, que possui uma taxa de variação fisiológica com valores próximos a 80 mg/dL, de acordo com Eames et

al. (2010). O aumento da glicose sanguínea relacionado ao estresse foi descrito em teleósteos por Barton e Iwana (1991), principalmente mediado pelos efeitos das catecolaminas e da liberação de glicose hepática, que é considerada como a principal fonte de carboidrato reserva nos peixes.

De acordo com Moreira et al. (2011), o aumento da glicose sanguínea indica que ocorreu maior consumo de energia, o que traduz uma resposta metabólica elevada no animal. Sendo assim, geralmente seu aumento está relacionado a situações de estresse, principalmente para caracterizar respostas secundárias (NAVARRO, 2010; TORT, 2011; WENDELAAR BONGA, 1997). De acordo com Anusha et al. (2013) e Dhanasiri, Fernandes e Kiron (2013), os valores de glicose plasmática tendem a aumentar em situações de estresse, como o que foi encontrado neste experimento.

Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de que todos os animais tenham sido submetidos a uma condição de estresse, mesmo os animais pertencentes ao grupo não estressado. Ocorrências que possam não ter sido previstas e controladas podem ter gerado estresse em alguns dos animais pertencentes ao grupo dos animais não submetidos ao estresse. Porém, para este grupo, toda a manipulação e transporte durante o período experimental seguiram exatamente os procedimentos indicados para a espécie (DAMMSKI et al., 2011).

Na tentativa de justificar o fato ocorrido, de acordo com Serra (2010), sabe-se que existem inúmeras condições capazes de induzir diferentes situações de estresse, ainda que todas as variáveis ambientais sejam controladas. Tais situações não dependem apenas das variáveis físicas, como o manejo e o transporte, mas também das variáveis influenciadas pela individualidade biológica do animal, fator este que não pode ser controlado. E, ainda assim, de acordo com Lima et al. (2006), em condições de aquicultura, ocorre um somatório de desafios naturais e daqueles impostos pela atividade desenvolvida

com os animais, como, por exemplo, as práticas de manejo, o transporte, os tratamentos e as altas densidades de estocagem.

Carneiro e Urbinati (2001) afirmam que existem muitos bioindicadores para a avaliação do estresse. Talvez, para o Zebrafish, a glicose não seja o melhor indicador, considerando que houve uma grande variação individual nos valores entre os animais. Mushtaq et al. (2014) afirmaram que a glicose parece não ser uma das principais variáveis afetadas no Zebrafish durante o estresse agudo. Além disso, a faixa de variação fisiológica da glicose sofreu efeito de muitos fatores, tanto externos quanto internos.

Para a variável cortisol, analisada com amostras de corpo inteiro em ng/g de tecido, a interação entre os grupos (animais submetidos e não submetidos ao estresse) e as doses de melatonina testadas (0M, 1M, 2M, 3M) não foi significativa ( $p>0,05$ ), ou seja, os fatores atuam independentemente (Tabela 2).

Tabela 2 Concentrações médias dos níveis de cortisol corporal (ng/g) em Zebrafish submetidos e não submetidos ao estresse, mantidos em diferentes doses de melatonina

DOSE DE MELATONINA *	CONCENTRAÇÕES CORPORAIS DE CORTISOL (ng/g)	
	CONDIÇÃO DE ESTRESSE (NS)	
	Estressado	Não estressado
0	16,5	19,7
10 nM	30,7	30
0,001 mM	33	28,9
0,1 mM	22,5	25,9

NS: Teste f não significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p>0,05$ ); \*: Teste f significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p<0,01$ ).

Como também pode ser observado, não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) para os valores de cortisol corporal (ng/g) entre os dois grupos (animais estressados e não estressados). Por outro lado, o efeito do fator “dose” foi significativo ao nível de 1% ( $p<0,01$ ), ou seja, existe pelo menos uma diferença entre os efeitos das doses de melatonina testadas nos diferentes tratamentos.

Os valores encontrados neste experimento estiveram acima dos parâmetros basais, indicando uma condição de estresse nos animais. De maneira semelhante à glicose, em ambos os grupos, ocorreu aumento dos níveis de cortisol.

Apesar de inúmeros trabalhos terem sido realizados analisando os níveis de cortisol de corpo inteiro de peixes (CANAVELLO et al., 2011; CLARK; BOCZEK; EKKER, 2011; DHANASIRI; FERNANDES; KIRON, 2013; MUSTAFA; DHAWALE; DHAWALE, 2008; RAMSAY et al., 2006, 2009; YEH; GLÖCK; RYU, 2013; ZUBERI; BROWN; ALI, 2014), os parâmetros basais ainda são descritos como sendo difíceis de serem estabelecidos. Pottinger, Carrick e Yeomans (2002) relatam que o cortisol pode variar de 2 a 8 ng/g em condições normais, enquanto Jesus, Hirano e Inui (1991) afirmam que o valor basal está entre 2.5 e 11 ng/g. De maneira semelhante, Jesus e Hirano (1992) encontraram valores entre 2,5 e 20 ng/g.

Especificamente em Zebrafish, Dhanasiri, Fernandes e Kiron (2013) encontraram o valor de  $2,51 \pm 0,51$  referente à condição de repouso. Ramsay et al. (2006) descreveram o valor médio de apenas 9 ng/g de cortisol de corpo inteiro para animais estressados. A dificuldade em estabelecer parâmetros relaciona-se ao fato de que a resposta do cortisol pode sofrer influência de diversos fatores, entre eles os fatores genéticos, o estágio de desenvolvimento do animal e o tipo de estresse (BARTON, 2002). Serra (2010) cita também fatores externos, como a salinidade e o estado nutricional.



Na sequência, considerando o valor significativo da análise de variância, foi realizada a análise de regressão linear para o fator “dose”, e pode-se observar na Figura 5 que o nível de cortisol (ng/g) aumenta até determinada dose, representada pelo ponto máximo, referente ao valor de 0,00085 mM. Depois, na medida em que a dose de melatonina aumenta, o valor do cortisol corporal (aproximadamente 32,6 ng/g) começa a diminuir, independentemente do grupo.

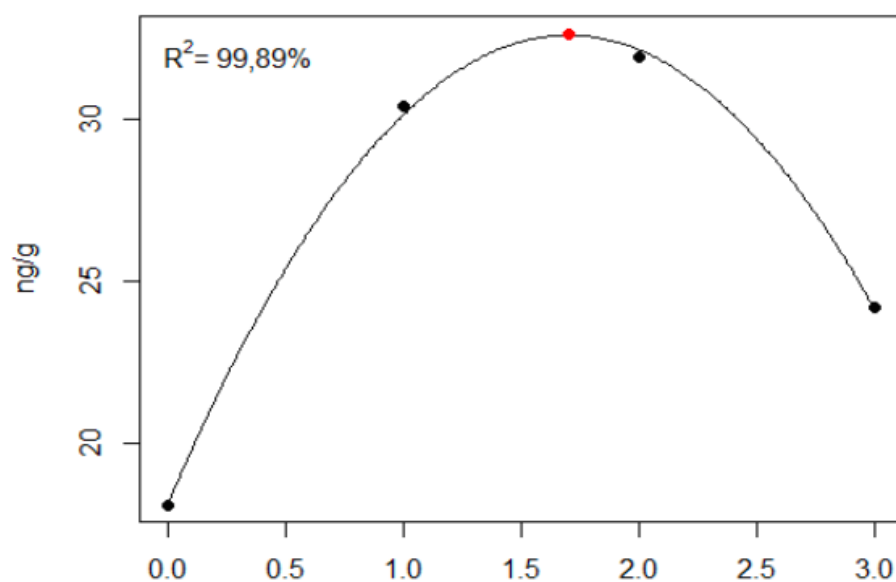


Figura 5 Modelo ajustado para o nível de cortisol corporal (ng/g) (eixo y) em função das diferentes doses de melatonina (eixo x), independente da condição de estresse

Na Figura 6, pode ser observada a relação entre os dois grupos (animais estressados e não estressados) para as diferentes doses de melatonina, e nota-se que o comportamento é similar.

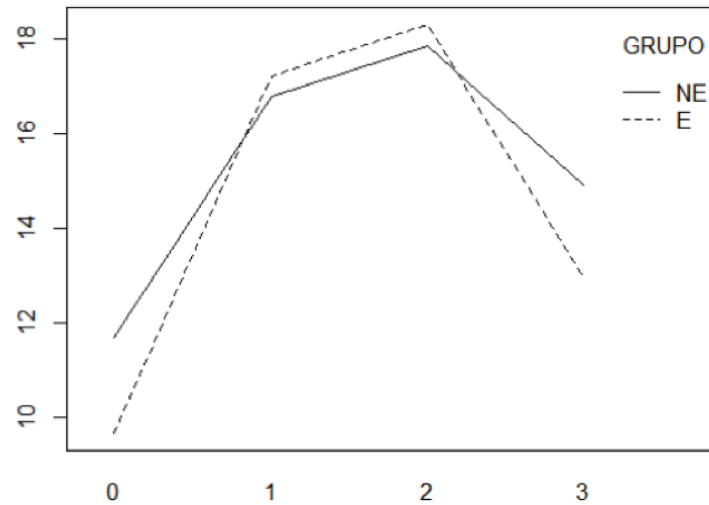


Figura 6 Eixo x: Doses de melatonina; Eixo y: níveis de cortisol total

Além disso, observa-se uma regressão quadrática no comportamento das doses para os dois grupos ( $p < 0,05$ ), confirmado também pela Figura 7, que traduz a homogeneidade da variância entre os tratamentos.

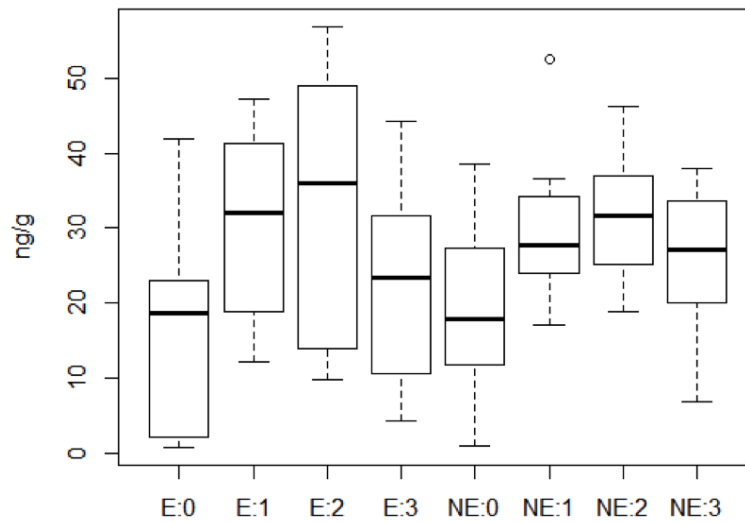


Figura 7 Tratamentos realizados e níveis de cortisol total

Os resultados encontrados indicaram que as doses de melatonina utilizadas não foram suficientes pra prevenir o aumento do cortisol durante o estresse. A melatonina foi capaz de conter o aumento do cortisol, porém, apenas nas doses mais elevadas (2M = 0,001 mM e 3M = 0,1 mM).

Com base no grupo controle (grupo E0, com dose de melatonina testada = 0), os valores encontrados não foram suficientes para sugerir a utilização da melatonina, nas doses testadas, como medida preventiva para o estresse, pois todos os valores de cortisol corporal (ng/g) foram superiores ao valor encontrado para o grupo controle. Ainda assim, a melatonina aparece como uma possível interventora no aumento desta variável durante o estresse, sugerindo que doses mais altas do que as testadas neste experimento possam gerar resultados eficientes na redução do cortisol corporal, e, conseqüentemente, do estresse.

Torres-Farfan et al. (2003) observaram uma redução do cortisol em mamíferos após administração de melatonina. Em ratos, a supressão da melatonina promoveu aumento do cortisol (TORRES-FARFAN et al., 2004). Huang, Ruoff e Fjellidal (2010) afirmam que os níveis de cortisol parecem ser influenciados pela luz. Além disso, encontraram uma possível relação inversa entre a melatonina e o cortisol em salmão, indicando seu efeito em peixes.

Azpeleta et al. (2010) encontraram, em Zebrafish, uma redução significativa dos níveis de cortisol utilizando a dose de 10 µg/g de melatonina, concluindo com seus resultados que a melatonina possui a capacidade de reduzir os níveis de cortisol no plasma de teleósteos. Neste sentido, entende-se que a melatonina exerce uma atividade sobre a redução do estresse oxidativo, confirmada por Dias et al. (2013), os quais concluem que tal redução pode ser influenciada pela atividade direta ou indireta da melatonina.

Os resultados encontrados para a variável cortisol corporal (ng/g) sugerem que doses mais altas de melatonina devem ser testadas para que seja encontrado o valor ideal capaz de reduzir o estresse. É importante que as doses

testadas sejam eficientes, porém, efeitos colaterais que possam gerar prejuízos biológicos iguais ou superiores àqueles produzidos pela condição de estresse devem ser evitados. Na tentativa de evitar tais efeitos, as doses testadas neste experimento foram relativamente baixas, não sendo suficientes para evitar o estresse.

Para a variável lactato, utilizando análises de corpo inteiro em mg/g tecido úmido, a interação entre os grupos de animais estressados e não estressados e as doses de melatonina testadas não foi significativa ( $p > 0,05$ ), assim como quando observados o efeito de cada fator, o que significa que todos os fatores atuaram de maneira independente. Houve uma variação muito baixa entre os valores médios de lactato quando comparados os animais submetidos e não submetidos ao estresse, justificando o fato da análise de variância não detectar diferenças significativas entre os grupos e entre as doses (Tabela 3).

Tabela 3 Concentrações médias de lactato corporal (mg/g) em Zebrafish submetidos e não submetidos ao estresse, mantidos em diferentes doses de melatonina

DOSE DE MELATONINA (NS)	CONCENTRAÇÕES CORPORAIS DE LACTATO (mg/g)	
	CONDIÇÃO DE ESTRESSE (NS)	
	Estressado	Não estressado
0	0,941	0,846
10 nM	0,988	0,845
0,001 mM	0,942	0,999
0,1 mM	1,065	0,935

NS: Teste f não significativo a nível de 5% de probabilidade ( $p > 0,05$ ).

Observa-se pouca diferença entre as doses dentro de cada grupo, o que justifica a independência entre os fatores. Além disso, o comportamento das

doses dentro de cada grupo foi muito semelhante, como pode ser observado também na Figura 8.

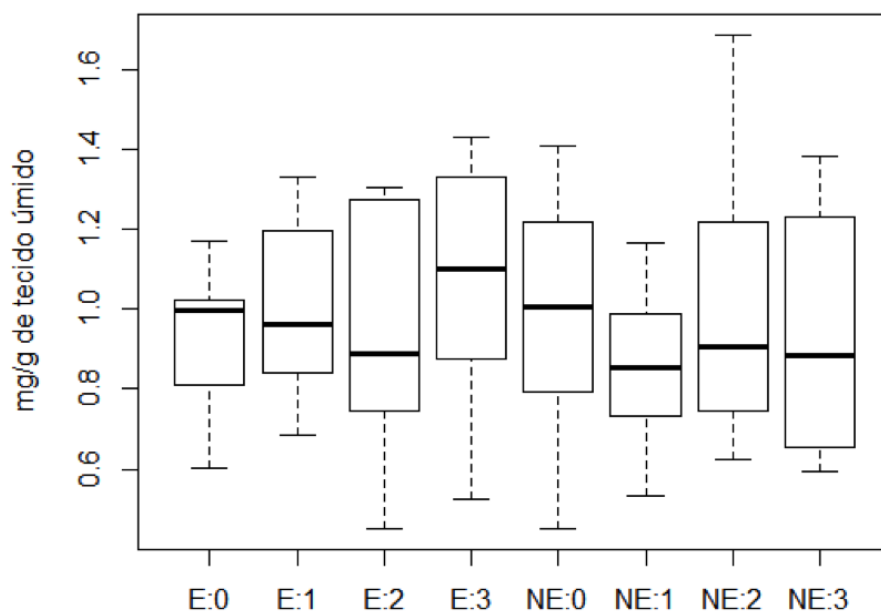


Figura 8 Tratamentos realizados e níveis de lactato total

Thomas et al. (2013) definiram o lactato como sendo um subproduto do catabolismo anaeróbio, que se acumula no músculo durante movimentos natatórios de explosão, podendo ser utilizado como um indicador mensurável da atividade metabólica anaeróbia. Entretanto, embora seja um parâmetro utilizado como indicador de estresse, nesse caso não apresentou variação significativa, demonstrando um comportamento semelhante ao da glicose.

Os achados deste experimento para os valores de lactato estiveram acima do parâmetro em repouso para Zebrafish, que é de  $0,28 \text{ mg/g} \pm 0,17$  (PLAUT; GORDON, 1994). Barrionuevo, Fernandes e Rocha (2010) encontraram valores acima do basal em situações de hipóxia aguda. Sfakianakis, Leris e Kentouri (2012) perceberam um aumento das concentrações de lactato

após estresse por temperatura. Plaut e Gordon (1994) testaram diferentes tipos de atividades estressoras em Zebrafish, e também não encontraram diferenças significativas nas concentrações de lactato de corpo inteiro.

Os resultados encontrados para o lactato corporal (mg/g), de maneira semelhante à glicose, não sugerem a utilização da melatonina como um hormônio capaz de reduzir o estresse. Porém, assim como a glicose, esta variável pode sofrer muitas variações durante uma situação estressante, podendo não ser, neste caso, a melhor indicadora.

## 5.2 Experimento II: “Influência da melatonina sobre os parâmetros de locomoção em Zebrafish (*Danio rerio*)”

A Figura 9 demonstra que não houve diferença significativa entre as análises realizadas pelos avaliadores.

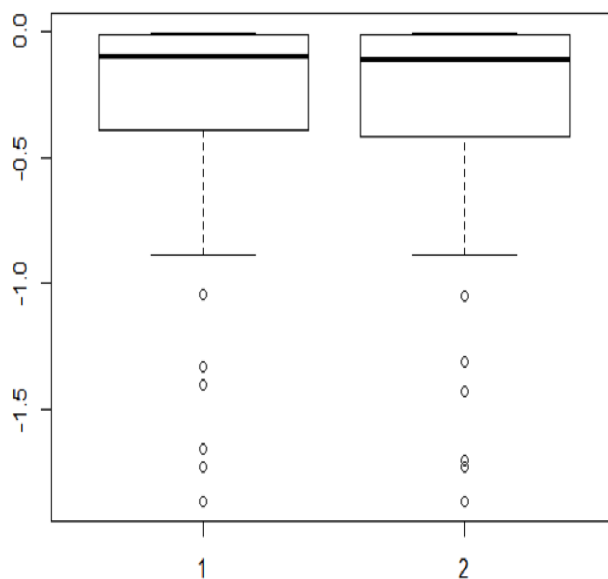


Figura 9 Efeito de observador. Eixo x: avaliadores; Eixo y: valores referentes à diferença entre as avaliações

A análise de variância não encontrou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) para a variável “grupo”, o que significa que não houve diferenças entre os grupos estressado e não estressado. Porém, houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para a variável “dose” dentro de cada grupo (animais estressados e não estressados). De acordo com os dados encontrados, ocorreu um efeito quadrático quando observado o efeito das diferentes doses de melatonina ( $p < 0,05$ ), em que apenas a maior dose (3M = 0,1 mM) foi capaz de conter o aumento da atividade locomotora no grupo dos animais submetidos ao estresse (Figura 10). Para o grupo de animais não submetidos ao estresse, os resultados não foram significativos ( $p > 0,05$ ).

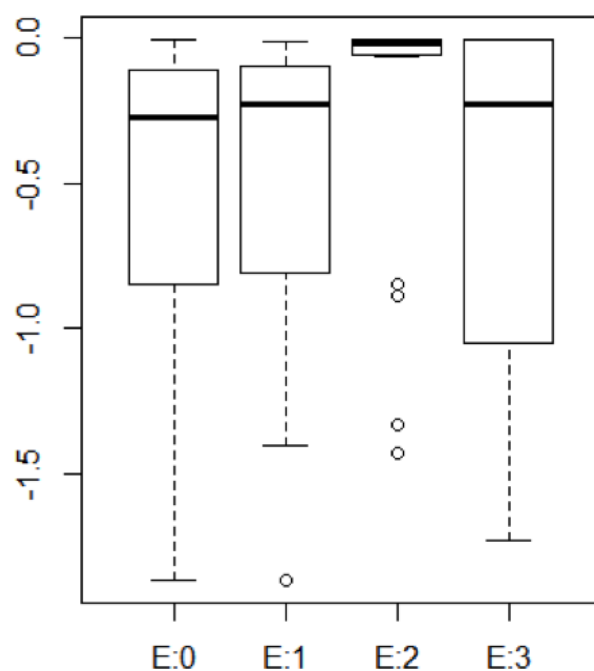


Figura 10 Diferença no efeito das doses de melatonina sobre a contagem de quadrantes dentro do grupo E (animais submetidos ao estresse)

Em peixes, a resposta comportamental a agentes estressores é similar àquela encontrada em outros grupos de vertebrados. Tal resposta é dependente do tipo de agente estressor, e pode ser considerada como uma forte indicadora da ocorrência de respostas fisiológicas (GALHARDO; OLIVEIRA, 2006).

Øverli, Kotzian e Winberg† (2002) afirmaram que em peixes, uma situação de estresse agudo faz com que a atividade locomotora do animal aumente, principalmente em reflexo aos níveis de cortisol aumentados. De modo geral, os valores quantificados neste experimento foram relativamente altos, caracterizando situações de estresse. Carvalho (2014) encontrou resultados semelhantes, com médias aproximadas em animais pouco ansiosos e muito ansiosos. Carmo (2010) encontrou valores bem inferiores, porém, utilizando *Trichogaster leeri*, que é uma espécie de tamanho maior.

Os resultados da contagem de mudança de quadrantes envolvendo o efeito quadrático das doses de melatonina no grupo dos animais estressados foram semelhantes aos resultados para análise do cortisol no Experimento 1. Serra (2010) encontrou resultados onde o aumento da atividade locomotora, também avaliada pela análise de contagem de quadrantes, aumentou significativamente os níveis de cortisol. Porém, afirma que seu efeito no comportamento ainda não está completamente elucidado.

A melatonina é conhecida por afetar a atividade locomotora de peixes, principalmente em animais de hábitos diurnos, como o Zebrafish (ZHDANOVA et al., 2001, 2002). Neste experimento, a melatonina não foi capaz de evitar a ocorrência da situação de estresse. Porém, foi capaz de reduzir as manifestações motoras do estresse nos animais quando utilizada a dose mais alta. Rawashdeh et al. (2007) encontraram em seu experimento, utilizando Zebrafish, uma manutenção da atividade locomotora de animais expostos à melatonina, porém, ressaltam que as concentrações testadas eram muito baixas. Dias et al. (2013)



concluíram, através de uma revisão de literatura, que a melatonina exerce uma atividade sobre a redução do estresse, atuando como uma molécula antioxidante.

Os achados aqui encontrados reforçam a afirmativa de Azpeleta et al. (2010) de que a melatonina pode ser capaz de regular a atividade locomotora em teleósteos. Além disso, os resultados confirmam que seus efeitos sobre a atividade locomotora podem ser afetados por fatores como a dosagem e o tempo, considerando que as doses de melatonina foram testadas em animais estressados durante 3 horas. De maneira semelhante, López-Olmeda, Madrid e Sánchez-Vázquez (2006) concluíram que os efeitos da melatonina sobre a atividade locomotora dependem do tempo de administração, bem como dos padrões de atividade da espécie. Neste experimento, a espécie testada possuía hábitos diurnos, o que faz com que os efeitos da melatonina na diminuição da locomoção possam ser evidenciados durante o dia, quando a atividade locomotora do animal é maior.

Ainda que os resultados deste experimento não tenham demonstrado a eficiência na redução da atividade locomotora pelas doses de melatonina testadas, ocorreu um efeito de contenção do aumento da locomoção nos animais estressados. Nos achados de Zhdanova et al. (2001, 2008), Zebrafish atingiram estágios semelhantes ao sono enquanto estiveram sob efeito da melatonina, efeito este mediado por receptores específicos. Azpeleta et al. (2010) também concluíram em seus resultados que a melatonina possui uma ação periférica capaz de reduzir a atividade locomotora de um peixe, sugerindo um efeito sedativo do hormônio em teleósteos.

A ansiedade foi avaliada neste experimento através do percentual de permanência do animal na superfície ou na profundidade, tanto para os animais submetidos quanto para os não submetidos ao estresse, ambos sob o efeito das diferentes doses de melatonina. Carvalho (2014) afirma que o Zebrafish tem emergido ultimamente como um modelo de estresse e ansiedade, considerado

por diversos autores como um vantajoso modelo experimental (BERGHMANS et al., 2007; PITTMAN; ICHIKAWA, 2013; SÁNCHEZ-VÁSQUEZ et al., 2011; SPENCE et al., 2008).

Com relação à avaliação da ansiedade, os resultados são apresentados pela Figura 11, que confirmam a ausência de efeito por parte do observador. Não houve diferença significativa da interação entre os grupos e as doses testadas ( $P > 0,05$ ).

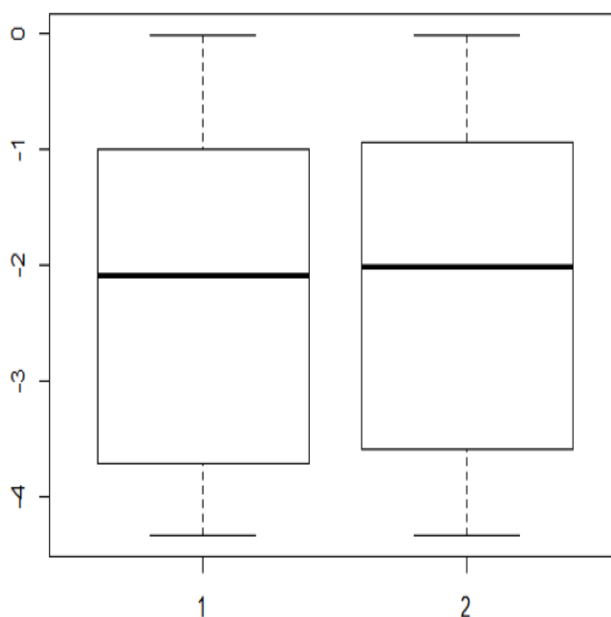


Figura 11 Efeito de observador. Eixo x: avaliadores; Eixo y: valores encontrados para o tempo de permanência na profundidade do aquário

A dose de melatonina afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) através de um efeito quadrático o percentual de tempo de permanência (PTP) na profundidade, considerando as diferentes doses de melatonina testadas. Apenas a maior dose

(3M = 0,1 mM) foi capaz de fazer com que os animais pertencentes ao grupo estressado reduzissem seu PTP na profundidade do aquário (Figura 12).

De maneira semelhante à atividade locomotora, as doses de melatonina testadas não foram capazes de diminuir o PTP dos animais na profundidade do aquário. Esse resultado sugere que doses mais altas do que as testadas possam ser mais eficientes, já que ocorreu um efeito de contenção do aumento da PTP na profundidade como efeito apenas da maior dose de melatonina (0,01 mM).

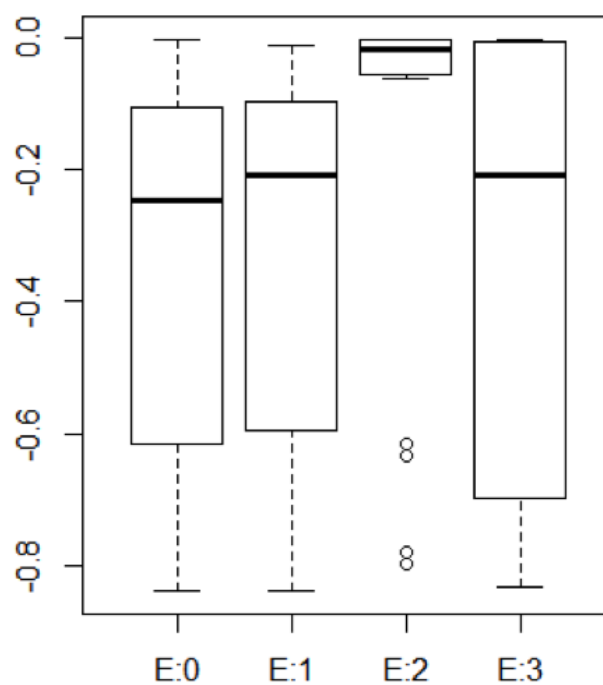


Figura 12 Diferença no efeito das doses de melatonina sobre o percentual de tempo na profundidade do aquário dentro do grupo E (animais submetidos ao estresse)

Quando considerado o grupo de animais não submetidos ao estresse, os resultados encontrados não foram significativos ( $p > 0,05$ ).

A grande maioria dos animais permaneceu na profundidade do aquário durante as análises. De acordo com Galhardo e Oliveira (2006), quando o estresse ocorre, a resposta comportamental do animal envolve a fuga ou a imobilização. Se o contexto ambiental não permite a fuga, outras alterações comportamentais significativas podem ocorrer, como mudanças no ritmo e no padrão natatório, redução ou alteração do comportamento antipredatório, interrupção do comportamento alimentar (relacionado à impulsividade) e aumento da procura de abrigo.

Como característica da espécie, dada uma situação de estresse, existe uma tendência do Zebrafish em se afastar da superfície, buscando um local seguro no ambiente novo (CACHAT et al., 2010; EGAN et al., 2009; GERLAI, 2010; STEWART et al., 2010). Campos (2009), trabalhando com *Leporinus piau*, encontrou resultados semelhantes, em que a espécie também permaneceu na profundidade. Serra (2010), utilizando Matrinxãs (*Brycon amazonicus*), também observou um comportamento de permanência no fundo do aquário durante uma situação estressante.

Considerando o fato de que a dose mais alta de melatonina testada (3M = 0,1 mM) foi determinante para diminuir tanto a atividade locomotora e a ansiedade como os níveis de cortisol corporal nos animais estressados, os resultados encontrados neste experimento sugerem que análises comportamentais envolvendo a atividade locomotora e a ansiedade podem ser utilizadas concomitantemente às variáveis bioquímicas.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que apenas a dose de melatonina 0,1 mM foi determinante na contenção do aumento dos níveis de cortisol corporal (ng/g), da atividade locomotora e da ansiedade em Zebrafish (*Danio rerio*) submetidos ao estresse.

## REFERÊNCIAS

ANUSHA, K. S. Acclimation of Zebrafish to transport stress. **Zebrafish**, New Rochelle, v. 10, n. 1, p. 87-98, Mar. 2013.

AZPELETA, C. et al. Melatonin attenuates the acute stress response in a teleost fish, *Carassius auratus*. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 190, n. 665, p. 110-111, 2007.

AZPELETA, C. et al. Melatonin reduces locomotor activity and circulating cortisol in goldfish. **Hormones and Behavior**, New York, v. 57, n. 3, p. 323-329, Mar. 2010.

BARBAZUK, W. B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, Sept. 2000.

BARRIONUEVO, W. R.; FERNANDES, M. N.; ROCHA, O. Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 2, p. 425-434, 2010.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 517-525, July 2002.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, Palo Alto, v. 1, p. 3-26, 1991.

BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. **Restorative Neurology and Neuroscience**, Magdeburg, v. 26, n. 2/3, p. 71-80, 2008.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and

diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, New York, v. 94, n. 1, p. 75-80, Nov. 2009.

BERGHMANS, S. et al. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. **Epilepsy Research**, New York, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2007.

BERMÚDEZ, F. F.; FORBES, J. M.; INJIDI, M. H. Involvement of melatonin and thyroid hormones in the control of sleep, food intake and energy metabolism in the domestic fowl. **The Journal of Physiology**, Oxford, v. 337, p. 19-27, 1983.

BEZERRA, K. S. et al. Crescimento e sobrevivência da tilápia chitralada submetida a diferentes fotoperíodos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 737-743, jun. 2008.

BISWAS, A. K. et al. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 65, n. 3, p. 811-821, Sept. 2004.

CACHAT, J. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult Zebrafish. **Nature Protocols**, London, v. 5, n. 11, p. 1786-9917, Nov. 2010.

CAHILL, G. M. Clock mechanisms in zebrafish. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 309, n. 1, p. 27-34, July 2002.

CAMPOS, M. L. de. Influência do diazepam na reação de alarme em peixes. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 9., 2009, São Lourenço. **Anais...** São João Del Rei: UFSJ, 2009. p. 1-3.

CANAVELLO, P. R. et al. Measuring endocrine (Cortisol) responses of Zebrafish to stress. In: \_\_\_\_\_. **Zebrafish neurobehavioral protocols**. New York: Humana, 2011. p. 135-142.

CARMO, W. P. D. do et al. Ocupação da coluna da água por machos de *Trichogaster leeri* (Bleeker, 1852) (Perciformes, Osphronemidae) em aquário. **Semina: Ciências Biológicas da Saúde**, Passo Fundo, v. 31, n. 1, p. 21-27, 2010.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 297-304, Apr. 2001.

CASTRO, T. F. D. **Efeito genotóxico do Spent Por Liner (SPL) em organismos aquáticos**. 2014. 45 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

CARVALHO, T. S. de. **A intensificação do comportamento tipo ansiedade induzido por cafeína em *Daniorerio*(zebrafish) é prevenida pelo tratamento com  $\alpha$ -Tocoferol e L-NAME**. 2014. 105 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

CLARK, K. J.; BOCZEK, N. J.; EKKER, S. C. Stressing Zebrafish for behavioral genetics. **Reviews in the Neuroscience**, Berlin, v. 22, n. 1, p. 49-62, 2011.

CHAMPAGNE, D. L et al. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. **Behavioral Brain Research**, New York, v. 214, n. 2, p. 332-342, Dec. 2010.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish**: manual de criação em biotério. Curitiba: UFPR, 2011. 106 p.

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

DIRETRIZ brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília, 2013. 50 p.



DHANASIRI, A. K. S.; FERNANDES, J. M. O.; KIRON, V. Liver transcriptome changes in zebrafish during acclimation to transport-associated stress. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065028>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

EAMES, S. C. et al. Blood sugar measurement in Zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. **Zebrafish**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 205-213, 2010.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioral Brain Research**, New York, v. 205, n. 1, p. 38-44, Dec. 2009.

FALCÓN, J. et al. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 469-482, Feb. 2010.

FALCÓN, J. et al. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 18, n. 18, p. 81-88, Mar. 2007.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. Bem-estar animal: um conceito legítimo para peixes? **Revista de Etologia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 51-61, 2006.

GALL, C. von; STEHLE, J. H.; WEAVER, D. R. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 309, n. 1, p. 151-162, July 2002.

GERLAI, R. Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research? **Behavioural Brain Research**, New York, v. 207, n. 2, p. 223-231, Mar. 2010.

HERRERO, M. J. et al. Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptophan and melatonin. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 177, n. 3, p. 319-326, Apr. 2007.

HUANG, T.; RUOFF, P.; FJELLDAL, P. G. Effect of continuous light on daily levels of plasma melatonin and cortisol and expression of clock genes in pineal gland, brain, and liver in atlantic salmon postsmolts. **Chronobiology International**, London, v. 27, n. 9/10, p. 1715-1734, 2010.

JESUS, E. G. T. de; HIRANO, T. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 85, n. 1, p. 55-61, Jan. 1992.

JESUS, E. G. T. de; HIRANO, T.; INUI, Y. Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 82, n. 3, p. 369-376, July 1991.

KARLOVICH, C. A. et al. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. **Gene**, Amsterdam, v. 217, n. 1/2, p. 117-125, Sept. 1998.

KHALIQ, T.; RAHMAN, Z.; JAVED, I. High dose of recombinant bovine somatotropin do alter serum biochemical and hormonal profiles of Nili Ravi Buffaloes. **Pakistan Veterinary Journal**, Lahone, v. 33, n. 4, p. 476-480, 2013.

KULCZYKOWSKA, E. et al. Role of melatonin in fish osmoregulation: towards a new action of the hormone. **Journal of Experimental Zoology Part A**, New York, v. 305, n. 2, p. 145, 2006.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). **Dose Response**, Amherst, v. 8, n. 4, p. 527-533, 2010.

LI, D. Y. et al. Melatonin receptor genes in vertebrates. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 6, p. 11208-11223, June 2013.

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução**

**Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 113-117, 2006.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; MADRID, J. A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). **Comparative Biochemistry and Physiology A**, Oxford, v. 144, n. 2, p. 180-187, 2006.

LÓPEZ-PATIÑO, C. S. M. et al. Melatonin partially minimizes the adverse stress effects in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 388/391, p. 165-172, 2013.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Changes in plasma melatonin levels and pineal organ melatonin synthesis following acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different water salinities. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 214, n. 6, p. 928-936, Mar. 2011.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 95, n. 1/2, p. 36-47, Sept. 2008.

MAITRA, S. K. et al. Melatonin: a potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 15, n. 181, p. 215-222, 2013.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo: EDUSP; Fiocruz, 2003. 435 p.

MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. **Neurobiology of Disease**, New York, v. 40, n. 1, p. 66-72, Oct. 2010.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 2-15, Jan. 2003.

MERIGHE, G. K. F. et al. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 4, p. 828-837, jul./ago. 2004.

MIYAI, C. A. **Efeito do odor do predador nas respostas de estresse na tilápia-do-nilo**. 2013. 33 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

MOREIRA, A. G. L. et al. Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Gilo anestesiados com óleo de cravo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 794-804, jul./set. 2011.

MORGAN, E. Ecological significance of biological clock. **Biological Rhythm Research**, Lisse, v. 35, n. 1/2, p. 3-12, 2004.

MURAKAMI, N. et al. Effect of melatonin on circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in the intact house sparrow, Japanese quail and owl. **Brain Research**, Amsterdam, v. 889, n. 1/2, p. 220-224, Jan. 2001.

MUSHTAQ, M. Y. et al. Effect of acute stresses on zebra fish (*Danio rerio*) metabolome measured by NMR-based metabolomics. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 80, n. 14, p. 1227-1233, Sept. 2014.

MUSTAFA, A.; DHAWALE, S.; DHAWALE, S. Development of a method for extracting macrophages from Zebrafish, *Danio rerio* and their use to assess stress. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, Szczecin, v. 38, n. 1, p. 73-77, 2008.

NAVARRO, F. K. S. P. **Efeito do fotoperíodo na atividade locomotora e parâmetros fisiológicos em fêmeas de Lambari (*Astyanax bimaculatus*)**. 2010. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para um manejo rentável. In: \_\_\_\_\_. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: EMBRAPA, 2009. p. 226-247.

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

OLIVEIRA, C. et al. Daily and circadian melatonin release in vitro by the pineal organ of two nocturnal teleost species: Senegal sole (*Solea senegalensis*) and tench (*Tinca tinca*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 153, n. 3, p. 297-302, 2009.

ØVERLI, Ø. et al. Evolutionary background for stress-coping styles: relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 396-412, 2007.

ØVERLI, Ø.; KOTZIAN, S.; WINBERG†, S. Effects of Cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. **Hormones and Behavior**, New York, v. 42, n. 1, p. 53-61, Aug. 2002.

PEIRSON, S. N.; HALFORD, S.; FOSTER, R. G. The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 364, n. 1531, p. 2849-2865, Oct. 2009.

PETERSON, R. T. et al. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. **NeuroToxicology**, Little Rock, v. 29, n. 3, p. 546-555, May 2008.

PIATO, A. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, New York, v. 35, n. 2, p. 561-567, Mar. 2011.

PICCINETTI, C. C. et al. Appetite regulation: the central role of melatonin in *Danio rerio*. **Hormones and Behavior**, New York, v. 58, n. 5, p. 780-785, Nov. 2010.

PITTMAN, J. T.; ICHIKAWA, K. M. iPhone® applications as versatile video tracking tools to analyze behavior in zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 106, p. 137-142, May 2013.

PLAUT, I.; GORDON, M. S. Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *brachydanio rerio*. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 194, p. 209-223, 1994.

POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. **Hormones and Behavior**, New York, v. 40, n. 3, p. 419-427, Nov. 2001.

POTTINGER, T. G.; CARRICK, T. R.; YEOMANS, W. E. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. **Journal of Fish Biology**, London, v. 61, n. 1, p. 207-229, July 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Version 3.1.0. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

RAMSAY, J. M. et al. Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, n. 1/4, p. 565-574, Aug. 2006.

RAMSAY, J. M. et al. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 297, n. 1/4, p. 157-162, 2009.

RAWASHDEH, O. et al. Melatonin suppresses nighttime memory formation in Zebrafish. **Science**, New York, v. 318, n. 5853, p. 1144-1146, Nov. 2007.

REITER, R. J. et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 175-200, July/Aug. 2009.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. et al. Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and Eugenol) in Zebrafish (*Danio Rerio*).

**Chronobiology International**, London, v. 28, n. 2, p. 109-117, 2011.

SANCHO, E. et al. Physiological effects of triclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 150, n. 1, p. 25-32, July 2009.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 165, n. 3, p. 549-556, Feb. 2010.

SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioral Brain Research**, New York, v. 214, n. 2, p. 417-422, 2010.

SERRA, M. **Elevação plasmática do cortisol aumenta a agressividade em juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicus***. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

SFAKIANAKIS, D. G.; LERIS, I.; KENTOURI, M. Exercise-related muscle lactate metabolism in zebrafish juveniles: the effect of early life temperature. **Italian Journal of Zoology**, London, v. 79, n. 4, p. 568-573, 2012.

SHI, Q. et al. Embryonic and post-embryonic expression of arylalkylamine N-acetyltransferase and melatonin receptor genes in the eye and brain of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 136, n. 3, p. 311-321, May 2004.

SILVEIRA, T. R. da; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SILVEIRA, U. S. da; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. da C. Fatores

estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, Belo Horizonte, v. 6, n. 4, p. 1001-1017, 2009.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. **Neurobiology of Learning and Memory**, New York, v. 96, n. 2, p. 230-237, 2011.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 83, n. 1, p. 13-34, Feb. 2008.

STEWART, A. Neurophenotyping of adult Zebrafish using the light/dark box paradigm. In: KALUEFF, A. V.; CACHAT, J. M. (Ed.). **Zebrafish neurobehavioral protocols**. New York: Humana, 2010. p. 157-197.

TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 92, n. 1, p. 328-43, 2009.

THOMAS, J. K. et al. Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 130/131, p. 112-122, Apr. 2013.

TONI, C. et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology Biochemistry**, Berlin, v. 40, n. 3, p. 701-14, June 2014.

TORRES-FARFAN, C. et al. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 554, n. 3, p. 841-856, Feb. 2004.

TORRES-FARFAN, C. et al. Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin stimulated cortisol production by melatonin.



**The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Stanford, v. 88, n. 1, p. 450-458, Jan. 2003.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y.; CRUZ-CASALLAS, P. Methodology for determination of plasma cortisol in fish using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). **Revista MVZ**, Córdoba, v. 12, n. 1, p. 869-877, ene./jun. 2007.

VERA, L. M. et al. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Chonobiology International**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 666-681, May 2009.

VERAS, G. C. et al. Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 62, p. 25-43, 2013.

WANG, J. et al. Circadian clock mediates light/dark preference in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, New Rochelle, v. 11, n. 2, p. 115-121, 2014.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 591-625, July 1997.

WHITMORE, D. et al. Zebrafish clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nature Neuroscience**, London, v. 1, p. 701-707, 1998.

WHITMORE, D.; FOULKES, N. S.; SASSONE-CORSI, P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, London, v. 404, n. 6773, p. 87-91, Mar. 2000.

YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, New York, v. 28, n. 2, p. 245-53, Sept. 2009.

YEH, C. M.; GLÖCK, M.; RYU, S. An optimized whole-body cortisol quantification method for assessing stress levels in larval Zebrafish. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-8, 2013.

ZENKI, K. C. et al. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: an in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters. **Toxicology In Vitro**, New York, v. 28, n. 5, p. 822-828, Aug. 2014.

ZHDANOVA, I. V. et al. Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 75, n. 2/4, p. 433-441, Mar. 2008.

ZHDANOVA, I. V. et al. Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 75, n. 4, p. 523-529, Apr. 2002.

ZHDANOVA, I. V. et al. Melatonin promotes sleep-like state behavior in zebrafish. **Brain Research**, Amsterdam, v. 903, n. 1/2, p. 263-268, June 2001.

ZHDANOVA, I. V.; REEBS, S. G. Circadian rhythms in fish. In: \_\_\_\_\_. **Behaviour and physiology of fish**. New York: Elsevier, 2006. p. 197-238.

ZUBERI, A.; BROWN, C.; ALI, S. Effect of confinement on water-borne and whole body cortisol in wild and captive-reared rainbowfish (*Melanoteania duboulayi*). **International Journal of Agriculture and Biology**, Beijing, v. 16, n. 1, p. 183-188, 2014.

## ANEXOS

## ANEXO A – TABELAS ESTATÍSTICAS

Tabela 1 Análise de variância para a glicose

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	1	5.44343	5.44343	0.00	0.9583
DOSE	3	10395.95085	3465.31695	1.75	0.1651
GRUPO*DOSE	3	14511.22241	4837.07414	2.45	0.0719
erro	63	124483.5604	1975.9295		
Total corrigido	70	147460.7887			

CV(%) = 30.20

Tabela 2 Análise de variância para o cortisol

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	1	16.591761	16.591761	0.106	0.7451
DOSE	3	2393.790393	797.930131	5.121	0.0029
GRUPO*DOSE	3	121.318237	40.439412	0.260	0.8545
erro	72	11218.193618	155.808245		
Total corrigido	79	13749.894010			

CV(%) = 47.71

Tabela 3 Análise de variância para o lactato

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DOSES	3	0.077700	0.025896	0.3589	0.7828
GRUPO	1	0.058953	0.058953	0.8171	0.3691
GRUPO*DOSES	3	0.143800	0.047944	0.6645	0.5766
erro	71	5.122800	0.072153		
Total corrigido	78				

CV(%) = 28.05

Tabela 4 Análise de variância para a atividade locomotora (contagem da mudança de quadrantes)

FV	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
BLK	9	7.355	0.81720	2.9760	0.002843 **
OBS	1	0.002	0.00172	0.0063	0.937024
GRUPO	1	0.816	1.81584	6.6127	0.011161 *
D	3	0.689	0.22976	0.8367	0.475864
GRUPO:D	3	3.187	1.06237	3.8688	0.010729 *
Residuals	141	8.9455	0.27460		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabela 5 Análise de variância para a ansiedade (tempo de permanência na profundidade)

FV	Df	Sum SQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
BLK	9	2.1451	0.23835	3.7569	0.0002911 ***
OBS	1	0.0011	0.00113	0.0178	0.8939609
GRUPO	1	0.5847	0.58469	9.2159	0.0028582 **
D	3	0.1755	0.05850	0.9221	0.4319505
GRUPO:D	3	0.8399	0.27997	4.4129	0.0053376 **
Residuals	141	8.9455	0.06344		

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1