

1ª edição

# Zebrafish

Manual de Criação em Biotério



Ana Paula Dammski,  
Bruno Roberto Müller,  
Carolina Gaya &  
Daiane Regonato



# Zebrafish

Manual de Criação em Biotério

Ana Paula Dammski,  
Bruno Roberto Müller,  
Carolina Gaya &  
Daiane Regonato



**Capa:**

Bruno Roberto Müller

**Foto da Capa:**

Bernardo Vaz

**Ilustrações:**

Aline Rosa Garbelotti

**Fotografias:**

Bruno Roberto Müller

Curitiba  
2011

# AUTORES

ANA PAULA DAMMSKI



BRUNO ROBERTO MÜLLER



CAROLINA GAYA



DAIANE REGONATO



Graduandos em Zootecnia pela Universidade Federal do Paraná.

# **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Deus por iluminar nosso caminho e dar forças para sempre seguirmos em frente.

Ao professor Manoel Luis Costa, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por nos receber no biotério da UFRJ e nos auxiliar com explicações e imagens fundamentais para a confecção desse manual.

Ao Professor Luis Fernando Marins, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), pelas informações, contatos e imagens.

Ao Pós Doutorando Bernardo dos Santos Vaz, da FURG, enriquecendo nosso trabalho com excelentes imagens e informações.

À Leila de Genova Gaya e Bruna Schwarzbald Feldens Müller, pelo apoio e auxílio durante o projeto.

À nossa colega Aline Rosa Garbellotti, acadêmica de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela amizade e talento, ilustrando parte do nosso manual.

Ao Professor Antônio Ostrensky da disciplina de Piscicultura, da UFPR, pelo apoio durante a realização deste desafio.

# SUMÁRIO

<b><u>PREFÁCIO .....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>O ZEBRAFISH .....</u></b>	<b><u>12</u></b>
INTRODUÇÃO .....	12
HISTÓRICO .....	14
COMPORTAMENTO .....	16
ANATOMIA E FISIOLOGIA .....	17
MORFOLOGIA EXTERNA .....	17
ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO .....	19
SISTEMA TEGUMENTAR .....	20
SISTEMA ESQUELÉTICO .....	20
SISTEMA GASTROINTESTINAL .....	21
SISTEMA RESPIRATÓRIO .....	22
SISTEMA UROGENITAL .....	24
BEXIGA NATATÓRIA .....	25
SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	26
SISTEMA NERVOSO E SENSORIAL .....	27
<b><u>FUNDAMENTOS DE MANEJO .....</u></b>	<b><u>29</u></b>
NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO .....	29
REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS .....	29
PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS .....	30
LIPÍDEOS .....	31
CARBOIDRATOS .....	32

VITAMINAS .....	33
MINERAIS.....	34
<b>TIPOS DE ALIMENTO .....</b>	<b>35</b>
ALIMENTOS VIVOS.....	35
ALIMENTOS PROCESSADOS.....	38
<b>A NUTRIÇÃO NOS ESTÁGIOS DE VIDA .....</b>	<b>40</b>
LARVAS.....	40
JUVENIS.....	45
ADULTOS.....	48
<b>REPRODUÇÃO .....</b>	<b>51</b>
CICLO REPRODUTIVO.....	52
FATORES DE CONTROLE.....	52
COMPORTAMENTO REPRODUTIVO .....	53
TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO E EQUIPAMENTOS .....	54
<b>LARVICULTURA.....</b>	<b>55</b>
MANIPULAÇÃO E CUIDADOS COM OS EMBRIÕES.....	56
BIOLOGIA DA LARVA .....	57
QUALIDADE DA ÁGUA.....	58
<b>DENSIDADE .....</b>	<b>59</b>
<b>TRANSPORTE .....</b>	<b>60</b>
<b>MANEJO DA QUALIDADE DA ÁGUA.....</b>	<b>62</b>
TEMPERATURA.....	62
PH .....	63
ALCALINIDADE.....	63
DUREZA.....	64
SALINIDADE .....	64
OXIGÊNIO DISSOLVIDO.....	64
COMPOSTOS NITROGENADOS .....	65
TESTES .....	65

MANEJO DE EFLUENTES.....	66
<b><u>EQUIPAMENTOS E INSTALAÇÕES.....</u></b>	<b>67</b>
<b>PROJETO DE INSTALAÇÕES .....</b>	<b>67</b>
RESISTÊNCIA À ÁGUA .....	67
INFRAESTRUTURA.....	68
ELETRICIDADE.....	69
CONTROLE AMBIENTAL.....	69
ACESSO .....	70
ÁREAS DE TRABALHO .....	70
CONFIGURAÇÃO DO BIOTÉRIO .....	71
QUARENTENA .....	72
AERAÇÃO .....	72
PIAS .....	72
LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO .....	73
SISTEMAS DE EMERGÊNCIA.....	73
<b>SISTEMAS DE ALOJAMENTO.....</b>	<b>74</b>
TANQUES.....	75
ESTANTES.....	78
SISTEMA DE TRATAMENTO DA ÁGUA.....	80
<b>FONTE DE ÁGUA.....</b>	<b>84</b>
TESTES E ANÁLISES.....	84
MÉTODOS DE TRATAMENTO.....	85
<b><u>CUIDADOS BÁSICOS .....</u></b>	<b>88</b>
<b>INDICADORES DE ESTRESSE PARA PEIXES .....</b>	<b>88</b>
MUDANÇAS NA COLORAÇÃO .....	88
FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA .....	89
TAXA DE CRESCIMENTO .....	89

CONDIÇÃO CORPORAL.....	89
ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS EXTERNAS.....	90
DESEMPENHO REPRODUTIVO.....	90
CONSUMO DE ALIMENTOS.....	90
<b>DOENÇAS COMUNS DO <i>ZEBRAFISH</i> EM BIOTÉRIO .....</b>	<b>91</b>
MICOBACTERIOSE .....	92
CAPILARÍASE .....	94
DOENÇA DO VELUDO (OODINIOSE).....	95
INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA .....	96
INTOXICAÇÃO POR NITRITO.....	98
INTOXICAÇÃO POR CLORO E CLORAMINA .....	99
DOENÇA DAS BOLHAS DE GÁS.....	99
<b>PROFILAXIA.....</b>	<b>100</b>
CUIDADOS COM A DIETA.....	101
ORIGEM DOS PEIXES .....	102
DESINFECÇÃO E LIMPEZA DOS EQUIPAMENTOS.....	102
<b><u>REFERÊNCIAS .....</u></b>	<b><u>105</u></b>

## PREFÁCIO

A utilização do *zebrafish* como modelo experimental cresceu consideravelmente em poucas décadas. Este peixe, que anteriormente era criado apenas como ornamental, tem sido utilizado em diversos estudos, desde células tronco até as bases das mudanças comportamentais induzidas por vício em drogas. Essa rápida mudança se tornou possível devido a avanços em tecnologia, conjuntamente com uma caracterização detalhada do animal em nível genético e molecular. Estes avanços permitiram o uso do *zebrafish* como um vantajoso modelo experimental, a fim de buscar soluções para questões em biologia, doenças e genética humana.

No Brasil, entretanto, o *zebrafish* ainda não atingiu seu potencial como modelo de pesquisa, havendo relativamente poucos biotérios que o conheçam ou utilizem. Essa situação pode ser explicada pela falta de informação adaptada à realidade brasileira. Grande parte da literatura existente, criada em outros países, sugere a utilização de materiais que nem sempre são compatíveis ou estão disponíveis no Brasil.

Existem, também, poucos padrões estabelecidos para a criação, manutenção e cuidados com este peixe em biotério. Há um grande número de referências que sugerem métodos variados, mas que se diferenciam no fundamento e não abrangem todas as áreas de conhecimento necessárias. Essa brecha de informação representa o maior desafio para o crescente número de pessoas encarregadas do cuidado, padronização e manejo sanitário do *zebrafish* em biotérios ao redor do mundo.

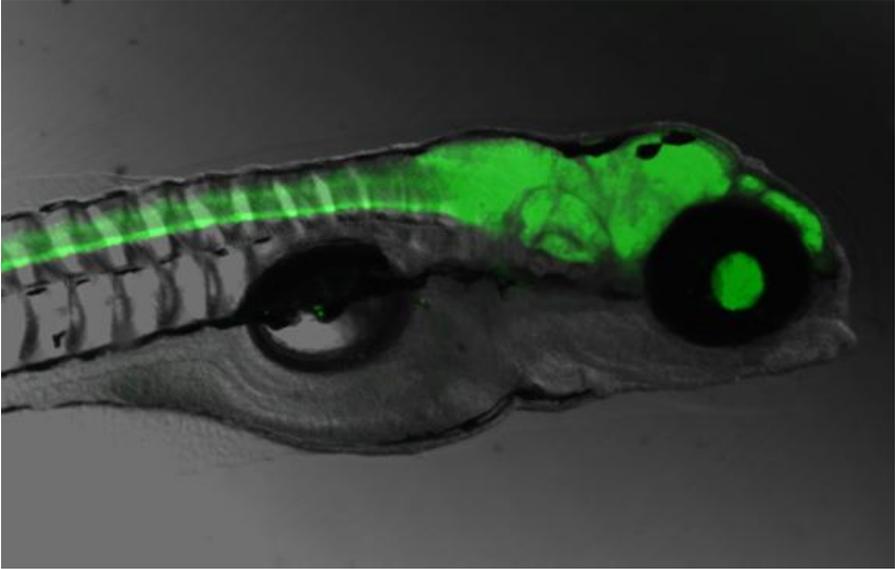
O objetivo deste manual é fornecer à comunidade científica e acadêmica brasileira o acesso, em português, a informações básicas e práticas sobre biologia, manejo e cuidados, que poderão servir como base para a produção e manutenção do *zebrafish* em biotério.

## O ZEBRAFISH

### INTRODUÇÃO

O *zebrafish*, *Danio rerio*, é um pequeno peixe tropical de água doce, que há muito tem sido utilizado como um peixe ornamental. Muitas das características que o tornaram popular na aquariofilia, incluindo sua tolerância a grandes variações ambientais e a facilidade com que pode ser reproduzido e mantido em cativeiro, também o tornaram atrativo para cientistas interessados em usá-lo para estudar vários aspectos da biologia.

A combinação entre excelente embriologia e os poderes da manipulação genética faz deste peixe um dos mais importantes modelos de organismos vertebrados para pesquisas biológicas. Os embriões são relativamente grandes e transparentes. O seu desenvolvimento pode ser observado facilmente através do córion durante as primeiras vinte e quatro horas pós fertilização. Em comparação com vertebrados superiores, os órgãos do *zebrafish* são como uma versão em miniatura, utilizando muito menos células para cumprir uma função equivalente no organismo. A segunda vantagem crucial do *zebrafish* é sua utilidade para identificação de genes através de mutações. A sua grande progênie facilita grandemente a análise genética, por exemplo, coletando indivíduos mutantes ou recombinantes para propósito de mapeamento.



**Figura 1** Larva de *Zebrafish* transgênico, usado para estudos em desenvolvimento do sistema nervoso. Foto: Dr. Jim Lauderdale.

O *zebrafish* vem sendo usado em biotério desde os anos 50. Nos anos 80, um grupo liderado pelo Dr. George Streisinger, da universidade do Oregon, realizou um estudo pioneiro e revolucionário que, em pouco tempo, permitiria aos cientistas empregar técnicas que anteriormente só eram possíveis em invertebrados, para estudar a genética do desenvolvimento em organismos superiores. Usando métodos desenvolvidos por Streisinger e seus colegas, grupos em Boston e na Alemanha realizaram dois experimentos genéticos de grande escala produzindo milhares de mutantes, que provaram ser ferramentas inestimáveis no entendimento da base molecular do desenvolvimento. Estes estudos, primeiramente publicados no início dos anos 90, alavancaram o *zebrafish* como um modelo experimental clássico para

estudos em desenvolvimento. Ao longo do tempo, o uso do peixe foi estendido a outros campos da ciência, incluindo a área de saúde humana, toxicologia, comportamento e evolução.

Hoje, menos de duas décadas depois daqueles primeiros trabalhos serem publicados, o *zebrafish* se tornou um proeminente animal de biotério, em igualdade com ratos em termos de valor para a ciência e prevalência em programas de pesquisa. Ainda neste capítulo do manual, serão descritas importantes características anatômicas e fisiológicas do *zebrafish*, revelando a enorme importância do seu uso como um modelo de pesquisa.

## HISTÓRICO

O *zebrafish*, nativo do sul da Ásia, é originário das partes baixas dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal. Esta região geográfica é caracterizada pelo clima de monções, com estações secas e chuvosas bem definidas. Tal sazonalidade chuvosa exerce grandes efeitos nas condições ambientais e no habitat do *zebrafish*, tanto em termos de qualidade física e química da água quanto na abundância de alimentos.

O *zebrafish* é uma espécie de regiões alagadiças, sendo comumente encontrado em águas rasas, paradas ou de baixa movimentação, com vegetação aquática submersa e lodo. A qualidade da água neste habitat pode sofrer grandes variações. Por exemplo, o pH e a temperatura registradas em várias regiões onde o *zebrafish* foi coletado na natureza variaram de 5.9-8.5 e 16-38°C, respectivamente. Estas

diferenças, que podem ser consequência tanto da sazonalidade quanto da geografia, sugerem que o *zebrafish* seja bem adaptado a tais flutuações. Isso explicaria sua tolerância a uma grande variação das condições quando mantido em cativeiro.



**Figura 2** Região do sul de Bangladesh, habitat natural do *Zebrafish*.  
Foto: *Center for Environmental & Geographical Information Services*.

Na natureza, o *zebrafish* se alimenta principalmente de uma ampla variedade de zooplâncton e insetos e, em menor proporção, de algas, detritos e outros materiais orgânicos. Como eles habitam toda a coluna d'água, alimentam-se principalmente nesta região, mas quando necessário também se alimentam na superfície e no fundo. Esta teoria é embasada por resultados de análises de conteúdo intestinal de amostras coletadas na natureza, assim como por observações feitas em peixes se alimentando em condições de biotério.

O *zebrafish* é uma espécie gregária, mais comumente encontrada em cardumes de 5-20 indivíduos, ainda que grupos muito maiores também tenham sido registrados. A reprodução acontece durante os meses chuvosos, um período de abundância em recursos alimentares. Os peixes acasalam em grupos durante o começo da manhã, normalmente em áreas rasas, de água parada e de vegetação densa. As fêmeas espalham seus ovos sobre o fundo, deixando-os sem cuidados. Os ovos, que são demersais e não adesivos, desenvolvem-se e eclodem em 48-72 horas a 28,5°C. Depois de eclodirem, as larvas aderem à superfície por meio de células especializadas na cabeça. Em 24-48 horas após a eclosão, elas inflam suas bexigas natatórias e começam a se alimentar ativamente de pequenos zooplânctons. As larvas permanecem nessas áreas rasas durante o seu desenvolvimento e migram para águas mais profundas e abertas ao longo da sua maturação, enquanto as áreas alagadas secam.

### COMPORTAMENTO

O *zebrafish* mostra uma tendência para formar cardumes de sexos misturados na natureza e em cativeiro. Este comportamento é inato e herdável. Os indivíduos escolhem cardumes com base tanto no visual quanto no olfato.

A despeito do fato de serem animais sociais, os *zebrafish* frequentemente exibem comportamento agonista, especialmente quando acasalando e durante o estabelecimento de hierarquias de dominância, que ocorrem dentre e entre os sexos. Essas interações podem ser realizadas diretamente através de agressão física, como mordeduras e

perseguições, ou indiretamente, através da liberação de hormônios repressivos na água pelo peixe dominante. Estes tipos de comportamento podem promover estresse nos animais do biotério e devem, assim, ser gerenciados com atenção.

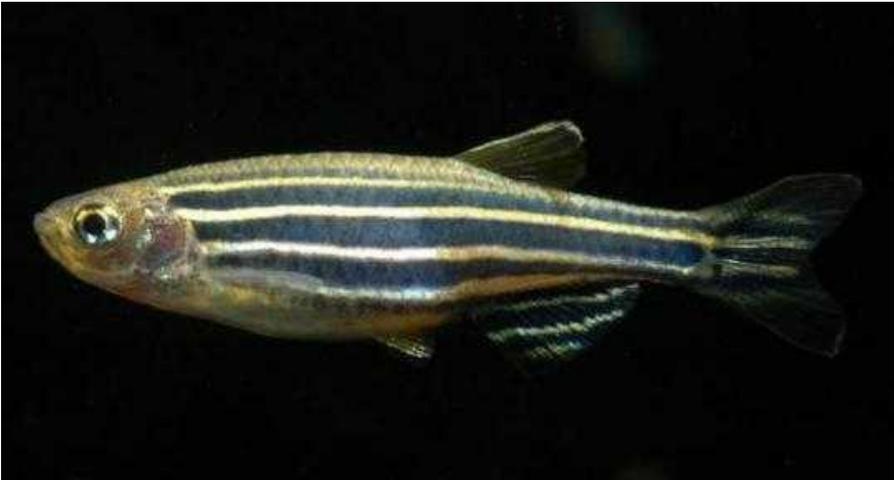
O *zebrafish* é tipicamente diurno, mostrando os maiores níveis de atividade ao longo do dia, particularmente durante as primeiras horas da manhã. Eles dormem, frequentemente, embora não exclusivamente, durante a noite. Este claro padrão circadiano de atividade governa muitos processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais no animal e é altamente dependente do estabelecimento de um fotoperíodo regular quando os peixes são mantidos em ambientes artificiais. Interrupções no ciclo de iluminação podem acarretar em sérios problemas para o *zebrafish* mantido em biotério, especialmente com respeito à manutenção do ciclo reprodutivo.

## ANATOMIA E FISIOLOGIA

### MORFOLOGIA EXTERNA

Como outros peixes, o *zebrafish* passa pelos estágios larval, juvenil e adulto. Em biotério, adultos (com mais de 90 dias) inicialmente tem um tamanho médio total de 2-3 cm quando criados em condições ideais, mas continuam a crescer ao longo da sua vida, de 2-3 anos, podendo alcançar tamanhos de até 4-5 cm. Seus corpos são esguios e alongados, com uma cabeça curta, narina protuberante e uma boca inclinada e voltada para cima. A mandíbula superior é protrusiva, aumentando a abertura da boca e ajudando na

sucção de alimentos. Dos dois lados da boca, encontram-se finas barbelas (de aproximadamente 1 mm de comprimento cada) que se projetam ventralmente. A única nadadeira dorsal e o par de nadadeiras pélvicas são inseridas posteriormente, conferindo rápida aceleração durante o nado. A nadadeira dorsal tem sua inserção no mesmo nível posterior-anterior da inserção da nadadeira anal. Machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas.



**Figura 3** *Zebrafish* adulto. Foto: "gomestic.com".

A característica mais marcante no *zebrafish* é o seu padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo e das nadadeiras anal e caudal. Adultos possuem cinco listras preto-azuladas alternadas com listras amarelo-prateadas. Machos em reprodução são escuros com uma matiz amarelo-escuro na porção ventral e nas nadadeiras. Do comprimento total do corpo, a cabeça corresponde a apenas 10-15%. O corpo tem,

normalmente, menos de 1cm de altura e apenas 2-3 mm de espessura.

### ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

O estágio larval do *zebrafish* inicia-se logo após a eclosão, mais precisamente cerca de 72 horas pós-fertilização, quando os peixes tem aproximadamente 3,5 mm de comprimento. Durante o período larval, definido aqui como os próximos 27 dias, o *zebrafish* criado em biotério e em condições ideais pode crescer ainda 7 mm, mas esse processo é muito dessincronizado em termos de idade do peixe. Assim, na tabela 1, os estágios de desenvolvimento são apresentados de acordo com o comprimento do corpo.

Estágio (dias)	Comprimento (mm)	Descrição
Larva jovem (3)	3,5	Nada livremente; posicionamento vertical.
Larva (14)	6	Bexiga natatória cheia; procura de alimento; crescimento.
Juvenil (30)	10	Nadadeiras e padrão de pigmentação dos adultos.
Adulto jovem (90)	20	Reprodução.
Adulto (1000)	40-50	Final da vida.

**Tabela 1** Estágios de vida do *zebrafish*. Adaptado de "*Zebrafish: A Practical Approach*".

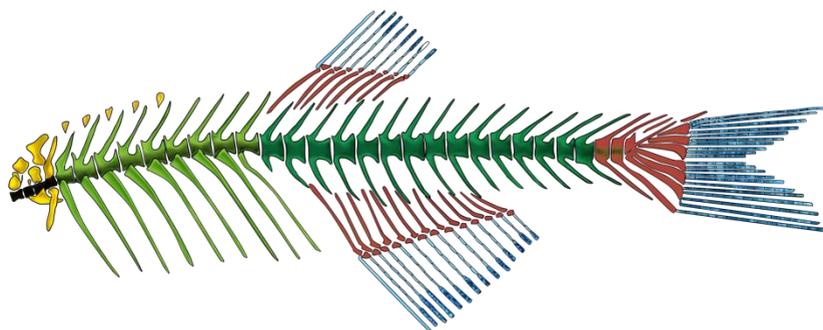
## SISTEMA TEGUMENTAR

Diferentemente de répteis e mamíferos, os peixes não tem uma camada de queratina sobre a epiderme. A pele do *zebrafish* é coberta por escamas ciclóides que conferem uma barreira de proteção física, importante tanto para a osmorregulação quanto para defesa contra patógenos. Nos estágios iniciais de desenvolvimento da larva de *zebrafish*, trocas cutâneas respondem a demandas respiratórias e ionorregulatórias. A pele do peixe pode ser danificada por manejo, lutas, trauma físico, predação e patógenos. Dessa forma, esses fatores devem ser controlados e minimizados, evitando que se abram portas de entrada para infecções microbianas oportunistas.

## SISTEMA ESQUELÉTICO

O *zebrafish* é classificado como um peixe ósseo. Seu esqueleto axial inclui a coluna vertebral e as nadadeiras ímpares. A coluna vertebral possui duas seções distintas: vértebras pré-caudais e caudais. Também possui três nadadeiras ímpares (caudal, anal e dorsal) e duas nadadeiras pares (pélvicas e peitorais).

O *zebrafish* possui aparelho Weberiano, um trato que compartilha com outros peixes ostariofisos. O aparelho Weberiano é composto por uma série de pequenos ossos localizados cranialmente às vértebras pré-caudais, que transmitem sons e vibrações da bexiga natatória para o ouvido interno, aumentando a sensibilidade auditiva dos peixes.



**Figura 4** Esquema do esqueleto axial do *zebrafish*.

#### SISTEMA GASTROINTESTINAL

O trato digestivo do *zebrafish* adulto inclui a boca, faringe, esôfago, intestinos e abertura anal, que algumas vezes é referida como poro urogenital ou proctoderme. Similarmente a outros peixes pertencentes à ordem Cypriniforme, o *zebrafish* possui um par de dentes ligados a um par de ossos faríngeos.

O *zebrafish* possui papilas gustativas, que são órgãos quimiosensoriais constituídos de células epiteliais modificadas e que auxiliam o peixe na decisão de quais substâncias serão ou não ingeridas. As papilas gustativas estão localizadas nos lábios, na boca, na cavidade orofaríngea, nas barbelas, na cabeça e, em alguns casos, na superfície corporal. Curiosamente, as papilas gustativas do *zebrafish* se desenvolvem nos lábios e arcos branquiais entre 4-5 dias pós-fertilização, coincidindo com o período em que os peixes começam a se alimentar.

O intestino preenche a cavidade abdominal e possui três divisões funcionais: anterior, média e posterior. A porção

anterior, também conhecida como bulbo intestinal, é maior e atua como principal local de digestão de proteínas e lipídeos. Acredita-se também que o intestino anterior desenvolva um importante papel na absorção de nutrientes, baseando-se na alta concentração de enzimas digestivas nesta região, assim como na altura das dobras epiteliais.

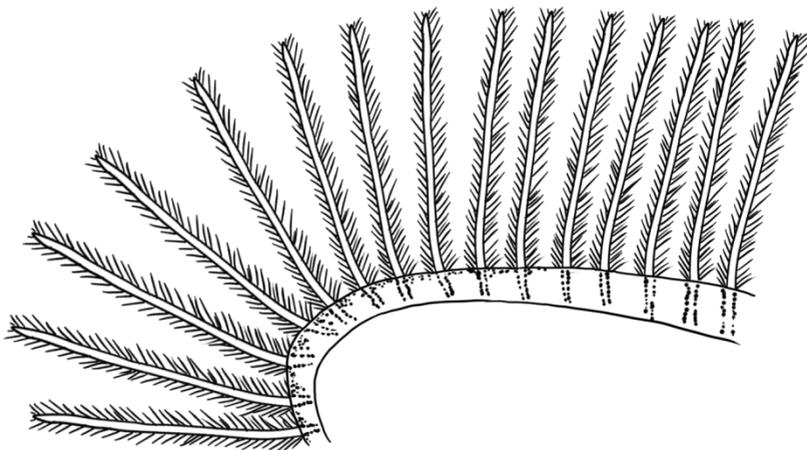
Existem muitas diferenças entre o trato gastrointestinal de mamíferos e do *zebrafish*. Este peixe não possui células de Paneth intestinais, criptas de Lieberkühn, estômago ou ceco. A ausência de estômago indica que a acidificação não seja necessária para a digestão no *zebrafish* e acredita-se que a funcionalidade do bulbo intestinal substitua esse órgão.

Nos peixes, o fígado desenvolve importante papel na reserva de energia e metabolismo. No *zebrafish*, é um órgão bilobado, dividido em lobos direito e esquerdo, posicionado cranioventralmente à bexiga natatória.

### SISTEMA RESPIRATÓRIO

As brânquias dos peixes teleósteos são formadas por quatro pares bilaterais de arcos branquiais.

No *zebrafish* adulto, as brânquias são responsáveis pelas trocas gasosas, balanço osmótico, excreção de compostos nitrogenados e manutenção do balanço ácido-básico. A lamela secundária é a estrutura de troca gasosa nos adultos. Os ionócitos, células ricas em mitocôndrias, são responsáveis pelas trocas de íons, balanço ácido-básico e excreção de amônia.



**Figura 5** Estrutura das lamelas primárias e secundárias das brânquias.

É importante perceber que, no *zebrafish*, as brânquias não são o principal local para trocas gasosas e iônicas até que o peixe tenha atingido o estágio juvenil. Nas larvas recém eclodidas, tanto gases como íons são trocados exclusivamente por difusão através da pele. Após alguns dias, durante a transformação para o estágio juvenil, as brânquias começam a assumir alguma, mas não toda função respiratória. Neste momento, a troca gasosa ocorre nos dois locais. Somente após toda a metamorfose ter se completado as brânquias tornam-se o principal local para a respiração e regulação iônica.

## SISTEMA UROGENITAL

Os rins do *zebrafish* se localizam no espaço retroperitoneal e são divididos em porções cranial e caudal, também conhecidas como cabeça e corpo do rim, respectivamente. Em peixes, a porção cranial contém tecidos hematopoiético, linfóide e endócrino, enquanto que a porção caudal contém néfrons, tecido hematopoiético e linfóide. Como os peixes não possuem medula óssea, a porção anterior do rim é o principal órgão responsável pela hematopoiese. A filtração sanguínea ocorre nas duas porções dos rins. A anatomia glomerular e a função dos rins do *zebrafish* são similares aos dos humanos. A ausência da bexiga urinária e da próstata é característica do sistema urogenital do *zebrafish*.

Similaridades entre a reprodução humana e a do *zebrafish* incluem a biologia molecular e embriológica das células germinativas. O *zebrafish* macho possui um par de testículos e a fêmea possui ovários contendo oócitos. Nestes peixes, a fertilização dos ovos é externa e os oócitos são envoltos por um córion, ao invés de uma zona pelúcida. O processo que controla a determinação do sexo e a diferenciação gonadal no *zebrafish* ainda não é bem compreendido. O peixe parece não possuir cromossomos sexuais ou um gene relacionado à determinação sexual que tenha sido identificado. Acredita-se que a determinação do sexo seja mediada por sinais de alguns genes autossômicos e que o processo de diferenciação gonadal possa ser influenciado por fatores ambientais. Já se demonstrou que a exposição a alguns desses fatores podem afetar a fecundidade, a diferenciação sexual, o desenvolvimento de gametas e a

função reprodutiva tanto de machos quanto de fêmeas de *zebrafish*. Além disso, acredita-se que fatores ambientais possam afetar a proporção entre sexos.



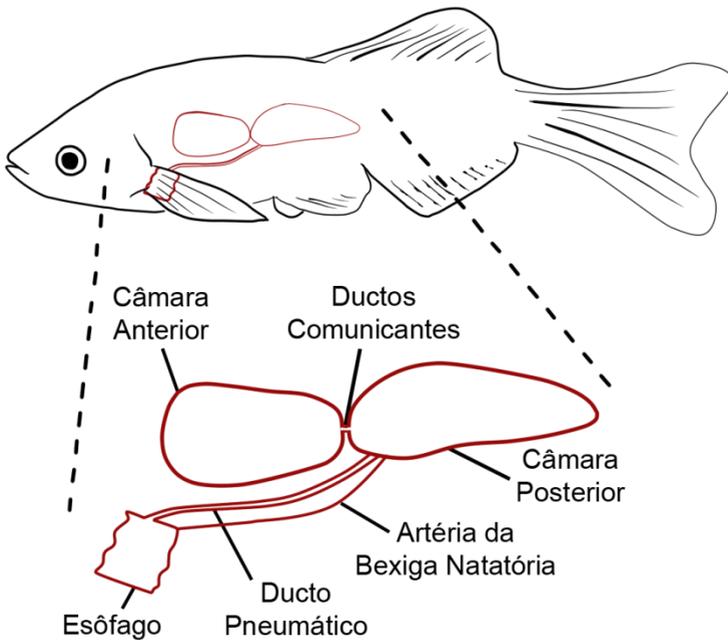
**Figura 6** Casal de *Zebrafish*, onde o macho (esquerda) é notavelmente mais esguio que a fêmea (direita). Foto: "scienceofsewing.blogspot.com".

### BEXIGA NATATÓRIA

O *zebrafish* possui bexiga natatória, um órgão preenchido por gases que acompanha a porção dorsal da cavidade abdominal, logo abaixo dos rins. Sua localização na cavidade abdominal é importante, pois influencia a estabilidade e flutuabilidade do peixe. A bexiga natatória é constituída pelas câmaras posterior e anterior, conectadas por ductos comunicantes. A câmara posterior é ligada ao esôfago através do ducto pneumático. Assim, o *zebrafish* pode regular o volume de gás que entra e sai da bexiga natatória. Acredita-

se que esta habilidade de regulação da flutuabilidade seja controlada pelo sistema nervoso autônomo.

No *zebrafish*, a câmara anterior funciona principalmente como detector de vibrações. A bexiga natatória é derivada da endoderme e, mesmo correspondendo embriologicamente ao pulmão dos mamíferos, sua funcionalidade não é correspondente.



**Figura 7** Posição anatômica da bexiga natatória na *zebrafish*.

### SISTEMA CARDIOVASCULAR

O coração do *zebrafish* possui duas câmaras, chamadas de átrio e ventrículo. A anatomia do coração também inclui o seio venoso e o bulbo arterial. No *zebrafish* e

em outros peixes teleósteos, o bulbo arterial é uma câmara de parede espessa que conecta o ventrículo à aorta ventral.

O retorno venoso alcança o seio venoso, que é drenado para o átrio circundando a porção dorsal do ventrículo. O sangue é, então, bombeado do ventrículo através do orifício bulboventricular e para o bulbo arterial, que está conectado à aorta ventral. O bulbo arterial confere um fluxo constante e contínuo de sangue aos arcos branquiais, que são os locais principais de oxigenação sanguínea nos adultos. A partir deste ponto, o sangue é distribuído, através da aorta dorsal, para o resto do corpo.

Várias pesquisas cardiovasculares são realizadas no embrião do *zebrafish*, já que o coração é o órgão predominante nesta fase de desenvolvimento, sendo facilmente visualizado 72 horas pós-fertilização. Além disso, o sistema vascular é completamente funcional neste período. Existem inúmeras similaridades entre as propriedades elétricas do coração humano e do *zebrafish*, tornando-o um modelo adequado para estudos de arritmias cardíacas.

## SISTEMA NERVOSO E SENSORIAL

Os olhos do *zebrafish* são muito similares aos dos mamíferos. A anatomia, histologia e bioquímica do olho são muito parecidas entre as diferentes classes de vertebrados. Entretanto, em contraste com os roedores, que são animais noturnos, o *zebrafish* é diurno e suas retinas tem um grande número de subtipos de cones e bastonetes.

O *zebrafish* possui ouvidos internos. Em vertebrados, o sistema auditivo baseia-se na captação de vibrações pelas

células ciliadas desse órgão, que são traduzidas em sinais neurais e então transmitidas ao cérebro.

A linha lateral nos peixes é um sistema sensorial que permite que o animal detecte e responda a variações de movimento na água. Ela consiste de células ciliadas sensoriais, conhecidas como neuromastos, que são embutidas na pele em linhas que percorrem o comprimento dos dois lados do corpo. A linha lateral é envolvida em uma variedade de comportamentos, incluindo fuga de predadores, formação de cardumes e reprodução.

## **FUNDAMENTOS DE MANEJO**

### **NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO**

Juntamente com a qualidade da água, a nutrição e a alimentação são as mais importantes determinantes de sucesso – ou falha – na criação do *zebrafish*. Portanto, para garantir a eficiência e o perfeito manejo destes peixes em biotério, é essencial que os gerenciadores e técnicos possuam um bom conhecimento sobre nutrição e tipos de alimentos disponíveis.

#### **REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS**

A habilidade de criar e manter peixes em cativeiro é absolutamente dependente de uma perfeita nutrição. Os requerimentos nutricionais das espécies sendo criadas devem ser estabelecidos e essa informação deve ser aplicada de maneira adequada para que se promova máximo crescimento, sobrevivência, reprodução e atividade imune.

Mesmo que os requerimentos nutricionais do *zebrafish* sejam desconhecidos, eles devem ser parecidos, de alguma forma, com os de espécies de ciprinídeos tropicais onívoros, como o kingio (*Carrasius auratus*) e a Carpa (*Cyprinus carpio*). Dados sobre essas espécies estão disponíveis e podem ser usados como padrão razoável quando falta informação específica sobre o *zebrafish*.



**Figura 8** Os requerimentos nutricionais da Carpa Comum (*Cyprinus carpio*) podem servir de base quando informações específicas sobre o *zebrafish* são desconhecidas. Foto: “fish.dnr.cornell.edu”.

### PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS

As proteínas são necessárias na dieta dos peixes para fornecer tanto aminoácidos essenciais quanto aminoácidos não essenciais. Os essenciais são aqueles que não podem ser produzidos de forma endógena e devem ser fornecidos na dieta.

Os aminoácidos são utilizados em um grande número de funções biológicas, incluindo crescimento, reprodução, manutenção geral e reparo dos tecidos. A demanda específica de proteínas na dieta varia consideravelmente e é baseada em hábitos alimentares naturais, nas condições ambientais e no estágio de desenvolvimento do animal. As necessidades protéicas na dieta geralmente diminuem com a maturidade.

A exigência de proteína total de uma espécie pode ser definida como a quantidade mínima necessária para satisfazer

as exigências de aminoácidos e promover o máximo crescimento e reprodução.

As necessidades mínimas de proteína de alguns ciprinídeos variam de 29% a 60% da fração total da dieta. Este intervalo também parece se aplicar adequadamente ao crescimento e reprodução do *zebrafish*. Em geral, os níveis de proteína bruta na dieta devem ser maiores para as larvas, devendo diminuir à medida que os peixes entram na idade adulta. Dietas com até 60% de inclusão de proteína são aceitáveis para o *zebrafish* adulto criado de forma intensiva.

## LIPÍDEOS

Os lipídeos são uma importante fonte de energia, assim como os ácidos graxos essenciais, necessários para o normal crescimento e desenvolvimento do *zebrafish*. Eles também auxiliam na absorção de vitaminas lipossolúveis. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) linolêico e linolênico são considerados essenciais porque não podem ser sintetizados pelo peixe e, portanto, devem ser fornecidos na dieta

As exigências de ácidos graxos essenciais variam amplamente, mas em geral, as espécies podem ser classificadas pela sua demanda relativa de ácidos graxos n-3 e n-6. Esta nomenclatura dos ácidos graxos refere-se à localização da primeira dupla ligação, que pode ocorrer no terceiro ou sexto átomo de carbono, a partir do carbono metílico terminal. Algumas espécies exigem uma maior proporção de n-3, alguns exigem quantidades iguais de ambos e outros exigem maiores proporções de n-6. O *zebrafish* foi inserido neste último grupo, pois o crescimento e a fertilidade

demonstram melhorar com a diminuição da relação n-3:n-6 da dieta.

Embora a exigência de lipídeos para o *zebrafish* não seja determinada, outros ciprinídeos, incluindo a carpa e os kinguios, tem um bom desempenho com níveis de lipídios de 10-15% da dieta total. Diante disso, as dietas para o *zebrafish* também devem estar dentro deste intervalo e, aliado a isso, deverão conter níveis adequados de AGPI n-3 e n-6, a fim de promover o máximo crescimento e produção de gametas de alta qualidade.

## CARBOIDRATOS

Nenhuma exigência de carboidratos tem sido demonstrada em peixes. No entanto, sua utilização pode reduzir o catabolismo de proteínas para síntese de glicose, melhorar a eficiência de retenção protéica e diminuir as perdas metabólicas de nitrogênio no ambiente. Por esse motivo, os carboidratos são comumente utilizados na formulação de rações para peixes.

Todos os peixes analisados até o momento, incluindo o *zebrafish*, possuem enzimas para a digestão de carboidratos simples e complexos. No entanto, a capacidade de digerir esses carboidratos varia muito entre as espécies. Em geral, isto depende do nível trófico. Peixes herbívoros normalmente são melhor adaptados para a digestão de carboidratos complexos quando comparados aos peixes carnívoros.

O *zebrafish*, como peixe tropical onívoro, que regularmente consome insetos terrestres e aquáticos, assim como fitoplâncton, é capaz de digerir e utilizar esses compostos

com alguma eficiência. De fato, tem sido demonstrado que o *zebrafish* apresenta taxas de crescimento, conversão alimentar e ganho de peso favoráveis quando alimentado com dietas contendo até 25% de carboidratos totais.



**Figura 9** Farinhas de grãos são comumente utilizadas como fonte de carboidratos em rações comerciais para o *zebrafish*. Foto: Diovani Sandin.

## VITAMINAS

Vitaminas são compostos orgânicos requeridos pelos peixes para um adequado funcionamento do seu metabolismo. Até o momento, quatro vitaminas lipossolúveis (A, D, E K) e 11 hidrossolúveis (C, B6, B12, Tiamina, Ácido Fólico, Biotina,

Niacina, Ácido Pantotênico, Riboflavina, Colina e Mio-inositol) se mostraram essenciais na dieta de peixes.

As vitaminas devem ser fornecidas na dieta, embora, em alguns casos, alguns destes compostos sejam produzidos pelo metabolismo da flora bacteriana intestinal. Deficiências vitamínicas são de difícil diagnóstico por apresentarem sintomas não específicos e se desenvolverem vagarosamente ao longo do tempo.

Os requerimentos precisos para o *zebrafish* são desconhecidos, embora algumas vitaminas, como ácido ascórbico e ácido retinóico, sejam reconhecidamente importantes na produção de gametas. A maioria dos alimentos vivos é rica em vitaminas e rações bem formuladas deveriam, também, conter níveis adequados e estabilizados destes compostos.

## MINERAIS

Minerais são elementos inorgânicos, requeridos pelo peixe em quantidades traço para um grande número de processos biológicos, incluindo ossificação, osmorregulação e funções do sistema nervoso. Podem ser obtidos via dieta ou através do próprio ambiente aquático. Cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro, zinco, cobre e selênio são todos naturalmente absorvidos da água circulante através das brânquias.

O *zebrafish* é uma espécie classificada como de "água dura", embora a literatura sobre tal assunto seja escassa. De qualquer forma, seu desempenho é reduzido em ambientes com baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo um elevado

custo metabólico em condições de “água mole”. Os requerimentos dietéticos minerais para o *zebrafish* não foram determinados. Mesmo assim, dietas contendo alimentos vivos ou rações adequadamente formuladas provavelmente fornecerão os níveis de minerais necessários para as funções biológicas e de manutenção.

## TIPOS DE ALIMENTO

Existem duas classes de alimentos para peixes: vivos e processados. Dietas com alimentos vivos incluem várias espécies de zooplâncton, como *Artêmias*, rotíferos e *Paramecium* spp.. Todas elas compartilham características favoráveis, como facilidade de cultivo, perfil nutricional balanceado, alta digestibilidade, atratividade e aceitabilidade. Dietas com alimentos processados são projetadas para substituir as dietas com alimentos vivos, sendo que a utilização de rações formuladas normalmente representa diminuição de custos com alimentação em relação a alimentos vivos, permite um maior controle sobre o estado nutricional dos animais e reduz o risco de introdução de patógenos ou toxinas via dieta.

### ALIMENTOS VIVOS

Os náuplios de *Artêmia* são o principal alimento vivo utilizado em dietas de *zebrafish*. Os cistos deste pequeno crustáceo vem sendo utilizados há tempos na aquariofilia. Por serem metabolicamente inativos, quando empacotados a vácuo e mantidos em ambientes secos e frios, podem ser estocados por anos até serem utilizados. Quando reidratados

em água salgada, por 18-24 horas, os náuplios eclodem dos cistos e podem ser oferecidos como alimento ao *zebrafish* em qualquer estágio de vida.



**Figura 10** Náuplio de *Artêmia*. Foto: "artemia-gallery-new.php".

Como os náuplios não se alimentam, dependendo completamente das suas reservas, devem ser oferecidos aos peixes logo após a eclosão, já que a quantidade de energia transferida do náuplio para o peixe diminui com a idade do

crustáceo. Além disso, este estágio de vida é o mais apropriado para o *zebrafish* em termos de tamanho, visibilidade e digestibilidade.

Os metanúplios, a segunda fase de desenvolvimento das *Artêmias*, são filtradores não seletivos e podem ser “enriquecidos” com emulsificações de ácidos graxos ou microalgas, sendo bastante apropriados para os *zebrafish* juvenis e adultos.

Os dois outros alimentos vivos comumente utilizados na alimentação do *zebrafish* são zooplânctons que podem ser oferecidos durante os primeiros dias de vida do peixe. Um deles são os *Paramecium* spp., que são pequenos ciliados de água doce (150-250  $\mu\text{m}$ ) comumente usados como primeira fonte de alimento para as larvas que estão iniciando a alimentação exógena. Esses animais são simples de serem cultivados, fáceis de serem capturados e continuam a se desenvolver e reproduzir nos tanques. Seu valor nutricional é limitado, portanto não são adequados para o *zebrafish* após o estágio larval. O seu perfil nutricional pode ser melhorado através do enriquecimento com microalgas ou spirulina (bactéria rica em proteínas e vitaminas) antes de serem ofertados às larvas. Sua importância como alimento é válida para garantir o crescimento das larvas até que elas tenham desenvolvido habilidades de nado e abertura de boca suficiente para se alimentar de forma eficiente de presas mais completas nutricionalmente, como a *Artêmia*.

Os outros zooplânctons comumente utilizados na alimentação de larvas de *zebrafish* são os rotíferos *Brachionus* spp. Os rotíferos são, provavelmente, o zooplâncton mais

utilizado na dieta de larvas de peixes. Eles são pequenos ( $\sim 100\text{-}250\ \mu\text{m}$ ), nadam vagarosamente e ingerem rapidamente microalgas, bactérias, spirulina e emulsificações de ácidos graxos que podem, então, ser disponibilizados aos peixes que os predam. Os rotíferos de água salgada, *Brachionus plicatilis*, são bastante tolerantes a variações de salinidade e podem permanecer vivos e se reproduzir no ambiente onde as larvas de *zebrafish* são cultivadas.



(Foto: J.B.Leonardsen)

Figura 11 Rotífero *Brachionus plicatilis*.

### ALIMENTOS PROCESSADOS

As larvas de *zebrafish* podem ser tratadas exclusivamente com dietas processadas, mas o desempenho é menor quando comparado às larvas tratadas com dietas vivas.

As principais razões para isso podem estar ligadas ao fato de que alimentos vivos sejam mais balanceados nutricionalmente, mais atrativos química e visualmente e mais digestíveis. Se a escolha for pela alimentação processada, deve haver muito cuidado com relação à quantidade ofertada e à taxa de renovação da água, já que este tipo de alimento tende a sujar o ambiente.



**Figura 12** Diferentes tipos e tamanhos de alimento processado.

O alimento processado pode ser usado como fonte exclusiva após a fase larval, se for nutricionalmente balanceado, palatável, estável e de boa digestibilidade. É essencial que dietas processadas sejam estocadas e administradas corretamente. A vida útil de um alimento processado não passa de três meses, quando mantido em local seco e ventilado. A oxidação de componentes do alimento, especialmente ácidos graxos, aumenta com a temperatura. Por isso, alimentos processados devem ser

mantidos em compartimentos fechados, refrigerados e descartados depois de três meses.

Alimentos processados devem ser ofertados secos e não hidratados previamente. Ao contato com a água, os nutrientes hidrossolúveis serão diluídos no ambiente dentro de minutos, resultando em oferta de alimento nutricionalmente vazio, em crescimento aumentado de algas, além de outros problemas.

A correta administração de alimento é um desafio operacional na manutenção do *zebrafish*, requerendo um grande investimento de tempo e serviço, mesmo em pequenas instalações. Alguns problemas com qualidade e frequência de alimentação geralmente surgem como resultado da necessidade de alimentar centenas, se não milhares de tanques manualmente, várias vezes ao dia. A maneira mais simples e mais empregada para resolver esse problema é a criação de um procedimento padrão de alimentação que deve ser seguido por todo o pessoal responsável.

## A NUTRIÇÃO NOS ESTÁGIOS DE VIDA

Durante o desenvolvimento de vida do *zebrafish*, seus requerimentos nutricionais mudam em termos de qualidade e quantidade. O entendimento destas mudanças é importante para que os protocolos de alimentação sejam criados de acordo com o estágio de vida dos peixes.

### LARVAS

Em condições típicas de manutenção do *zebrafish* em cativeiro, as larvas iniciam a alimentação exógena em

aproximadamente cinco dias após a fertilização. Este período coincide com marcos de desenvolvimento, como a finalização do sistema digestivo rudimentar e abertura da boca, enchimento da bexiga natatória e depleção das reservas do saco vitelínico. Ao longo das próximas semanas de vida, até alcançarem a metamorfose (transição para o estágio juvenil), as larvas devem se alimentar constantemente para garantir crescimento e atender às demandas energéticas que são mais altas neste estágio do que em qualquer outro ponto do seu desenvolvimento.

Assim, existem vários fatores que devem ser levados em conta ao desenvolver protocolos de alimentação para larvas do *zebrafish*. Isso inclui características do alimento como tamanho, perfil de nutrientes, suspensão e estabilidade na água, digestibilidade, aceitabilidade, quantidade e frequência de oferta.

Perfil nutricional: larvas de *zebrafish* requerem dietas ricas em proteínas para atender às demandas de crescimento e energia. As dietas também devem conter adequadas proporções de lipídeos, em parte para “economizar” proteínas para o crescimento. Carboidratos não são necessários e devem estar em quantidades mínimas para garantir uma digestão com máxima eficiência. Vitaminas devem ser ofertadas em quantidades traço, assim como os minerais. Alimentos vivos são uma excelente fonte para larvas de *zebrafish*, pois geralmente possuem perfil nutricional adequado e grandes quantidades de aminoácidos livres.

Em geral, as larvas de *zebrafish* se desempenham bem com dietas contendo 45-60% de proteína bruta, 6-10% de

lipídeos e menos de 5% de carboidratos. Quantidades traço de vitaminas e minerais essenciais também devem ser inclusos.



**Figura 13** Larva de *zebrafish* ainda com reservas no saco vitelínico. Foto de Bernardo Vaz – FURG.

Estabilidade na água: o alimento deve manter sua estabilidade, no sentido de não causar problemas relativos à qualidade da água e de não perder seu valor nutritivo antes da ingestão pelos peixes. Dietas vivas são estáveis e, enquanto se mantiverem vivas nos tanques de cultura, mantêm seu valor nutritivo. Para alimentos processados, no entanto, a estabilidade é um problema que deve ser sanado na hora da formulação. A retenção de nutrientes hidrossolúveis é maximizada quando essas partículas estão ligadas a uma matriz hidrostática da dieta ou quando é feito o encapsulamento por agentes protetores. Quando da utilização de tais dietas para larvas de *zebrafish*, deve-se buscar produtos

que ofereçam estabilidade na água, mas que ao mesmo tempo mantenham sua digestibilidade.

**Suspensão:** as larvas de *zebrafish* se alimentam principalmente na coluna d'água e não possuem habilidade de se alimentar na superfície ou no fundo de forma eficiente. Sendo assim, o alimento deve estar em suspensão, a fim de aumentar a sua disponibilidade ao peixe. Dietas vivas, como *Paramecium* spp., rotíferos e *Artêmias* nadam ativamente na coluna d'água e são, portanto, adequados para alimentação de larvas de *zebrafish*. Entretanto, as *Artêmias* normalmente morrem quando imersas por muitas horas em água doce e, assim, não estarão disponíveis por períodos prolongados. Dietas processadas devem conter uma densidade adequada para garantir que continuem na coluna d'água por um período adequado. Dietas que rapidamente afundam não são interessantes e podem causar problemas associados ao apodrecimento da água em tanques de cultura.

**Tamanho:** o tamanho do alimento também é crucial. As larvas tem o tamanho da boca limitado e, normalmente, ingerem sua presa inteira. Conseqüentemente, o alimento deve ter o tamanho apropriado para este estágio de vida, sendo de, no máximo, 150-200  $\mu\text{m}$ . *Paramecium* spp., rotíferos e uma variedade de dietas processadas são apropriadas neste quesito. Alimentos processados são disponibilizados em uma grande variedade de diferentes tamanhos de partículas e devem ser selecionados apropriadamente.

**Digestibilidade:** devido ao seu sistema digestivo rudimentar, as larvas de *zebrafish* possuem capacidade de absorção de nutrientes limitada. Conseqüentemente, os

alimentos devem ser de alta digestibilidade para que a larva possa absorver os nutrientes rapidamente e utilizá-los para crescimento e metabolismo. Alimentos vivos são altamente digestíveis, em parte por conterem enzimas proteolíticas, que podem ser utilizadas pelo peixe para auxiliar na digestão. Alimentos processados variam grandemente em termos de digestibilidade, devendo ser testados por tentativa e erro em uma pequena amostra de peixes, antes de serem ofertados a todos os animais.

**Aceitabilidade:** larvas usam estímulos visuais e químicos para auxiliar na localização de alimento. Dietas vivas são mais atrativas às larvas do *zebrafish* devido ao seu comportamento de nado constante e vagaroso, o que facilita a detecção pelas larvas e também ativa o comportamento de caça necessário para a sua alimentação. Este tipo de dieta também contém aminoácidos livres que servem como atrativo olfatório. Alimentos processados são considerados inferiores, pois além de não se movimentarem, nem sempre apresentam os aminoácidos livres necessários para desencadear respostas olfatórias nos peixes.

**Quantidade e frequência de oferta:** devido à pequena habilidade de nado e tamanho das larvas, é de essencial importância garantir que a taxa de encontro destas com o alimento seja a mais alta possível. Larvas de peixes podem consumir de 50-300% do seu peso corporal diariamente. Isso significa que o alimento deve ser ofertado em grandes quantidades sem, no entanto, prejudicar a qualidade da água. Alimentos vivos, como o *Paramecium* spp. e os rotíferos, são excelentes nesta questão, pois podem ser ofertados

abundantemente às culturas sem causar tais efeitos indesejáveis. Eles sobrevivem e, em alguns casos, chegam até a se reproduzir nos tanques, servindo como uma constante fonte de alimento para as larvas em desenvolvimento.

Os alimentos processados também podem ser utilizados em grandes quantidades, porém ofertados frequentemente e em pequenas doses para evitar que prejudiquem a qualidade da água. Além disso, a estabilidade de tal alimento na água é importantíssima. Deve-se, então, dar preferência aos alimentos encapsulados, que retém os nutrientes hidrossolúveis por maior tempo e tendem a prejudicar a qualidade da água de forma mais amena.

## JUVENIS

Assim que as larvas terminarem a metamorfose para juvenis (21-28 dias após a fertilização, dependendo das condições), os tecidos, órgãos e estruturas serão substituídos por versões rudimentares dos mesmos encontrados nos peixes adultos. Essa fase de maturação no desenvolvimento do *zebrafish* é caracterizada ainda por um rápido crescimento e a dieta ofertada a esses animais deve atender a esta demanda.

Perfil Nutricional: como no estágio larval, o requerimento de proteínas ainda é bastante alto devido à sua rápida taxa de crescimento. Lipídeos também são muito importantes nesta fase devido ao seu efeito na economia de proteínas como fonte de energia e na maturação sexual. Os carboidratos também podem servir de poupadores de proteínas no processo de crescimento, embora não haja requerimento deste tipo de nutriente. Minerais e vitaminas

também tem a mesma importância que tinham no estágio larval, dando suporte ao crescimento e metabolismo durante esta fase.

Em geral, dietas usadas para juvenis devem ter perfis nutricionais similares às de larvas, com 45-60% de proteína bruta, 6-15% de lipídeos, menos de 5% de carboidratos e quantidades traço de minerais e vitaminas essenciais.

**Estabilidade:** ainda é muito importante que o alimento mantenha sua estabilidade na água durante o estágio juvenil. A grande diferença durante esta fase é a mudança para alimentos peletizados, que normalmente são muito mais instáveis que os alimentos microparticulados e encapsulados fornecidos às larvas. A devida atenção deve ser dada para garantir que esse alimento seja fornecido adequadamente e sem excesso. Isso é particularmente importante, pois os peixes levarão certo tempo até se acostumarem com a nova dieta.

**Suspensão:** os juvenis são mais livres na coluna d'água em termos de alimentação, devido às maiores habilidades de nado e caça. Eles rapidamente aprenderão, ao longo de poucos dias, a se alimentarem na superfície e no fundo. Ainda assim, alimentos que permaneçam em suspensão por longos períodos são desejáveis, pois a eficiência de alimentação é maior nesta área e alimentos que afundam são filtrados antes que os peixes possam ingeri-los.

**Tamanho:** o tamanho da boca dos juvenis é maior e, mesmo ainda consumindo pedaços inteiros, tendem a rasgar e quebrar o alimento quando necessário. Desta forma, o tamanho das partículas pode ser aumentado para 400-600  $\mu\text{m}$ .

**Digestibilidade:** embora os juvenis possuam um sistema digestivo mais desenvolvido e completo do que o das larvas, os alimentos fornecidos ainda devem ser de alta digestibilidade para auxiliar na minimização de perdas energéticas. A energia, desta forma, pode então ser utilizada para crescimento e desenvolvimento ao invés de ser utilizada na quebra de moléculas complexas.

**Aceitabilidade:** os mesmos princípios de aceitabilidade e palatabilidade que se aplicam para as larvas devem também ser considerados para juvenis.

**Quantidade e frequência de oferta:** como os juvenis ainda apresentam rápido crescimento, eles ainda devem ser alimentados com grandes quantidades (25-50% do peso corporal diariamente). A manutenção de alimento vivo dentro dos tanques como fonte de alimentação para os peixes já não é tão fácil de ser obtida. Os *Paramecium* spp. não são mais nutritivos e grandes o bastante para servirem como base da dieta e as *Artêmias* não sobrevivem nos tanques por mais de poucas horas. Além disso, os juvenis se alimentam de forma muito mais eficiente e consomem quantidades maiores de alimento. Assim, ao se utilizar dietas vivas, principalmente *Artêmias*, é necessário mudar o manejo alimentar para uma administração menor e mais frequente. Este manejo também pode ser aplicado ao se utilizar alimentos processados e, devido ao aumento da taxa de renovação de água dos tanques nesta fase, a degradação do alimento não é tão prejudicial como seria nas condições em que as larvas são mantidas. Mesmo assim, a alimentação em excesso deve ser evitada. Uma maior frequência de oferta de alimento em menores

quantidades resulta em pouco ou nenhum resíduo e facilita este processo.

## ADULTOS

O *zebrafish* é criado principalmente para produção de embriões. Ao atingirem a maturidade sexual, os peixes devem estar prontos para gerarem o maior número possível de embriões, de forma consistente e contínua. A dieta oferecida a esses animais deve, então, auxiliar neste objetivo.

Perfil Nutricional: embora o *zebrafish* continue a crescer por todo o seu período de vida, esta fase já não é caracterizada por um crescimento rápido. Assim, a prioridade na escolha de nutrientes deve levar em conta não mais o crescimento, mas sim a reprodução. Os níveis de proteína ainda devem representar a maior porção da dieta, mas devem ser menores quando comparados com os das dietas oferecidas a larvas e juvenis. Lipídeos se tornam mais importantes, pois certos ácidos graxos são importantes para as funções reprodutivas, particularmente na produção de ovos e na fertilidade. Carboidratos não são necessários e devem permanecer em níveis baixos para evitar gastos desnecessários de energia. Os requerimentos nutricionais de vitaminas e minerais ainda são pequenos em relação à dieta total, embora a proporção de certas vitaminas deva ser levemente aumentada.

Em geral, dietas usadas para adultos devem apresentar um perfil nutricional com 45-55% de proteína bruta, 10-15% de lipídeos, menos de 5% de carboidratos e quantidades traço de vitaminas e minerais essenciais. Alimentos que contenham

níveis adequados de ácido ascórbico (vitamina C) e ácido retinóico (vitamina A), podem ajudar na manutenção da função reprodutiva dos animais.

**Estabilidade:** os alimentos devem demonstrar boa estabilidade. Isto é importante para garantir que os nutrientes cheguem aos peixes sem serem perdidos na água. Essa questão se torna ainda mais importante na oferta de vitaminas e ácidos graxos. São exatamente estes nutrientes que se solubilizam mais rapidamente e, por isso, deve-se dar especial atenção à forma de distribuição do alimento.

**Suspensão:** o *zebrafish* se alimenta igualmente bem tanto no fundo, quanto na superfície e na coluna d'água. Entretanto, alimentos que permaneçam maior tempo em suspensão são preferíveis por maximizar o aproveitamento do alimento ofertado.

**Tamanho:** embora o *zebrafish* seja capaz de ingerir alimentos maiores que  $600\ \mu\text{m}$ , é ideal manter as dietas entre  $400\text{-}600\ \mu\text{m}$  para facilitar a digestão. Alimentos processados maiores devem ser moídos em pedaços menores antes de serem ofertados. Grande parte dos alimentos peletizados está disponível em diversos tamanhos e devem ser escolhidos de acordo.

**Digestibilidade:** o alimento deve apresentar alta digestibilidade para minimizar perdas de energia. A energia economizada desta forma pode ser então, utilizada para os processos reprodutivos.

**Aceitabilidade:** os mesmos padrões de aceitabilidade que se aplicam às larvas e juvenis também devem ser

considerados para os adultos, ainda que estes últimos sejam relativamente menos seletivos.

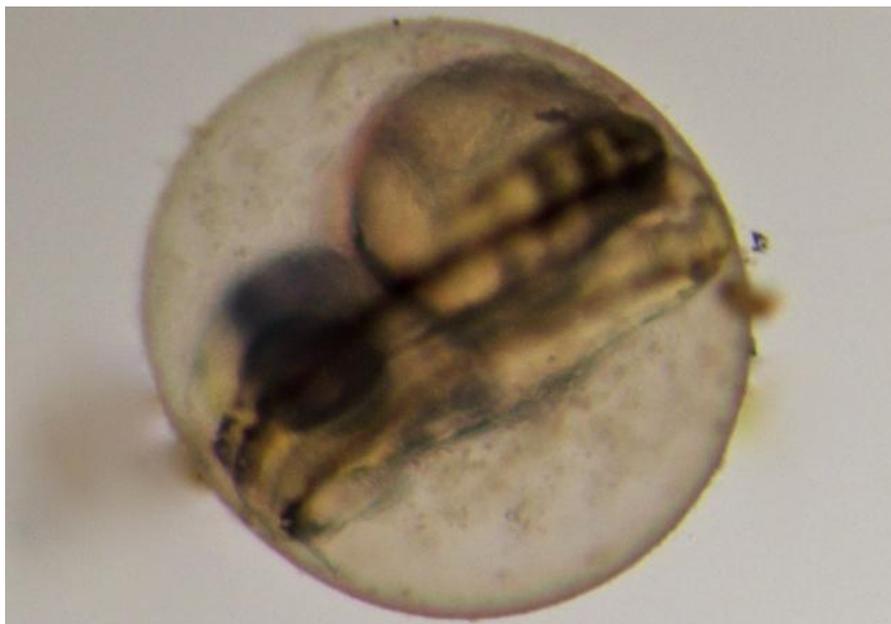
Quantidade e frequência de oferta: a forma mais apropriada de se criar protocolos de alimentação do *zebrafish* adulto é levar em conta as regras usadas para a maioria das espécies cultivadas em aquicultura, que é oferecer entre 1-5% do peso vivo diariamente. Essa quantidade pode ser maior, até 10% do peso vivo, dependendo da intensidade de utilização na reprodução, pois diferentemente de outras espécies cultivadas, o *zebrafish* é criado para produção de embriões e não de carne. A reprodução, especialmente de forma constante, consome muita energia e é estressante. Assim, o peixe precisa recompor a energia e nutrientes gastos através da dieta. O cuidado com a alimentação em excesso deve ser sempre redobrado, pois problemas na qualidade da água podem afetar negativamente a reprodução.

Assim como para os juvenis, é ideal oferecer alimentos frequentemente e em pequenas quantidades aos adultos. Isso devido à alta demanda de energia e nutrientes causada pelos processos reprodutivos. Os períodos de alimentação devem ser distribuídos durante as horas de luz, entre três e cinco vezes ao dia.

Vale lembrar que os peixes que não estão sendo utilizados na produção de embriões possuem uma demanda nutricional reduzida e podem ser alimentados em quantidade e frequência muito menores.

## REPRODUÇÃO

Uma das características mais importantes do *zebrafish*, como modelo animal, é sua grande fertilidade. O seu amadurecimento sexual ocorre rapidamente e a reprodução acontece em uma ampla gama de condições, garantindo a produção de milhares de larvas durante o seu curto período de vida.



**Figura 14** Ovo de *zebrafish* com embrião em desenvolvimento. Foto de Bernardo Vaz – FURG.

Esse potencial o torna ideal para o uso em um amplo espectro de pesquisas na área da biologia.

## CICLO REPRODUTIVO

O *zebrafish*, em condições de biotério, comumente atinge a maturidade sexual entre 3-6 meses pós-fertilização. Como isso varia consideravelmente com as condições ambientais, incluindo densidade populacional, temperatura e disponibilidade de alimento, é mais apropriado relacionar a maturidade reprodutiva ao tamanho do que à idade. Um tamanho padrão, de aproximadamente 23 mm, corresponde à maturidade reprodutiva nessa espécie.

Em condições favoráveis, o *zebrafish* se reproduz continuamente durante a maturidade sexual. As fêmeas são capazes de desovar diariamente, embora o intervalo entre posturas dependa da nutrição, qualidade da água e intensidade de produção. Um intervalo de descanso de uma semana entre posturas é geralmente recomendado para uma melhor produção de ovos viáveis.

## FATORES DE CONTROLE

O olfato pode representar um papel importante na reprodução do *zebrafish*. A liberação de feromônios na água pelos machos induz a ovulação nas fêmeas, que mostram um aumento significativo nas frequências de desova, no número e na viabilidade dos ovos, quando comparadas com fêmeas mantidas isoladamente. As fêmeas, por sua vez, liberam feromônios durante a ovulação, induzindo o comportamento de acasalamento nos machos. Pelo impacto positivo dessas interações na criação, é importante manter machos e fêmeas compartilhando a mesma água, por pelo menos 12 horas, antes de colocá-los juntos para o acasalamento.

A liberação de feromônios por fêmeas dominantes pode inibir a desova de fêmeas subordinadas. Portanto, é aconselhável evitar manter os mesmos grupos de fêmeas juntas no mesmo tanque por extensos períodos de tempo, prevenindo o estabelecimento de tal hierarquia.

A reprodução do *zebrafish* também é fortemente influenciada pelo fotoperíodo. A ovulação ocorre normalmente um pouco antes do amanhecer e a desova começa nas primeiras horas de luz do dia.

No entanto, a reprodução não se limita a este horário. O *zebrafish* pode acasalar em qualquer período do dia, inclusive durante a noite, embora a produção de ovos seja mais intensa no início da manhã.

### COMPORTAMENTO REPRODUTIVO

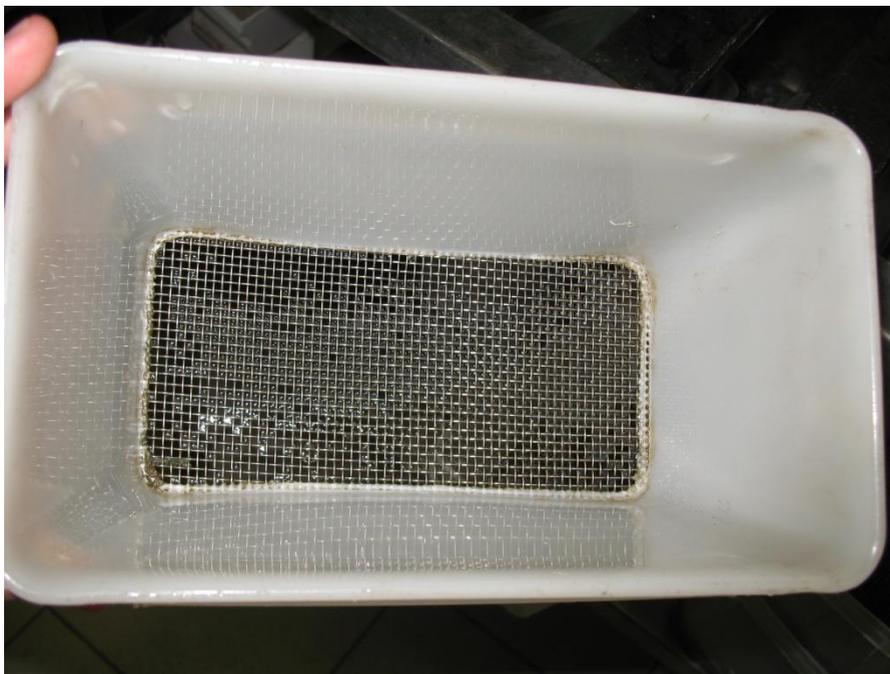
O *zebrafish* exibe rituais de acasalamento antes e durante a desova. Durante a corte, os machos nadam em círculos com as nadadeiras levantadas, próximos ao local de desova, para que as fêmeas os vejam. No momento da desova, o macho nada em paralelo com a fêmea e envolve seu corpo, provocando a liberação de óvulos e liberando o esperma simultaneamente. Os machos competem pelas fêmeas, estabelecendo e defendendo territórios. Os peixes parecem preferir locais com cascalho, vegetação e com águas rasas para a reprodução. Em biotério, pode-se adicionar plantas de plástico aos tanques de reprodução, com a intenção de simular o ambiente natural preferido para a desova.

## TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO E EQUIPAMENTOS

Há uma variedade de métodos que podem ser usados para realizar a reprodução do *zebrafish* em biotério. Esses métodos podem ser realizados dentro ou fora dos sistemas de recirculação.

O primeiro método envolve a adição de um local de desova ou substrato, enquanto os peixes permanecem no sistema. Ele se baseia na reprodução natural, mantendo-os em grupos de sexos misturados e com mínima manipulação humana. O substrato mais comumente utilizado são bolinhas de gude. Os peixes desovam entre as bolinhas e os ovos caem entre os espaços, evitando o canibalismo e facilitando a coleta subsequente através de sifonamento. Esse método pode ser eficaz, mas é impraticável em locais onde se trabalha com centenas ou milhares de tanques.

Outra alternativa é a realização da reprodução em tanques separados do sistema. Utiliza-se um tanque especial para reprodução, com um fundo gradeado, que se encaixa em um recipiente maior preenchido com água. Quando os peixes se reproduzem, os ovos fertilizados passam pelo fundo gradeado, se depositando no fundo do recipiente inferior e ficando protegidos contra o canibalismo. Este método se provou bastante eficaz e é o mais utilizado nos biotérios de *zebrafish*.



**Figura 15** Tanque utilizado para reprodução do *zebrafish*, com o fundo gradeado para passagem dos ovos.

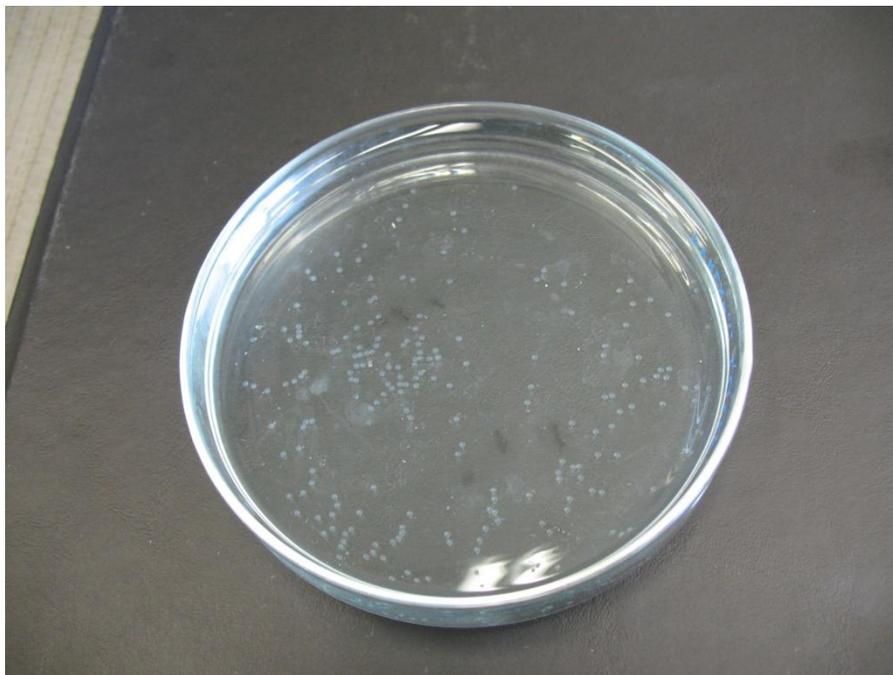
## LARVICULTURA

A eficácia de um protocolo de criação pode ser definida por três fatores principais na produção de larvas: crescimento, sobrevivência e manejo. O ideal é minimizar a necessidade de manejo e maximizar as taxas de crescimento e sobrevivência. Isso, porém, requer capacidade de observação e compreensão sobre nutrição e qualidade da água, além de conhecimento sobre a biologia e comportamento das larvas.

## MANIPULAÇÃO E CUIDADOS COM OS EMBRIÕES

O manejo após a desova é crucial para o sucesso da criação. Durante a reprodução, os ovos descem para o fundo do tanque de criação e acabam se misturando com resíduos lá encontrados. Assim, os embriões devem ser retirados e selecionados de modo rápido, evitando que a exposição prolongada aos resíduos acarrete contaminações. Uma maneira simples de coletar os ovos é despejar delicadamente a água que contém os ovos através de um coador ou uma rede com poros de  $600\ \mu\text{m}$  de diâmetro. Os ovos retidos devem ser cuidadosamente lavados com água limpa e transferidos para placas de petri preenchidas com água. É importante limitar a densidade a 50-100 ovos por placa para diminuir a chance de contaminação. Em alguns casos, pode ser usado azul de metileno (0,00003%) dissolvido na água, diminuindo ainda mais a chance de contaminação por protozoários ou fungos.

De 12-24 horas após a coleta, a água pode ser substituída e os embriões não viáveis, facilmente identificados pela sua aparência esbranquiçada, devem ser retirados. Nesse momento os ovos podem ser desinfetados. Após esses procedimentos, os ovos ficam em repouso, em recipientes de incubação, até que as larvas eclodam e inflem as bexigas natatórias.



**Figura 16** Placa de petri contendo ovos coletados - UFRJ.

### BIOLOGIA DA LARVA

Geralmente, os ovos do *zebrafish* eclodem de 2,5-3 dias pós-fertilização. Esse tempo depende muito da temperatura, sendo que nas mais baixas (24 – 26°C) a eclosão é mais demorada que em temperaturas mais altas (28 – 30°C). As larvas tem baixa motilidade até por volta do quinto dia pós-eclosão, quando elas sobem à superfície e inflam as bexigas natatórias. Isso permite sua flutuabilidade e natação na coluna da água, iniciando seu comportamento de captura de alimentos. Antes disso, as larvas são dependentes das reservas do saco vitelínico, que ainda é utilizado por um ou dois dias após o início da alimentação exógena e é totalmente absorvido

até aproximadamente o 7º dia pós-eclosão. É importante, porém, fornecer alimento às larvas assim que elas subam para a superfície, favorecendo o desenvolvimento do seu sistema digestivo e minimizando perdas por desnutrição.

### QUALIDADE DA ÁGUA

Um dos grandes desafios na criação de qualquer espécie de peixe em cativeiro, é conciliar a necessidade de alimentação constante das larvas com a manutenção da qualidade da água em seu ambiente. A larva do *zebrafish* não produz quantidades significativas de resíduos, mas a preocupação principal em relação à qualidade da água em tanques de larvas é o destino dos alimentos não consumidos. Tais resíduos, quando não removidos, podem ser degradados e gerar amônia. Uma maneira simples para resolver esse problema é utilizar um fluxo de água adequado aos tipos de ração e quantidades utilizadas. Deve-se, porém, haver cuidado para garantir que as taxas de fluxo não sejam altas demais: os alimentos podem ser levados com a corrente antes das larvas terem chance de consumi-los e a energia gasta para elas se manterem na coluna da água pode prejudicar seu desenvolvimento. O fluxo deve ser leve no início e aumentar gradativamente, conforme os peixes crescem e se tornam mais capazes de nadar e de consumir alimentos maiores.



**Figura 17** Larvas de *zebrafish* já apresentando comportamento de nado e busca por alimento. Foto de Bernardo Vaz – FURG.

## **DENSIDADE**

A densidade em que os peixes são mantidos exerce efeitos na saúde, produtividade e bem-estar dos animais. Em ambientes de pesquisa, a densidade tem relação direta com logística, espaço, trabalho e custos.

A densidade ideal pode ser definida como o número máximo de animais mantidos em um tanque, sem prejudicar o bem-estar e o desenvolvimento dos animais. Este valor é diferente entre peixes adulto, juvenis ou larvas e, portanto, os critérios para definição das densidades máxima e mínima são complexos. Uma maneira simples de avaliar a densidade é observar se a taxa de sobrevivência, reprodução e crescimento estão maximizadas ou não.

A densidade, durante as fases larval e juvenil, também parece afetar a diferenciação sexual no *zebrafish*. Densidades reduzidas promovem diferenciação para fêmeas, enquanto que as maiores densidades resultam em uma maior proporção de machos. Assim, a criação de peixes em densidades elevadas ou reduzidas pode resultar em uma superpopulação de um sexo ou outro, complicando potencialmente os experimentos.

Ambos os extremos não são ideais para o *zebrafish* e isso destaca a importância de se encontrar a condição ideal de densidade. Atualmente, por falta de dados, não existem padrões estabelecidos de densidade. Alguns autores sugerem que as densidades de 40-50 peixes por litro são apropriadas durante os primeiros estágios larvais, mas devem ser gradualmente reduzidas para cinco peixes por litro, quando estes alcançam as fases de juvenis e adultos.

## TRANSPORTE

Com o crescimento da popularidade dos sistemas de *zebrafish*, também houve um acréscimo no transporte dos peixes vivos provenientes dos fornecedores e de outras instituições. O transporte é fisiologicamente estressante, especialmente quando realizado por longas distâncias. Desta forma, o conhecimento dos métodos ideais é essencial para garantir a saúde e sobrevivência dos animais.

O principal desafio no transporte de peixes vivos é a manutenção da qualidade da água nos recipientes específicos para esse fim. Os parâmetros mais críticos são a concentração de amônia e a quantidade de oxigênio dissolvido. Como resultado do metabolismo normal, o peixe consome oxigênio e

produz amônia e dióxido de carbono. Isso não seria problema em um sistema de recirculação, mas os níveis de oxigênio e amônia dissolvidos podem ser altamente problemáticos em situações em que a água não é renovada, como acontece nos recipientes de transporte.



**Figura 18** Caixa de isopor utilizada para transporte dos peixes.

A melhor maneira de resolver esse problema é reduzindo a densidade dos peixes durante o transporte. Menos animais consomem menos oxigênio e produzem menos amônia. Outras medidas simples, como adição de oxigênio puro nos recipientes e a restrição alimentar dos peixes de 24-36 horas antes do transporte, podem ser empregadas para

garantir a qualidade da água, dependendo da distância a ser percorrida.

A manutenção da temperatura também é fundamental. É importante isolar as embalagens onde os animais serão transportados, podendo-se usar caixas de isopor ou qualquer outro tipo de embalagem térmica.

## MANEJO DA QUALIDADE DA ÁGUA

Assim como a alimentação e a nutrição, a qualidade da água tem grande impacto na saúde e produtividade do *zebrafish*, uma vez que influencia no seu desenvolvimento, imunidade, fisiologia, anatomia, comportamento e reprodução. Desta forma, os parâmetros de qualidade da água devem ser bem conhecidos e compreendidos, não apenas no seu aspecto geral, mas também em relação às preferências do *zebrafish*. Embora a espécie tolere grandes variações ambientais, existem condições ideais que fazem com que o peixe não apenas sobreviva, mas cresça e se desenvolva adequadamente.

### TEMPERATURA

A temperatura exerce grande efeito sobre os peixes e sobre os processos químicos e biológicos que definem seu ambiente. O *zebrafish* exibe uma tolerância a temperaturas variando entre 6,7-41,7°C, uma das maiores entre os animais pecilotérmicos. Entretanto, em biotérios, eles são normalmente mantidos a 28°C. Esta temperatura está dentro da faixa

recomendada, de 24-28°C, e é onde os peixes apresentam as maiores taxas de crescimento.

## PH

O pH é determinado pela concentração relativa de ácidos e bases em uma solução. Este parâmetro pode ser afetado por processos naturais e artificiais e tem grande efeito sobre os processos biológicos do sistema. Na natureza, o *zebrafish* é encontrado em águas levemente alcalinas e, por isso, os valores de pH no biotério devem ser mantidos entre 7 e 8. Além de estimular o crescimento, alimentação e reprodução dos peixes, esta faixa de pH também é ideal para o crescimento das bactérias responsáveis pela filtragem biológica.

## ALCALINIDADE

A alcalinidade é a medida de todas as bases tituláveis presentes na água. Ela representa a capacidade da água de resistir a mudanças no pH. Em geral, é recomendável manter os valores de alcalinidade dentro de uma faixa de 50-150 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ . Isso pode ser obtido através da adição de alguns compostos à água, como o bicarbonato de sódio, aragonita e/ou coral moído. Níveis abaixo de 20 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  são considerados perigosamente baixos, podendo resultar em variações bruscas de pH.

## DUREZA

A dureza mede a quantidade de íons divalentes na água, principalmente de cálcio e magnésio, mas também de ferro e selênio. Os peixes necessitam destes íons para funções biológicas, os quais devem ser fornecidos aos animais através da água e/ou da dieta. O *zebrafish* é classificado como um peixe de “água dura”, ou seja, prefere valores de dureza acima de 100 mg/L. Desta forma, a dureza da água em biotério deve ser mantida em, no mínimo, 75 mg/L.

## SALINIDADE

Salinidade é a concentração total de todos os íons dissolvidos na água. Ela tem grande efeito sobre a osmorregulação dos peixes e sobre a quantidade de energia gasta nesta função. Quando fora dos valores ideais, pode afetar o crescimento, reprodução e até a sobrevivência dos animais. Em biotério, a salinidade para peixes adultos deve ser mantida em torno de 0,5-2 g/L.

## OXIGÊNIO DISSOLVIDO

O oxigênio dissolvido na água é um parâmetro de extrema importância, pois é essencial na respiração dos peixes e outros organismos presentes no sistema. Embora os níveis de oxigênio nos sistemas raramente estejam em valores críticos, devido à constante movimentação da água, devem ser cuidadosamente monitorados, especialmente em tanques removidos do sistema, onde a água é parada e sem

renovação. O nível mínimo recomendado de oxigênio dissolvido é de 4 mg/L.

## COMPOSTOS NITROGENADOS

O principal produto metabólico excretado pelos peixes é a amônia ( $\text{NH}_3$ ), sendo também produzida durante a decomposição de matéria orgânica. Níveis acima de 0,02 mg/L são geralmente tóxicos para os peixes. Assim, há a necessidade de eliminação deste composto do sistema. Isso pode ser obtido através das bactérias nitrificantes, presentes no filtro biológico, que oxidam  $\text{NH}_3$  e a transformam em nitrato, relativamente não tóxico aos peixes (tolerado até 1000 mg/L). Em sistemas de recirculação, o excesso de nitrato pode ser facilmente removido por meio de trocas parciais de água.

Em sistemas novos, o estabelecimento de populações de bactérias nitrificantes no filtro biológico pode levar de seis a oito semanas. A melhor forma de acelerar este processo é adicionando gradativamente pequenas quantidades de peixes no sistema ao longo de vários dias. Também é possível inocular os sistemas com bactérias obtidas comercialmente.

## TESTES

Devido à grande importância da qualidade da água para a saúde e produtividade dos peixes, os parâmetros listados devem ser testados e anotados regularmente. A frequência de realização dos testes depende de vários fatores, como estabilidade dos parâmetros, tempo de funcionamento do sistema e mudanças de manejo. A tabela 2 apresenta

alguns parâmetros, níveis e frequência de testes recomendados.

Parâmetro	Níveis Adequados	Frequencia de Teste
pH	6,8 – 8,5	Diariamente
Temperatura	24 – 28 °C	Diariamente
Amônia Total	Zero	Semanalmente
Nitrito	Zero	Semanalmente
Nitrato	Até 200 mg/L	Semanalmente
Alcalinidade	50 – 100 mg/L	Mensalmente
Dureza	75 – 200 mg/L	Mensalmente
Salinidade	0,5 – 2,0 g/L	Diariamente
Oxigênio Dissolvido	Acima de 4 mg/L	Mensalmente

**Tabela 2** Parâmetros, níveis adequados e frequência de testes recomendados. Adaptado de: “*The Laboratory Zebrafish*”.

## MANEJO DE EFLUENTES

Os sistemas de manutenção do *zebrafish* em biotério necessitam de uma intensiva utilização de água, consumindo e descartando grandes quantidades durante seu funcionamento. Os efluentes provenientes desses sistemas podem conter patógenos, peixes e elevados níveis de nutrientes específicos, requerendo grande atenção quanto ao seu destino.

Obrigatoriamente, o manejo dos efluentes deve ser realizado de acordo com as leis e regulamentos locais e governamentais. Esta questão deve ser considerada juntamente com arquitetos na fase de planejamento, construção ou renovação das instalações, sejam elas grandes ou pequenas.

## **EQUIPAMENTOS E INSTALAÇÕES**

### **PROJETO DE INSTALAÇÕES**

A principal particularidade em biotérios de *zebrafish*, diferentemente de outros que utilizam invertebrados ou mamíferos, é a larga utilização de água. Em instalações para peixes, a água é o meio que sustenta a vida, distribuindo (oxigênio, minerais, alimento, etc.) e retirando (excretas, feromônios, etc.) compostos do ambiente de criação. Conseqüentemente, tais recintos devem ser planejados para lidar da melhor forma possível com a umidade e garantir eficiência, saúde e segurança, tanto para animais quanto para os profissionais envolvidos.

### **RESISTÊNCIA À ÁGUA**

Nos sistemas de alojamento dos peixes circulam grandes quantidades de água entre filtros, encanamentos e tanques. Além disso, há a necessidade de transferir peixes de um tanque para o outro e também de realizar a manutenção de equipamentos do sistema. Isso tudo faz com que o local onde os *zebrafish* estão sendo criados esteja constantemente molhado.

Diante dessa realidade, todos os materiais utilizados na construção de instalações para o *zebrafish* devem ser adequados para ambientes de grande umidade e resistentes a corrosão e ferrugem. Os materiais que não forem resistentes à

umidade, como componentes elétricos, devem ser mantidos em compartimentos secos e vedados.

Há um grande risco de proliferação de bactérias, protozoários e outros organismos patogênicos em ambientes com condição de água parada. Isso pode trazer problemas tanto para as pessoas que trabalham no biotério, quanto para os peixes. Para amenizar essa questão, as superfícies (chão, bancadas, etc.) devem ser impermeáveis e fáceis de limpar, o chão deve ser levemente inclinado na direção de um ou mais ralos e todas as áreas devem ser de fácil acesso (especialmente em locais que tendem a acumular umidade).

### INFRAESTRUTURA

Alguns fatores devem ser considerados no planejamento geral da infraestrutura de uma instalação para *zebrafish*. Devido à grande quantidade de água circulante no sistema, é indispensável que o recinto seja capaz de conter qualquer eventual inundação causada por erro humano ou falha de equipamentos. O ambiente deve ser equipado com, no mínimo, um ralo para escoar toda água de forma rápida e segura.

Como os sistemas de criação (tanques e água) são bastante pesados, a capacidade de sustentação do piso deve ser adequada a essa carga. É recomendável que, durante a fase de planejamento das instalações, a capacidade de sustentação do piso exceda a carga planejada para viabilizar possíveis expansões, caso sejam necessárias.

O planejamento das instalações também deve considerar a necessidade de manutenção e reparos da

infraestrutura e de equipamentos. O encanamento, os componentes elétricos e outros equipamentos do sistema devem ser instalados em locais de fácil acesso.

### ELETRICIDADE

A manutenção do *zebrafish* em biotério, devido à utilização de bombas, lâmpadas, filtros UV, aquecedores e outros componentes, necessita de uma intensa e ininterrupta fonte de energia elétrica. Todos os equipamentos elétricos devem ser instalados de acordo com as recomendações do fabricante, permitindo uma operação segura em ambientes úmidos. Os circuitos devem ser aterrados e os cabos e tomadas devem ser isolados em compartimentos impermeáveis e instalados em locais seguros, afastados das áreas de trabalho e de umidade.

### CONTROLE AMBIENTAL

O local onde os peixes serão mantidos deve ser planejado de forma que possibilite um rígido controle e monitoramento do ambiente. A temperatura deve ser regulada para minimizar as oscilações, que devem ser de, no máximo, 5°C para cima ou para baixo. O sistema de ventilação deve renovar o ar da melhor forma possível dentro do biotério, minimizando a umidade. A iluminação também deve ser controlada, pois o fotoperíodo é essencial na regulação do crescimento e da reprodução dos peixes. O ciclo diário mais utilizado é o de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

## ACESSO

O acesso ao biotério deve ser o mais restrito possível. Isso é recomendado por minimizar o nível de agitação no ambiente, reduzir a transmissão de patógenos e proteger os equipamentos mais sensíveis.

É também recomendável que cada ambiente tenha apenas um ponto de entrada principal. Esta área deve incluir um espaço para pedilúvio, lavagem das mãos e local para troca de roupas.

## ÁREAS DE TRABALHO

Biotérios são locais de fluxo intenso de pessoas. Em alguns momentos, pode haver várias pessoas trabalhando no mesmo local e em diferentes tarefas, como manutenção de equipamentos, cuidados com os peixes e atividades de pesquisa.

Conseqüentemente, recomenda-se que os recintos tenham espaços específicos para cada tarefa, garantindo que elas possam ser desenvolvidas simultaneamente, sem comprometer a segurança e a saúde, tanto dos peixes, quanto do pessoal envolvido.

Existe uma quantidade considerável de materiais necessários em sistemas que utilizam o *zebrafish*, como tanques de reprodução, luvas, produtos de limpeza, rações e alimentos vivos, aditivos, etc.. Salas separadas devem ser providenciadas para estocagem desses itens, assim como para equipamentos de procedimentos científicos (microscópios, computadores, etc.).

## CONFIGURAÇÃO DO BIOTÉRIO

A configuração das baterias de tanques dentro dos biotérios é um importante fator no planejamento das instalações. O espaço disponível não deve ser completamente preenchido por baterias de tanques. O planejamento deve priorizar a otimização das atividades desenvolvidas nesse ambiente, provendo corredores largos e áreas de trabalho adequadas.



**Figura 19** Os espaços entre baterias de tanques devem ser apropriados para o desenvolvimento das atividades diárias. Foto: Antoine Morin.

A flexibilidade é outro fator importante. As baterias devem ser configuradas de forma que possibilitem a retirada e adição de tanques de diferentes tamanhos, conforme necessário.

## QUARENTENA

Um componente crucial para a biossegurança de biotérios que utilizam o *zebrafish* é um espaço utilizado para isolar os peixes provenientes de fora do biotério. As instalações devem ser planejadas de forma a incorporar um espaço de quarentena que seja fisicamente separado do ambiente onde os outros peixes estão sendo mantidos, com água e equipamentos de uso exclusivo.

## AERAÇÃO

É importante que exista uma fonte de ar comprimido disponível nas instalações. Ele pode ser usado em diversos procedimentos, como na eliminação do cloro presente na água da torneira, na movimentação de água em tanques fora do sistema de recirculação e na aeração de tanques de cultura de alimento vivo. A utilização de bombas individuais para esses propósitos é bastante prática, mas recomenda-se a instalação de compressores ou bombas em um espaço separado para otimizar a utilização do espaço e possibilitar maior flexibilidade quanto à sua utilização no futuro.

## PIAS

Devido ao tipo de atividades realizadas em um biotério que utiliza o *zebrafish*, é muito importante que pias fundas e largas estejam disponíveis nas instalações. Cada pia deve dispor de torneiras com água pressurizada e uma bancada adjacente, para servir de base na manutenção e limpeza dos tanques e equipamentos. Adicionalmente, pode-se encanar

água diretamente dos sistemas de recirculação de forma que seja possível o acesso à água apropriada para encher os tanques.

### LIMPEZA E ESTERILIZAÇÃO

As instalações devem ser pensadas de maneira que facilitem a limpeza e esterilização diária de materiais e equipamentos. Lavadoras de louça comerciais são bastante utilizadas para esse propósito e podem ser adaptadas facilmente embaixo das pias presentes nos biotérios. Isso permite que os equipamentos sujos possam ser colocados diretamente dentro da máquina, evitando respingos e a necessidade de transportá-los por longos trajetos.

### SISTEMAS DE EMERGÊNCIA

Falhas no fornecimento de energia e água, além de inevitáveis problemas com equipamentos essenciais, representam uma grande ameaça aos peixes e às pesquisas realizadas com estes animais. Por isso, é essencial que existam dispositivos de emergência que sejam capazes de manter o funcionamento do sistema mesmo na eventualidade de tais ocasiões. Esses dispositivos de emergência devem incluir geradores emergenciais de energia elétrica, reservatórios de água e bombas reservas, assim como métodos alternativos de monitorar e controlar a temperatura e a qualidade da água.

## SISTEMAS DE ALOJAMENTO

De forma simplista, os sistemas de alojamento para o *zebrafish* são formados por três componentes principais: os tanques, as estantes e o sistema de tratamento da água. As estantes dão suporte aos tanques e ao encanamento responsável pelo transporte de água limpa e suja através do sistema. Na maioria dos casos, a água suja passa por um processo de filtração e tratamento antes de retornar aos tanques.

Existem algumas empresas que desenvolveram sistemas de alojamento sofisticados, específicos para biotérios, aliando conhecimentos em pesquisas com roedores a conceitos básicos de aquicultura. O resultado é uma excelente mistura de tanques, prateleiras e sistemas de filtração compostos por elementos biológicos, químicos e mecânicos.

Entretanto, há ainda a possibilidade de criação de sistemas eficientes com materiais mais baratos, disponíveis em lojas de materiais de construção e de utensílios domésticos. Existem no Brasil alguns biotérios bem sucedidos que fazem uso desses tipos de materiais.



**Figura 20** Sistema de recirculação criado a partir de materiais alternativos. Foto de Bernardo Vaz – FURG.

## TANQUES

Embora exista uma grande variedade no formato dos tanques, sua forma de funcionamento é geralmente a mesma. A água limpa deve entrar no tanque através de válvulas que permitam o controle de fluxo. Este fluxo é responsável pela circulação de água e sua direção determina para onde os sólidos (restos de alimento, fezes, etc.) serão levados. Desta forma, é interessante que o fluxo seja direcionado de forma a “lavar” o fundo, escorrendo posteriormente para os ladrões de

transbordamento, comumente localizados na parte posterior do tanque. Todo tanque deve ser tampado para evitar que os peixes saltem para fora.



**Figura 21** Tanques inseridos em um sistema de recirculação, com torneiras de plástico sendo utilizadas como reguladores de fluxo - UFRJ.

É recomendada a utilização de tampas verdes ou azuis, pois estas ajudam na prevenção do crescimento de algas e cianobactérias. Além das tampas, os tanques também devem incluir um dispositivo que previna que os peixes escapem pelo ladrão de transbordamento. Normalmente, em tanques comerciais, utiliza-se uma divisória localizada na parte

posterior do tanque, próxima à saída de água. A divisória encaixa-se de forma exata nas laterais, enquanto que uma fresta no fundo, pequena o suficiente para evitar que peixes adultos passem, permite que a água suja e os sólidos sejam eliminados. Outra opção é a utilização de telas ou redes, colocadas diretamente na saída de água. O tamanho dos furos destes anteparos deve ser adequado para evitar a perda de peixes, especialmente quando se tratando de larvas e juvenis. Como há um acúmulo inevitável de sólidos nestes locais, sua limpeza deve ser sempre realizada para manter o fluxo de água.

A maioria dos tanques comerciais é feita de policarbonato transparente, mas também podem ser compostos de vidro, acrílico ou outros plásticos. Uma alternativa bastante interessante e barata é a utilização de recipientes plásticos comumente encontrados em lojas de utensílios domésticos. Para facilitar o manejo, limpeza e manutenção dos tanques, é recomendável que eles sejam montados no sistema de forma que permita sua fácil colocação e retirada.

Embora o tamanho dos tanques seja uma questão de preferência pessoal e de aplicação prática, a tabela 3 pode ser usada como referência:

Tanque	Volume	Utilização	Capacidade
Isolamento	0,7-1,7 L	Isolamento	1-2 adultos
Larvas	0,7-3 L	Criação de Larvas	Até 100 larvas
Adultos (Pequeno)	2,7-4 L	Juvenis, crescimento, adultos	Até 20 adultos
Adultos (Grande)	8-12 L	Juvenis, crescimento, adultos	Até 100 adultos

**Tabela 3** Tamanhos recomendados de tanques. Adaptado de: "*The Laboratory Zebrafish*".

### ESTANTES

As estantes servem como suporte estrutural para os tanques, encaamentos e sistemas de filtragem. Normalmente, elas são feitas em aço inoxidável e divididas em prateleiras, onde os tanques podem ser colocados. A configuração das prateleiras e o tamanho das estantes dependem da disponibilidade de espaço e do tipo de aplicação que será dada aos tanques. Comercialmente, existem três tipos principais de estantes. As estantes modulares, que podem ser integradas e compartilham de um sistema de filtragem central; as estantes individuais, que incluem um sistema de filtragem integrado, podendo ser utilizadas individualmente; e as estantes de bancada, que são uma versão menor das estantes individuais, podendo ser facilmente instaladas sobre bancadas de biotérios.



**Figura 22** Sistema de recirculação de água integrado às prateleiras - UFRJ.

Integrados a cada prateleira das estantes, devem estar os encanamentos responsáveis pela circulação de água no sistema. Os canos de distribuição de água limpa são comumente instalados na parte superior das prateleiras, abastecendo os tanques através de tubos flexíveis e válvulas hidráulicas. Por sua vez, o encanamento de recolhimento de água é colocado próximo à base de cada prateleira e coleta a água suja proveniente dos ladrões de transbordamento dos tanques. Uma vez dentro do encanamento de recolhimento, a água suja é levada ao sistema de filtragem, normalmente

localizado na parte inferior da estante, onde será filtrada e de onde sairá limpa novamente para reabastecer os tanques.

### SISTEMA DE TRATAMENTO DA ÁGUA

A grande maioria dos biotérios que criam o *zebrafish* utiliza sistemas de recirculação de água. Neste tipo de sistema, a água utilizada para criar e manter os peixes é tratada e reutilizada, reduzindo significativamente a quantidade de água e o espaço utilizados. O tratamento da água é essencial na remoção de componentes tóxicos e na degradação de outros componentes orgânicos excretados pelos peixes. Sem ele, os peixes não sobreviveriam.

No funcionamento diário de um sistema de recirculação, a água contendo excretas, material orgânico e outros componentes é coletada pelo encanamento de recolhimento, através dos ladrões de transbordamento dos tanques. Em seguida, ela é levada até o sistema de filtragem, por onde passa por uma série de filtros – mecânico, biológico e químico – e é, então, desinfetada. Depois desse processo, a água pode voltar limpa para os peixes.

Normalmente, o primeiro passo no processo de filtragem é a remoção de sólidos em suspensão na água por meio de um filtro mecânico. Os sólidos devem ser eliminados por consumirem grandes quantidades de oxigênio e por produzirem amônia quando degradados. Os filtros mecânicos mais comumente utilizados são espumas, esponjas ou malhas de fios sintéticos que detêm o material em suspensão. Uma vez que estes filtros tendem a saturar e entupir, eles devem ser

limpos regularmente para garantir seu adequado funcionamento.

A segunda, e talvez mais importante, fase de tratamento da água é a filtração biológica. Esta fase da filtração é responsável pela oxidação da amônia tóxica em nitrito e posteriormente em nitrato através da ação de certas espécies de bactérias (principalmente as dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*).



**Figura 23** Os microporos do vidro sinterizado permitem a fixação de uma grande quantidade de bactérias responsáveis pela filtração biológica.

Estas bactérias se fixam e crescem em todas as superfícies do sistema. Sendo assim, o filtro biológico deve ser composto por materiais de grande superfície de contato, a fim de aumentar a população dessas bactérias. Quanto maior a superfície, maior o poder de filtragem. Existem vários materiais que podem ser utilizados para esse fim, desde os mais simples, como bolas de plástico, até os mais avançados, como o vidro sinterizado. O tipo preciso de material filtrante e o tamanho do filtro dependem da densidade e aplicação dos peixes mantidos no sistema. Como o nitrato também pode ser tóxico para os peixes em altas concentrações, é necessária a realização de trocas parciais, retirando água do sistema e reabastecendo com água fresca, periodicamente.

Outra etapa de tratamento da água, frequentemente utilizada, é a filtragem química. Embora não seja considerado essencial, esse tipo de filtragem é bastante utilizado em sistemas de *zebrafish* por ajudar a reduzir a coloração e o odor da água. O componente mais utilizado neste tipo de filtro é o carvão ativado, que pode ser facilmente encontrado em lojas de aquarofilia. Este material também pode ser útil na remoção de outros compostos químicos, como medicamentos e feromônios liberados pelos peixes



**Figura 24** Exemplo de forma comercial do carvão ativado.

O último passo no processo de tratamento da água é a esterilização ou desinfecção. Esta etapa é importante para a redução da carga patogênica comumente presente nos sistemas de *zebrafish*, como bactérias, protozoários, vírus e fungos. O equipamento mais comumente utilizado é o esterilizador ultravioleta (UV). Todos os sistemas comercialmente disponíveis têm um desses esterilizadores incorporados, embora possam ser adquiridos individualmente. Um esterilizador comum é composto por um tubo plástico e uma lâmpada UV encaixada dentro de um protetor de quartzo. Enquanto a água passa pelo tubo plástico, a lâmpada emite luz ultravioleta em um comprimento de onda que penetra nas

células dos microorganismos, destruindo seu DNA. Para garantir seu funcionamento, a manutenção dos equipamentos de esterilização UV deve ser feita regularmente, incluindo troca das lâmpadas e limpeza do protetor de quartzo. A passagem da água pelo esterilizador UV deve ocorrer sempre após a passagem pelos outros elementos filtrantes.

### FONTE DE ÁGUA

A fonte de água do sistema é um fator fundamental na manutenção do *zebrafish*. Embora a água disponível nas torneiras seja adequada para o uso diário, ela não é apropriada para os peixes por conter alguns compostos químicos e microorganismos danosos para esses animais. Além disso, a qualidade química da água pode não ser correspondente às preferências do *zebrafish*. Sendo assim, a água que abastecerá o sistema deve ser previamente tratada para remover impurezas e estabilizar sua composição química.

### TESTES E ANÁLISES

É recomendável que a água usada para abastecer os sistemas seja analisada antes da construção das instalações. Se não for possível que os testes sejam feitos no local, há a possibilidade de realizá-los em laboratórios especializados. Uma vez que os níveis de contaminantes sejam conhecidos, os métodos de tratamento adequados devem ser selecionados, de preferência com o auxílio de um especialista em tratamento de água. Os testes de qualidade de água devem ser realizados periodicamente, mesmo depois de o sistema já ter sido

estabelecido, com o intuito de identificar qualquer mudança e corrigir o tratamento da forma mais rápida possível.

## MÉTODOS DE TRATAMENTO

Existem alguns métodos que podem ser empregados na remoção de impurezas da água. Em todos os casos, entretanto, é necessário adicionar minerais novamente à água tratada antes que ela possa ser usada.

**Osmose reversa:** o processo de osmose reversa remove da água quaisquer sais, metais pesados e outras partículas maiores, incluindo bactérias e vírus. Entretanto, alguns íons e compostos químicos, incluindo o cloro, que é altamente tóxico para peixes, não são efetivamente removidos durante o processo. Por esta razão, equipamentos de osmose reversa devem ser usados em conjunto com filtros de carvão ativado.

**Deionização:** é o processo de remoção de sais da água, utilizando-se um filtro de resinas que prendem partículas carregadas, removendo-as da solução. A água resultante é livre de minerais, mas ainda pode conter microorganismos e partículas orgânicas sem carga.

**Sistema integrado de tratamento:** como não há um método único que remova todas as impurezas da água, a melhor forma de fazer isso é combinar vários métodos eficazes em um sistema. O sistema integrado mais comumente utilizado é o que combina filtragem mecânica, filtragem química por carvão ativado, osmose reversa, deionização e esterilização UV, fazendo com que a água passe por cada um dessas etapas, nesta ordem.

Embora a água tenha sido tratada e esteja livre de impurezas, ela ainda não está pronta para ser usada para os peixes. É necessária a reconstituição de alguns minerais essenciais ao metabolismo e crescimento dos animais. A maneira mais simples de fazer isso é adicionando à água misturas comerciais de sais marinhos (disponíveis em lojas de aquariofilia) e bicarbonato de sódio em doses específicas para alcançar níveis desejados de salinidade, alcalinidade e pH.

## Protocolo 1 – Água Tratada

### Equipamentos e reagentes:

- Sistema de osmose reversa;
- Bicarbonato de sódio;
- Mistura comercial de sais marinhos;
- Sulfato de cálcio;
- Termômetro;
- Teste de pH;
- Teste de amônia total;
- Teste de cloro;

### Método:

1. Passar a água da torneira através de filtros de carvão ativado, sistema de osmose reversa e deionizador, na respectiva sequência.
2. Para tratar a água que passou pelo processo anterior, adicionar a cada 1000 litros: 75g de bicarbonato de sódio, 18g de sais marinhos e 8,4g de sulfato de cálcio.
3. Passar a água resultante do processo anterior por um esterilizador UV, antes de ser adicionada ao sistema.
4. Trocar diariamente 10 a 20% do volume total de água do sistema por água tratada.
5. Medir e registrar diariamente os valores de:
6. Temperatura: manter em 26-28°C (água) e 27-29°C (ar) para evitar a condensação da água.
7. pH: manter por volta de 6,8-7,5, sem baixar para menos de 6 nem aumentar para mais de 8.
8. Amônia total: manter em nível zero.
9. Cloro: manter em nível zero.

Adaptado de: "Zebrafish: A Practical Approach".

## CUIDADOS BÁSICOS

### INDICADORES DE ESTRESSE PARA PEIXES

Sabe-se que o bem-estar dos animais é influenciado por situações que estão fora do seu nível de tolerância. Fatores estressantes comuns para peixes incluem a captura, transporte, manuseio, alta densidade populacional, desnutrição e variações na qualidade da água. Este é um tema complexo, onde dados empíricos, ética, neurociência, pesquisas com animais e as emoções humanas geram controvérsias. A seguir, serão propostos indicadores de estresse para o *zebrafish*, que podem servir como base para a identificação de alguns problemas relativos às práticas de criação.

### MUDANÇAS NA COLORAÇÃO

O *zebrafish* tem três tipos de células de pigmentação que são responsáveis pelo seu padrão de colorido exclusivo: melanóforos, xantóforos e iridóforos. Estas células são responsáveis pela pigmentação das listras longitudinais, que se estendem desde a porção caudal do opérculo até a nadadeira caudal.

Os peixes mudam a cor da pele em resposta a diferentes situações, tais como estímulos ambientais, subordinação social e estresse fisiológico. O hormônio concentrador de melanina (HCM) é um peptídeo secretado pela glândula pituitária de peixes teleósteos, em resposta a estímulos. A secreção de HCM faz com que os melanossomos,

que são grânulos de pigmentos encontrados nos melanóforos, se agreguem ou dispersem, tornando a pele e as escamas mais escuras ou claras, respectivamente.

### FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA

A taxa respiratória dos peixes pode ser visualmente avaliada pelo movimento opercular, que é responsável por fornecer um fluxo de água através das brânquias para a oxigenação. O aumento da frequência respiratória pode ser causado por um ou vários fatores, incluindo diminuição dos níveis de oxigênio na água e na superfície de área funcional das brânquias, além do aumento da demanda fisiológica provocada pelos movimentos físicos e doenças.

### TAXA DE CRESCIMENTO

As taxas de crescimento em peixes podem variar de acordo com a genética, parâmetros ambientais, densidade e nutrição. Uma taxa de crescimento reduzida, especialmente nos primeiros estágios de vida, pode ser um indicativo de estresse crônico. Assim, condições para o ótimo crescimento do *zebrafish* devem ser estabelecidas, a fim de utilizar este fator como um indicador de saúde do animal.

### CONDIÇÃO CORPORAL

A avaliação da condição corporal não está bem estabelecida em peixes, embora várias abordagens tenham sido propostas. A forma do corpo do *zebrafish* é facilmente avaliada e as mudanças podem ser associadas com o ganho

ou perda de peso, ciclo reprodutivo, doenças infecciosas e não infecciosas.

### ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS EXTERNAS

As anormalidades morfológicas, que afetam as nadadeiras, brânquias e os olhos, são indicadores gerais de estresse, que podem ser pioradas pelas condições de criação e ambientais. Mais especificamente, a opacidade das nadadeiras e a descoloração das brânquias são alterações que podem ocorrer como consequência de múltiplos fatores, podendo indicar a presença de um problema crônico subjacente, associado à má qualidade da água.

### DESEMPENHO REPRODUTIVO

Existem muitos fatores que influenciam o desempenho reprodutivo dos peixes. Como exemplo, pode-se citar o desequilíbrio na química da água, a anatomia urogenital, os feromônios, desequilíbrio nutricional, idade e perturbações no ambiente.

### CONSUMO DE ALIMENTOS

O consumo alimentar é um importante indicador de estresse em muitas espécies. É importante notar que existem alguns fatores que podem levar à diminuição do consumo alimentar e mobilização das reservas de energia em resposta a estímulos estressantes. Além disso, peixes com seu consumo alimentar prejudicado são menos resistentes a doenças do que os alimentados adequadamente. Embora não haja padrões estabelecidos de hábitos alimentares do *zebrafish*, é importante

registrar este comportamento com o objetivo de identificar alterações.

### **DOENÇAS COMUNS DO ZEBRAFISH EM BIOTÉRIO**

O *zebrafish* criado em biotério é geralmente alojado em sistemas de recirculação, onde todos os peixes compartilham da mesma água. Desse modo, patógenos podem ser facilmente introduzidos através da importação de peixes com o estado de saúde indefinido, atingindo todos os demais animais.

As doenças dos peixes podem ter etiologia infecciosa ou não infecciosa. Nesse sentido, as infecções são causadas por microorganismos que podem estar presentes nos alimentos, no biofilme e nos peixes. Os agentes infecciosos incluem parasitas, bactérias, vírus e fungos. Por sua vez, as doenças não infecciosas são causadas por fatores ambientais, deficiências nutricionais, anomalias genéticas e traumas.

Os sinais clínicos podem ser manifestados de forma superaguda, aguda ou crônica. Na maioria dos casos, manifestações agudas ocorrem devido a parâmetros inadequados da água, tais como baixo oxigênio dissolvido, toxicidade do cloro ou supersaturação, levando à rápida mortalidade. Já manifestações crônicas, podem ser caracterizadas por letargia, diminuição do apetite, redução do desempenho reprodutivo e baixa taxa de mortalidade durante longos períodos de tempo, podendo variar de semanas a meses. Tal situação pode ocorrer na presença de parasitas, bactérias, vírus, toxinas ou deficiência nutricional.

Há uma grande variação entre as respostas de cada peixe a patógenos e, conseqüentemente, é possível que nem todos os peixes demonstrem sinais da doença durante um surto. Esta variação pode ser influenciada pela genética, ambiente, nutrição e manejo.

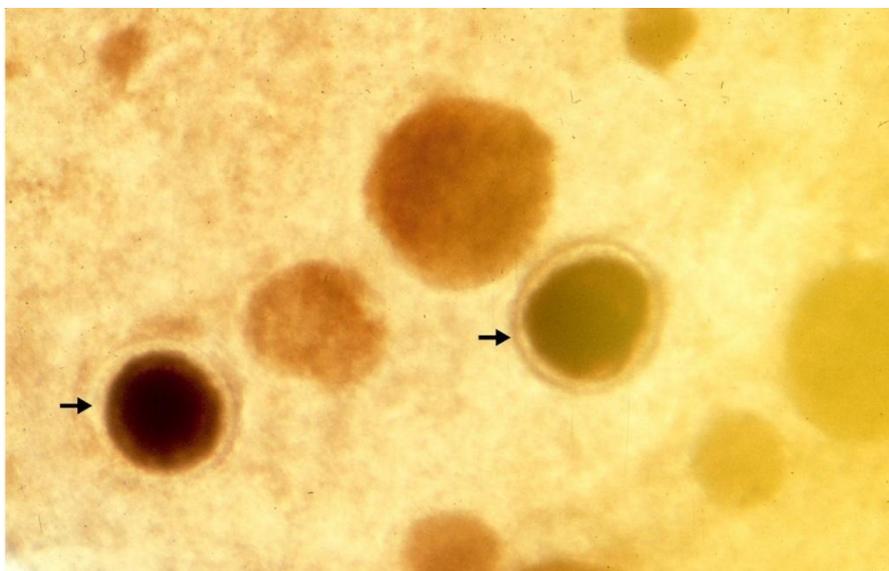
O *zebrafish* é geralmente um peixe resistente. Mesmo assim, algumas doenças podem afetar severamente os peixes criados em biotério, principalmente as micobacterioses, infecções por nematóides (Capilaríase) e a doença do veludo (Oodinirose).

### MICOBACTERIOSE

A micobacteriose é uma doença crônica e com baixa mortalidade, manifestando-se através de lesões na pele e córnea, diminuição do desempenho reprodutivo, perda de peso e presença de múltiplos nódulos granulomatosos brancos em vários órgãos viscerais. É uma doença comum em *zebrafish*. Várias espécies do gênero *Mycobacterium* são conhecidas por infectar este peixe (*M. marinum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. haemophilum*, *M. Peregrinum* e *M. fortuitum*). Vale lembrar que as *Mycobacterium* spp. estão sempre presentes, tanto no solo como na água.

Os fatores que predispõem os peixes à infecção incluem baixa qualidade da água, superpopulação e imunossupressão. Os peixes afetados devem ser removidos do sistema, uma vez que abrigam as bactérias que causam lesões na pele, bem como no intestino. Outros modos de transmissão podem incluir a ingestão de material infectado, como tecidos de peixes, comida e detritos na água. As *Mycobacterium* spp. colonizam

os tanques e encanamentos, servindo como reservatórios para a infecção. Assim, a criação de bons programas de higienização é essencial para minimizar essa possível fonte de infecção.



**Figura 25** Granulomas característicos da micobacteriose. Por “zebrafish.org”.

Os desinfetantes mais eficazes contra *M. marinum* incluem o álcool a 50-70% e o clorito de sódio. Estes agentes podem reduzir o número de *M. marinum* detectável a zero dentro de 1 minuto de contato nas superfícies a serem desinfetadas. Hipoclorito de sódio também pode ser eficaz, mas necessita de pelo menos 10 minutos de contato para reduzir a contagem bacteriana, e 20 minutos para eliminar o organismo.

Uma característica importante do gênero *Mycobacterium* é seu potencial zoonótico. A infecção em humanos pode levar a nódulos ou úlceras na pele que demoram a cicatrizar, sendo que as extremidades corporais são as áreas mais afetadas. A infecção ocorre através do contato com peixes, água e tanques infectados, durante o manejo e a limpeza do sistema. Pessoas imunocomprometidas ou que tenham lesões abertas na pele correm mais risco. Assim, a melhor medida preventiva é o uso de luvas de látex.

A prevenção da micobacteriose no *zebrafish* em biotério inclui estabelecer um bom programa de desinfecção e quarentena, manutenção da qualidade da água, minimização da formação de biofilme, rápida remoção de peixes doentes e redução do estresse. Não há, até o momento, dados que permitam a definição de um tratamento padrão para qualquer tipo de micobacteriose.

### CAPILARÍASE

O *Pseudocapillaria tomentosa* é um parasita que causa a capilaríase intestinal em *zebrafish*. É um nematóide comum e tem ampla especificidade de hospedeiros, com capacidade de infectar ciprinídeos e outros peixes. Capilarídeos são patógenos que podem infectar todas as classes de vertebrados, atacando vários tipos de tecidos. As infecções podem afetar negativamente as taxas de crescimento e de reprodução dos peixes. Este agente ataca o trato gastrointestinal do *zebrafish*, originando uma infecção caracterizada por inflamação, emagrecimento e carcinomas intestinais. Pode ser transmitido diretamente e infecta sistemas inteiros de biotério. O ciclo de

vida dos capilarídeos pode envolver um hospedeiro intermediário, como os vermes oligoquetos *Tubifex tubifex*, mas a transmissão direta também ocorre.

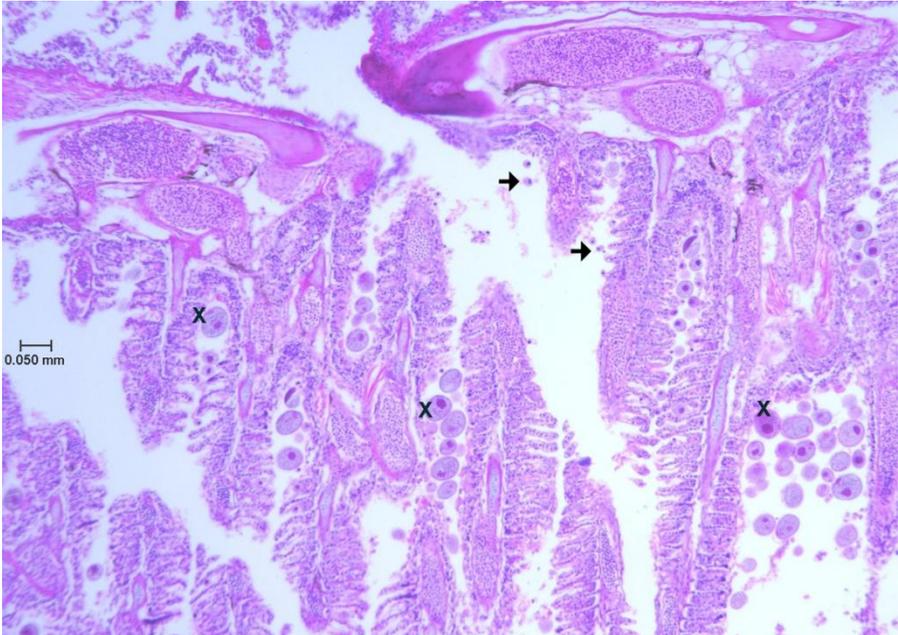
A criação de um programa de quarentena é essencial para prevenir a introdução de *P. tomentosa* nas instalações. Ainda, o ideal seria que todos os embriões introduzidos fossem desinfetados. Outros riscos potenciais incluem a introdução de hospedeiros intermediários, tais como os oligoquetos, como alimento vivo. Existem alguns tratamentos citados na literatura, porém devem ser selecionados de forma cautelosa, sempre com a ajuda de um especialista.

### DOENÇA DO VELUDO (OODINIOSE)

*Piscinoodinium pillulare*, a causa da doença de veludo, é um parasita amarelado e dinoflagelado, que infecta a pele e as brânquias dos peixes. O parasita pode se multiplicar e matar rapidamente os animais no sistema. No primeiro estágio ocorre a infecção dos peixes pelos dinosporos, que se transformam em trofontes e atacam a superfície epitelial, principalmente as brânquias. Depois de vários dias nesta fase, deixam o hospedeiro e formam os tomontes. Este estágio fora do hospedeiro sofre várias divisões, resultando em dinosporos infectantes móveis que irão infectar os outros peixes. O ciclo de vida é completado em cerca de duas semanas sob condições ideais (cerca de 23-26°C).

Os sinais clínicos nos peixes altamente infectados são letargia e dificuldade para respirar. A epiderme dos peixes pode apresentar um brilho acinzentado e cor de ferrugem. Os tratamentos recomendados na literatura envolvem a utilização

de água marinha ou salgada artificialmente, por isso, a melhor forma de tratá-los é separando-os em um aquário fora do sistema e desinfetando o reservatório original.



**Figura 26** Corte histológico de brânquia infestada por *Piscinoodinium pillulare*. "zebrafish.org".

### INTOXICAÇÃO POR AMÔNIA

O desequilíbrio da amônia presente nos sistemas de *zebrafish* causa vários problemas relacionados aos peixes e aos processos biológicos que definem seu ambiente. Tal desequilíbrio pode ser causado nas seguintes situações:

1. Quando um número excessivo de peixes é adicionado a um novo sistema, em que a população de bactérias ainda não é

grande ou estabelecida o suficiente para remover adequadamente a amônia da água.

2. Quando as bactérias biofiltradoras de nitrito são destruídas após o uso de antibióticos ou tratamento químico.

3. Quando os peixes são transportados em embalagens e acondicionados de forma inadequada.



**Figura 27** Exemplo de embalagem de transporte, onde os níveis de amônia podem subir rapidamente conforme a densidade de peixes.

Os sinais clínicos são geralmente não específicos e podem incluir hiperexcitabilidade, perda de apetite, diminuição da frequência respiratória e redução do crescimento. Além disso, a toxicidade por amônia aumenta a suscetibilidade dos peixes a patógenos. A prevenção pode ser alcançada através

do controle da população microbiana, da redução na densidade de peixes e por trocas regulares da água.

### INTOXICAÇÃO POR NITRITO

A toxicidade ocorre quando os peixes são expostos a elevados níveis de nitrito e depende de outros parâmetros da água, tais como oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e níveis de cloro. Em média, um nível de 0,5 ppm de nitrito já é considerado tóxico para a maioria dos peixes. O sangue desenvolve uma aparência marrom após o nitrito oxidar o  $\text{Fe}^{2+}$  da hemoglobina para  $\text{Fe}^{3+}$ , formando a metahemoglobina, que é incapaz de transportar oxigênio.

De forma similar à toxicidade por amônia, a toxicidade por nitrito está associada a problemas de qualidade de água, quando o ecossistema que abriga as bactérias nitrificantes é modificado.

A severidade do quadro clínico depende da porcentagem de hemoglobina que é oxidada. Normalmente, os peixes podem ter 1-3% de hemoglobina oxidada, porém, aqueles com níveis superiores a 50%, apresentam graves problemas respiratórios, podendo chegar à morte. A exposição crônica ao nitrito leva à hiperplasia, hipertrofia, separação lamelar, necrose e hemorragia branquial. Este quadro pode incluir alterações de comportamento, hipoxia e morte.

O tratamento possível da toxicidade do nitrito inclui a adição de cloreto de sódio ou cloreto de cálcio na água, a fim de prevenir a formação de metahemoglobina, mas deve ser administrado com cuidado e sempre sob a recomendação de um especialista.

## INTOXICAÇÃO POR CLORO E CLORAMINA

O cloro e a cloramina são altamente tóxicos para os animais aquáticos. Muitos sistemas de tratamento de água municipal adicionam cloro ou cloramina para desinfetar a água, utilizando cerca de 0,2 mg/L de cloro total. O cloro pode ser removido por meio da aeração da água, durante 24 horas e pelo uso de neutralizadores químicos, como tiosulfato de sódio, em uma concentração de, pelo menos, 7,4 ppm para cada ppm de cloro a ser neutralizado. A cloramina, no entanto, não pode ser removida por aeração e nem por neutralizadores. Com o uso de um filtro de carbono ativado é possível remover tanto a cloramina como o cloro.

Sistemas de *zebrafish* que usam cloro para desinfetar tanques e equipamentos, sem adotar também um sistema de decloração, estão em risco. A apresentação clínica, associada à toxicidade de cloro, inclui a necrose branquial, que leva à insuficiência respiratória e morte por asfixia.

## DOENÇA DAS BOLHAS DE GÁS

A doença das bolhas de gás é resultado da supersaturação da água com gás nitrogênio ou oxigênio. Em sistemas de recirculação de água, esta pode ocorrer em uma variedade de circunstâncias, mais tipicamente através da injeção acidental de ar pela bomba de água. Tal cenário faz com que o gás dissolvido exceda o nível máximo para as condições de temperatura, salinidade e pressão locais.



**Figura 28** *Zebrafish* com bolhas macroscópicas acima dos olhos. Por “zebrafish.org”.

O peixe que apresenta esta doença desenvolve bolhas macroscópicas nos olhos, mucosas, brânquias e nadadeiras, podendo também apresentar exoftalmia. A morte ocorre por asfixia após a necrose isquêmica das lamelas, pois as bolhas de ar interrompem o fluxo de sangue.

### PROFILAXIA

A prevenção e gestão dos surtos de doenças exigem cuidados de forma abrangente, incluindo manejo nutricional, monitoramento da qualidade da água, programas de quarentena e práticas de higienização. A relação patógeno - hospedeiro, quando controlada, está em equilíbrio nos sistemas de *zebrafish*. As doenças resultam de uma perda

neste equilíbrio, favorecendo os patógenos e enfraquecendo os hospedeiros.

Os patógenos podem ser distinguidos entre primários e secundários (ou oportunistas). Os primários levam à doença quando a qualidade da água e as condições de moradia são ótimas. Já os oportunistas fazem isso apenas quando os fatores metabólicos ou ambientais não são ideais, ou quando os animais são expostos a estresse prolongado. A má saúde do *zebrafish* é, muitas vezes, um indicativo de que um ou mais parâmetros ambientais, as condições de criação ou as técnicas experimentais não estão adequados.

A suscetibilidade a doenças em peixes varia de acordo com a genética, manejo, tratamento, biosegurança e nutrição. Alterações fisiológicas podem ocorrer como consequência do estresse e da falta de saúde, afetando a homeostase, a capacidade reprodutiva, a taxa de crescimento e, conseqüentemente, o valor das pesquisas.

É sabido que a minimização do estresse em peixes é importante para a prevenção de surtos de doenças e manutenção da homeostase. Os peixes expostos ao estresse agudo e crônico aumentam sua suscetibilidade a doenças e mortalidade.

### CUIDADOS COM A DIETA

As dietas dos animais de biotério devem ser equilibradas e livres de patógenos e toxinas. Normalmente, são fornecidos alimentos vivos para complementar a dieta do *zebrafish*, como *Artêmia*, oligoquetos e *Paramecium* spp.. Esta prática apresenta o risco de introdução de contaminantes ambientais e

patógenos no sistema. Os alimentos vivos também podem conter contaminantes químicos e metais pesados.

Desta forma, assegurar que a fonte de alimentação seja equilibrada e desprovida de patógenos e elementos tóxicos não é apenas ideal para a saúde animal, mas também para a integridade das pesquisas. De qualquer forma, deve-se entender que há riscos e limitações inerentes à utilização de qualquer tipo de dieta disponível, seja viva ou processada, e esta deve ser selecionada com cuidado.

### ORIGEM DOS PEIXES

Grande parte dos *zebrafish* disponíveis para compra é criada em viveiros. Estes peixes estão em contato com microorganismos presentes no solo, vegetação, fauna aquática, aves e outras espécies de peixes. Os animais criados em tal situação, ao serem inseridos em um sistema de recirculação de água, representam um risco significativo de biosegurança, devido ao alto potencial de introdução de organismos patogênicos em todo o sistema.

Desta forma, devem ser submetidos a métodos de manejo que minimizem esse risco, tais como programas de quarentena, higienização apropriada do sistema e observação dos indicadores de bem-estar dos peixes.

### DESINFECÇÃO E LIMPEZA DOS EQUIPAMENTOS

Equipamentos e pessoas podem ser fontes de patógenos nas instalações. É importante identificar os indivíduos que entram no biotério, pois o fluxo elevado expõe os peixes a muitos fatores de risco. As pessoas que trabalham nesse meio

devem ter um padrão de trabalho definido, deixando as salas de quarentena para serem visitadas por último.

Os pedilúvios são pouco utilizados, mas podem diminuir a carga total de bactérias no ambiente e prevenir a introdução de patógenos nas salas onde estão alojados os animais para pesquisa. Quando empregados, devem ser colocados na entrada do biotério.

Todo o equipamento utilizado para limpeza dos tanques, como mangueiras de sifonamento, esponjas e escovas, devem ser desinfetados entre os usos. A desinfecção pode ser feita por meio de imersão dos equipamentos em solução de limpeza, seguida por um enxágue com água fresca para remover quaisquer resíduos químicos. Desinfetantes comerciais devem ser utilizados de acordo com as instruções do rótulo.

O hipoclorito de sódio é frequentemente usado para a limpeza de tanques, pisos e paredes das instalações, mas deve-se assegurar que os tanques adjacentes não estejam em locais mal ventilados, pois a volatilização deste produto pode matar os peixes.

Em resumo, manter um equilíbrio entre o meio ambiente, o peixe e o ecossistema microbiano é essencial na minimização de surtos. As práticas devem sempre favorecer a homeostase do hospedeiro. Isso inclui a redução de toda a carga de estresse a que o *zebrafish* pode ser exposto e deve envolver cuidados na seleção dos fornecedores destes peixes, na nutrição, nas práticas de criação, nas técnicas de manejo, tratamento e manipulação experimental e nos parâmetros ambientais.

## Protocolo 2 – Desinfecção dos tanques

### Equipamentos e Reagentes:

- 5% de solução de ácido acético: diluir 50 ml de ácido acético em 1 litro de água.
- Peróxido de hidrogênio/ hidróxido de sódio: adicione 10 ml de solução de 10% NaOH para cada 100 ml de solução de 30% de peróxido hidrogênio e complete até 1 litro com água da torneira. A concentração final é de 3% de peróxido de hidrogênio em 0,1% de NaOH.

### Método:

1. Retire o tanque do sistema.
2. Remova as fezes e outros resíduos sólidos e limpe as paredes e fundo utilizando a água que está nos tanques. Remova a água e permita que o tanque seque por pelo menos 24 horas, no intuito de reduzir o número de bactérias infecciosas.
3. Utilize 2 litros de solução de 5% de ácido acético. Umedeça uma esponja e limpe as superfícies do tanque. Esfregue acima do nível usual de água para remover possíveis acúmulos de sais ou minerais nas paredes. Quando todos os tanques tiverem sido limpos, enxágue com água da torneira usando uma mangueira.
4. Umedeça novamente uma esponja com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio em 0,1% de NaOH, esfregando todas as superfícies do tanque. Use luvas de borracha e, caso ocorra contato da solução com a pele, enxágue bem a região usando água da torneira.
5. Enxágue os tanques cuidadosamente usando água da torneira através de uma mangueira. Repita este passo três vezes para assegurar a remoção de toda a solução de lavagem.
6. Insira o tanque no sistema e permita que a água corra durante a noite antes de colocar os peixes.

Adaptado de: "Zebrafish: A Practical Approach".

## **REFERÊNCIAS**

BALDAN, A. P. **Avaliação da tolerância do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a carboidratos.** 119 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – UNESP Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, fev. 2008, p. 2-4.

BILOTTA J. *et al.* **Establishing and maintaining a low-cost zebrafish breeding and behavioral research facility.** *Western Kentucky University, Bowling Green, Kentucky.* Behavior Research Methods, Instruments, & Computers 1999, 31 (I), 178-184.

ENGESZER R. E. *et al.* **Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field.** ZEBRAFISH - Volume 4, Number 1, 2007 - Mary Ann Liebert, Inc.

J.F. López-Olmeda, F.J.Sánchez-Vázquez. **Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*).** ELSEVIER Review. Journal of Thermal Biology 36 (2011) 91–104.

LAWRENCE C. **The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review.** ELSEVIER ScienceDirect - Aquaculture 269 (2007) 1–20.

LAWRENCE C. and HARPER C. **The laboratory zebrafish.** 1st edition. Florida: CRC Press, (December 17, 2010).

NÜSSLEIN-VOLHARD C. and DAHM R. **Zebrafish: A practical approach.** New York: Oxford University Press, 2002.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. 4th ed., University of Oregon Press, Eugene, 2000.

**Zebrafish International Resource Center (ZIRC)**. Disponível em: <<http://zebrafish.org/zirc/home/guide.php>>. Acesso em: 10/02/2011.



**UFPR**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ