



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

CLÁUDIO ALBERTO GELLIS DE MATTOS DIAS

PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO EM *Danio rerio*: EFEITOS DA
MELATONINA SOBRE O HORÁRIO DA COLETA E DE REGIME DE LUZ

BELÉM PA
2014

CLÁUDIO ALBERTO GELLIS DE MATTOS DIAS

PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO EM *Danio rerio*: EFEITOS DA
MELATONINA SOBRE O HORÁRIO DA COLETA E DE REGIME DE LUZ

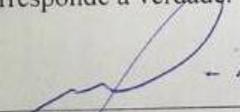
Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Psicologia Experimental, pelo Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento do Núcleo de Pesquisa do Comportamento, da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Gouveia Junior

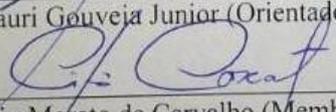
BELÉM PA
2014

**ATA DE DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DO ALUNO CLÁUDIO ALBERTO
GELLIS DE MATTOS DIAS, REALIZADA EM 12 DE DEZEMBRO DE 2014.**

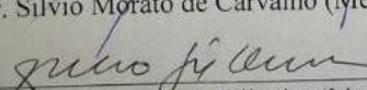
Aos doze dias do mês de dezembro de dois mil e quatorze, às quatorze horas, no auditório Vivaldo de Oliveira Reis Filho, reuniu-se a Banca Examinadora da Tese de Doutorado do aluno Cláudio Alberto Gellis de Mattos Dias que defendeu a Tese intitulada: "Preferência Claro/Escuro em *Danio rerio*: Efeitos da Melatonina Sobre o Horário da Coleta e de Regime de Luz". Fizeram parte da Banca Examinadora o Prof^o. Dr. Amauri Gouveia Junior (Orientador – UFPB), Prof^o. Dr. Silvio Morato de Carvalho (Membro – USP), Prof^o. Dr. Julio Cesar Sá de Oliveira (Membro – UNIFAP), Prof^o. Dr. Euzébio de Oliveira (Membro – UFPB) e a Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco (Membro - IEC). O Prof^o. Dr. Amauri Gouveia Junior deu início à sessão apresentando o autor e o título do trabalho e discorrendo sobre a estrutura da sessão de defesa, combinada previamente pela banca, de acordo com as normas regimentais. Inicialmente, o autor apresentou o trabalho em quarenta minutos, sendo, em seguida, arguido pelos Professores Doutores Silvio Morato de Carvalho, Julio Cesar Sá de Oliveira, Euzébio de Oliveira e Edna Cristina Santos Franco, respectivamente, nessa ordem. Após as arguições, o Prof^o. Dr. Amauri Gouveia Junior teceu as considerações sobre o trabalho, agradeceu as contribuições dos demais membros da Banca Examinadora e concedeu a palavra aos presentes que quisessem fazer comentários. Finalizada a sessão, a banca reuniu-se e considerou a Tese APROVADA. Não havendo mais nada a tratar, foi lavrada a presente ATA, que corresponde à verdade.



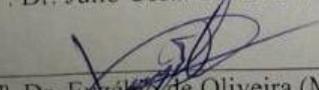
Prof^o. Dr. Amauri Gouveia Junior (Orientador – UFPB)



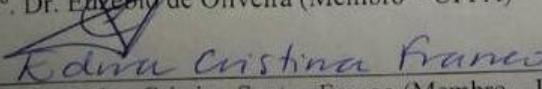
Prof^o. Dr. Silvio Morato de Carvalho (Membro – USP)



Prof^o. Dr. Julio Cesar Sá de Oliveira (Membro – UNIFAP)



Prof^o. Dr. Euzébio de Oliveira (Membro – UFPB)



Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco (Membro – IEC)

Dias, Cláudio Alberto Gellis de Mattos

PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO EM *Danio rerio*: EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O HORÁRIO DA COLETA E DE REGIME DE LUZ / Cláudio Alberto Gellis de Mattos Dias – 2014.

81f.:il

Orientador: Amauri Gouveia Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Pará, NTPC, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento, 2014.

1.Comportamento Animal. 2. Melatonina. 3. Fisiologia. 4. Luz. 5. *Danio rerio*. 6. Preferência claro-escuro I. Gouveia Jr., Amauri. II.Universidade Federal do Pará, NTPC, Programa de Pós-Graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento. III. Título.

“O que prevemos raramente
ocorre; o que menos esperamos
geralmente acontece.”

Benjamim Disraeli (1804 – 1881)

Dedico este trabalho a meu irmão Sílvio Lucio e ao meu primo Matias, pelo incansável apoio de ambos a esta minha jornada.

Agradecimentos

O término de um sonho, e o início de outros, se concretiza com este trabalho. Algumas pessoas contribuíram para que isso fosse possível e a elas dedico um particular agradecimento.

Ao exemplo de vida que é minha mãe, Francisca e que foi meu pai Amadeu.

A minha família por todo apoio que sempre me dedicou ao longo da minha vida, sem o qual eu não conseguiria chegar até aqui e dar continuidade a este projeto.

A minha eterna namorada, minha paz e doutoranda Amanda Alves Fecury, pelos aconchegos, apoio, ajuda, companheirismo e intermináveis xícaras de café. Obrigado vida.

Ao meu amigo e orientador Dr. Amauri Gouveia Junior, por confiar na minha habilidade e perseverança, até mesmo quando eu desconfiava da existência destas.

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar pela acolhida e pelo apoio para o término e a continuidade deste trabalho.

A professora Dra. Jeannie Nascimento dos Santos, obrigado pelo apoio e amizade.

A professora Dra. Maria Elena Crespo López pelas agradáveis conversas e pelas contribuições para este trabalho.

Aos demais professores do programa, pelas disciplinas lecionadas.

Ao Me. Laércio pela paciência em explicar-nos a burocracia do sistema.

Agradeço aos companheiros do laboratório Dr. Bruno Rodrigues, Dra. Cíntia Sanchez, Me. Bruno Mansur e Me. Marcelo Pinheiro pelo companheirismo, discussões e contribuições.

Dias, C.A.G.M. (2014) *Preferência Claro/Escuro em Danio rerio: Efeitos da Melatonina Sobre o Horário da Coleta e de Regime de Luz*. Belém, Pará, 2014. 81p. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Teoria e Pesquisa do Comportamento. Universidade Federal do Pará.

Resumo

O *Danio rerio* é um modelo animal amplamente utilizado e com protocolos bem estabelecidos para experimentos comportamentais em aquários branco/preto. O lado branco do aquário parece causar aversão e a preferência parece ser por permanecer maior tempo no lado escuro. A melatonina é um indolamina com influência no funcionamento fisiológico de animais. Os objetivos deste trabalho são: fazer um levantamento na literatura sobre melatonina e sua correlação com peixes e com o *Danio rerio*; comparar a eficiência de dois aparatos de isolamento em testes comportamentais; testar a influência de quatro períodos do dia e de cinco fotoperíodos na variação da resposta em *Zebrafish* submetidos ao teste claro-escuro; comparar o tempo de permanência em cada lado do aquário teste no período noturno, com sujeitos isolados em fotoperíodo de 12/12 horas; comparar o tempo de permanência em cada lado do aquário teste no período, com sujeitos isolados em fotoperíodo de 12/12 horas, com exposição a sete diferentes concentrações de melatonina; comparar estatisticamente a amostra em quartis dentro de cada concentração; e comparar estatisticamente a amostra em quartis entre os primeiros, segundos e terceiros quartis de cada concentração. O *Zebrafish* e os peixes parecem ter sua fisiologia e comportamento influenciados pela melatonina (tanto endógena quanto exógena). Ambos os aparatos de isolamento demonstraram ser igualmente eficazes para testes comportamentais. A luminosidade parece arrastar o ciclo circadiano do *Zebrafish*, diminuindo sua aversão ao lado branco do aquário, no fotoperíodo 12/12 horas e período de coleta noturno. Ela parece influir na alteração causada pelo fotoperíodo, diminuindo ou anulando o arrastamento. Na amostra analisada parece haver subpopulações que respondem de maneira diferente a exposição à mesma concentração de melatonina. Estudos com cepas específicas de *Zebrafish* e com um leque maior de concentrações de melatonina parecem ser necessários para identificar a possível dose específica para contrabalancear a atuação luminosa no arrastamento do ciclo circadiano em *Danio rerio*.

Palavras-chave: Melatonina, preferência claro/escuro, *Danio rerio*, *Zebrafish*, cronotipos.

Abstract

Danio rerio is a widely used animal model for behavioral experiments in white / black tanks. The white side of the aquarium seems to cause aversion and the preference seems to be to stay longer on the dark side. Melatonin is an indoleamine which influences the physiological functioning of fish. The aims of this work are: to survey the literature on melatonin and its correlation with fishes and *Danio rerio*; compare the efficiency of two apparatuses insulation in behavioral tests; testing the influence of four periods of the day and five photoperiods response variation in *Zebrafish* to light-dark test; compare the time spent on each side of the aquarium test period, subjects isolated on a photoperiod of 12/12 hours with exposure to seven different concentrations of melatonin; statistically comparing the sample into quartiles within each concentration; and statistically compare the sample into quartiles among the first, second and third quartiles of each concentration. The *Zebrafish* and the fishes seem to have their physiology and behavior influenced by melatonin (both endogenous as exogenous). Both apparatuses isolation proved to be equally effective for behavioral tests. Luminosity seems to drag the *Zebrafish* circadian cycle, reducing their aversion to the white side of the aquarium, photoperiod 12/12 hour period and night collection. Melatonin seems to influence the change caused by photoperiod, decreasing or canceling the dragging. In our sample seems to be subpopulations that respond differently to exposure to the same concentration of melatonin. Studies with specific strains of *Zebrafish* and with a wider range of concentrations of melatonin appear to be necessary to identify the specific dosage possible to counteract the performance in light entrainment of the circadian cycle in *Danio rerio*.

Keywords: Melatonin, preference light / dark, *Danio rerio*, *Zebrafish*, chronotypes

Sumário

UMA NOTA SOBRE A ORGANIZAÇÃO DA TESE	12
1 OBJETIVOS	13
1.1 REVISÃO	13
1.2 EXPERIMENTO 1.....	13
1.3 EXPERIMENTO 2.....	13
1.4 EXPERIMENTO 3 E 4	13
2 MÉTODOS	14
2.1 REVISÃO	14
2.2 EXPERIMENTO 1.....	14
2.2.1 Sujeitos	14
2.2.2 Aparatos de isolamentos.....	15
2.2.2.1 Aparato 1	15
2.2.2.2 Aparato 2	15
2.2.3 Aquários	16
2.2.4 Teste	16
2.2.5.Estatística.....	16
2.3 EXPERIMENTO 2.....	16
2.3.1 Sujeitos	16
2.3.2 Fotoperíodos	17
2.3.3 Aparato de isolamento	17

2.3.4 Aquários	17
2.3.5 Teste	17
2.3.6 Estatística.....	17
2.4 EXPERIMENTO 3.....	17
2.4.1 Sujeitos	17
2.4.2 Fotoperíodos	18
2.4.3 Aparato de isolamento	18
2.4.4 Aquários	18
2.4.5 Teste	18
2.4.6 Estatística.....	18
2.5 EXPERIMENTO 4.....	18
2.5.1 Sujeitos	18
2.5.2 Fotoperíodos	18
2.5.3 Aparato de isolamento	18
2.5.4 Aquários	19
2.5.5 Preparação da solução de melatonina	19
2.5.6 Regime de exposição à melatonina	19
2.5.7 Teste	19
3.5.8 Estatística.....	19
3 ARTIGOS	20
3.1 MELATONINA E PEIXES: UMA REVISÃO	20

3.2 COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE APARATOS DE ISOLAMENTO PARA TESTES COMPORTAMENTAIS EM Cyprinidae, <i>Danio rerio</i>	35
3.3 PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO EM <i>Danio rerio</i> : EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O HORÁRIO DA COLETA E REGIME DE LUZ	42
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO A GRÁFICOS E ESTATÍSTICAS DO EXPERIMENTO 1.....	78
ANEXO B SUBMISSÃO DE ARTIGO (item 3.1)	81
ANEXO C SUBMISSÃO DE ARTIGO (item 3.2)	82

UMA NOTA SOBRE A ORGANIZAÇÃO DA TESE

A tese foi organizada em: três artigos: no primeiro artigo (3.1 MELATONINA E PEIXES: UMA REVISÃO) foi realizada uma revisão bibliográfica, relativa e atual, na ferramenta de busca Periódicos Capes (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>), utilizando três tipos de descritores, a saber: a) *melatonin*; b) *melatonin / fish* c) *melatonin / Zebrafish*. O objetivo foi fazer um levantamento na literatura sobre melatonina e sua correlação com peixes e com o *Zebrafish*, *Danio rerio*.

No segundo artigo (3.2 COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE APARATOS DE ISOLAMENTO PARA TESTES COMPORTAMENTAIS EM CYPRINIDAE, *Danio rerio*) foi realizada a comparação entre dois aparatos de isolamento. O objetivo foi comparar a eficiência de dois aparatos de isolamento em testes comportamentais utilizando o ciprinídeo *Danio rerio*, *Zebrafish*. Os métodos e resultados são relativos ao Experimento 1, descritos a seguir.

No terceiro artigo (3.3 PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO EM *Danio rerio*: EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O HORÁRIO DA COLETA E REGIME DE LUZ) verificou-se a preferência e a influência de sete diferentes doses de melatonina no comportamento do *Zebrafish*. Os objetivos foram testar a influência da luminosidade e do período de coleta no comportamento de preferência claro/escuro em *Danio rerio* no aquário branco/preto, e a influência de sete diferentes doses de melatonina na variação da resposta em *Zebrafish* submetidos ao teste claro-escuro, em um ciclo circadiano manipulado (fotoperíodo de 12/12 horas (12 horas de luminosidade por 12 horas de escuridão), no período de coleta noturno (das 18:00 horas às 24:00 horas). Os métodos e resultados são relativos ao Experimento 2, 3 e 4, descritos a seguir e aparecem dentro do artigo como Experimentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Os objetivos da tese, seguidos pela descrição completa dos métodos utilizados para cada artigo são apresentados. Seguem-se uma conclusão geral e as referências gerais. As submissões dos artigos são apresentadas em anexo.

1 OBJETIVOS

1.1 REVISÃO

Fazer um levantamento na literatura sobre melatonina e sua correlação com peixes e com o *Zebrafish*, *Danio rerio*.

1.2 EXPERIMENTO 1

Comparar a eficiência de dois aparatos de isolamento em testes comportamentais utilizando o ciprinídeo *Danio rerio*, *Zebrafish*.

1.3 EXPERIMENTO 2

Testar a influência de quatro períodos do dia (Manhã (06:00 – 12:00 horas); Tarde (12:00 – 18:00 horas); Noite (18:00 – 24:00 horas); e Madrugada (24:00 – 06:00 horas)) e de cinco fotoperíodos (14 horas de luminosidade por 10 horas de escuro total (denominado 14/10); 24 horas de escuro total (denominado 00/24); 24 horas de luminosidade total (denominado 24/00); e 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12)) na variação da resposta em *Zebrafish* submetidos ao teste claro-escuro.

1.4 EXPERIMENTO 3 E 4

Comparar o tempo de permanência em cada lado do aquário teste no período noturno, com sujeitos isolados em fotoperíodo de 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12), no período noturno (denominado Noite (18:00 – 24:00 horas)).

Comparar o tempo de permanência em cada lado do aquário teste no período noturno (denominado Noite (18:00 – 24:00 horas), com sujeitos isolados em fotoperíodo de 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12), com exposição a sete diferentes concentrações de melatonina.

Comparar estatisticamente a amostra em quartis do experimento 4, dentro de cada grupo (0nM; 25nM, 50nM, 100nM, 125nM, 150nM, 175nM e 200nM).

Comparar estatisticamente a amostra em quartis do experimento 4 entre os primeiros, segundos e terceiros quartis de cada grupo (0nM; 25nM, 50nM, 100nM, 125nM, 150nM, 175nM e 200nM).

2 MÉTODOS

2.1 REVISÃO

Revisão bibliográfica, realizada na ferramenta de busca Periódicos Capes (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>). Foram utilizados três descritores, a saber: a) melatonin; b) melatonin / fish c) melatonin / *Zebrafish*. O descritor “a” retornou 16.857 resultados; o descritor “b” retornou 1.086 resultados; e o descritor “c” retornou 315 resultados. Como critério de inclusão foi utilizado a associação entre melatonina, peixes, e *Zebrafish*; e um período de cinco anos. Critérios fora desta associação foram considerados excludentes. Esta revisão foi realizada com 95 artigos que atenderam os critérios, entre maio e junho de 2014.

2.2 EXPERIMENTO 1

2.2.1 Sujeitos

Foram isolados, em cada aparato, 08 sujeitos (16 sujeitos no total), (*Danio rerio*) adultos, de sexos indeterminados, experimentalmente ingênuos, provenientes de pet shops locais, mantidos por sete dias, em dois diferentes aparatos. Cada um desses aparatos teve sua luminosidade controlada por temporizadores (*timers*) ligados a lâmpadas internas, num ciclo com 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12). Os sujeitos alimentados com ração própria (*TetraMin Tropical Crisps, Tetra GmbH, 49324 Meile Alemanha*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociências e Comportamento do Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento da Universidade Federal do Pará e no Laboratório de Neurociências e Comportamento II do Núcleo de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Amapá.

2.2.2 Aparatos de isolamentos

2.2.2.1 Aparato 1

O aparato 1 foi construído com placas de MDF (aglomerado de alta densidade) de quinze milímetros, suas medidas são: 64,5 x 79,0 x 42,0 centímetros. É dividido em quatro compartimentos de 30,0 x 30,0 x 40,0 centímetros. Cada compartimento possui uma porta vedada duplamente com fita espuma autocolante de três milímetros, instaladas uma na beirada interna da porta e outra, na mesma posição, no aparato, o que garante a vedação luminosa completa do mesmo. Lâmpadas internas, em cada compartimento, ligadas a temporizadores (*timers*) garantem o controle do período luminoso. Orifícios dotados de ventoinhas (*coolers*) retiram o ar quente de cada compartimento, independentemente, através de orifícios que não permitem a entrada ou saída de luz. Abaixo dos quatro compartimentos há uma gaveta de 61,0 x 12,0 x 40,0 centímetros com função de armazenamento de insumos. Na parte superior, o aparato possui um tampo de acrílico branco de cinco milímetros de espessura, 64,5 centímetros de comprimento e 42,0 centímetros de profundidade. Para aferição da temperatura, manutenção da aeração dos aquários de isolamento e alimentação sem abrir os compartimentos existe respectivamente termômetros com visor externo, bomba de ar e tubos com abertura externa.

2.2.2.2 Aparato 2

O aparato 2 foi construído com placas de MDF (aglomerado de alta densidade) de seis milímetros. Suas medidas são: 60,0 x 30,0 x 40,0 centímetros (comprimento x profundidade x altura). Possui uma tampa com bordas internas, o que proporciona vedação luminosa completa ao mesmo, quando fechado. Uma lâmpada interna, ligada a um temporizador (*timer*) controla o fotoperíodo de cada um dos aparatos. Ventoinhas (*coolers*) retiram o ar quente através de orifícios não permitindo a entrada ou saída de luz. Para aferição da temperatura da água, manutenção da aeração dos aquários de isolamento e alimentação sem abrir os compartimentos (portanto sem afetar o fotoperíodo de cada aparato) foram instalados, respectivamente, termômetros com visor externo, bombas de ar e tubos com abertura externa

2.2.3 Aquários

Os aquários de manutenção dos peixes possuem 47,0 x 30,0 x 30,0 centímetros (comprimento x altura x profundidade) e se destinam a abrigar os peixes ingênuos. Os aquários de isolamento possuem 40,0 x 25,0 x 23,0 (comprimento x altura x profundidade) e se destinam a abrigar os sujeitos dentro do aparato de isolamento.

2.2.4 Teste

Os testes foram realizados no período da Noite (18:00 – 24:00 horas). Os sujeitos, um por vez, foram testados em um aquário teste branco/preto (45,0 x 15,0 x 10,0 centímetros), composto por uma metade completamente preta e a outra completamente branca, com um espaço central de cinco centímetros, delimitado por duas comportas removíveis. Ocorreu um tempo de cinco minutos (300 segundos) para habituação no espaço delimitado pelas comportas. Após este tempo as comportas foram removidas e o sujeito pôde explorar o aquário por quinze minutos (900 segundos). O tempo de permanência em cada lado do aquário foi computado.

2.2.5. Estatística

Os dados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via, com pós-teste Tukey, utilizando o programa BioStat 2009, considerando-se como significativos quando $p \leq 0,05$ e não significativos quando $p \geq 0,05$.

2.3 EXPERIMENTO 2

2.3.1 Sujeitos

Foram isolados 60 sujeitos (12 em cada aparato), (*Danio rerio*) adultos, de sexos indeterminados, experimentalmente ingênuos, provenientes de pet shops locais. Os sujeitos foram alimentados com ração própria (*TetraMin Tropical Crisps, Tetra GmbH, 49324 Meile Alemanha*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociências e Comportamento II do Núcleo de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Amapá.

2.3.2 Fotoperíodos

Foram utilizados cinco aparatos de isolamento com cinco fotoperíodos diferentes: 14 horas de luminosidade por 10 horas de escuro total (denominado 14/10); 24 horas de escuro total (denominado 00/24); 24 horas de luminosidade total (denominado 24/00); e 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12).

2.3.3 Aparato de isolamento

O aparato utilizado é idêntico ao aparato 2 do Experimento 1.

2.3.4 Aquários

Os aquários utilizados são idênticos aos do Experimento 1.

2.3.5 Teste

Os testes foram realizados em períodos do dia, divididos da seguinte forma: Manhã (06:00 – 12:00 horas); Tarde (12:00 – 18:00 horas); Noite (18:00 – 24:00 horas); e Madrugada (24:00 – 06:00 horas) . O procedimento de teste no aquário branco/preto ocorreu idêntico ao Experimento 1

2.3.6 Estatística

Foram utilizados o mesmo programa e os mesmos testes do Experimento 1.

2.4 EXPERIMENTO 3

2.4.1 Sujeitos

Foram isolados 10 sujeitos, (*Danio rerio*) adultos, de sexos indeterminados, experimentalmente ingênuos, provenientes de pet shops locais. Os sujeitos foram alimentados com ração própria (*TetraMin Tropical Crisps, Tetra GmbH, 49324 Meile Alemanha*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociências e Comportamento II do Núcleo de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Amapá.

2.4.2 Fotoperíodos

Foi utilizado um aparato de isolamento com um fotoperíodo de 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12).

2.4.3 Aparato de isolamento

O aparato utilizado é idêntico ao aparato 2 do Experimento 1

2.4.4 Aquários

Os aquários utilizados são idênticos aos do Experimento 1.

2.4.5 Teste

Os testes foram realizados no período da Noite (18:00 – 24:00 horas). O procedimento de teste no aquário branco/preto ocorreu idêntico ao Experimento 1..

2.4.6 Estatística

Foram utilizados o mesmo programa e os mesmos testes do Experimento 1.

2.5 EXPERIMENTO 4

2.5.1 Sujeitos

Foram isolados 112 sujeitos (14 em cada grupo), (*Danio rerio*) adultos, de sexos indeterminados, experimentalmente ingênuos, provenientes de pet shops locais. Os sujeitos foram alimentados com ração própria (*TetraMin Tropical Crisps, Tetra GmbH, 49324 Meile Alemanha*). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociências e Comportamento II do Núcleo de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Amapá.

2.5.2 Fotoperíodos

Foi utilizado um aparato de isolamento com um fotoperíodo de 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12).

2.5.3 Aparato de isolamento

O aparato utilizado é idêntico ao aparato 2 do Experimento 1

2.5.4 Aquários

Os aquários utilizados são idênticos aos do Experimento 1.

2.5.5 Preparação da solução de melatonina

Foi preparada uma solução mãe de melatonina (1mg) (*KAL, Park City, UT 84060, USA*) em água destilada (431ml) com concentração de 10000 nanomolar (nM).

2.5.6 Regime de exposição à melatonina

Os sujeitos foram expostos à droga após o período de isolamento de sete dias em aparato próprio. A exposição dos sujeitos ocorreu individualmente, por vinte minutos, em 30 ml de água do aquário de manutenção, em sete concentrações diferentes de melatonina (25nM, 50nM, 100nM, 125nM, 150nM, 175nM e 200nM), antes do teste no aquário branco/preto, em recipiente próprio, e com a mesma luminosidade do aparato de isolamento. O grupo controle foi exposto aos mesmos vinte minutos em recipiente semelhante, porém com água sem melatonina (0nM). Posteriormente à exposição foram testados no aquário branco/preto.

2.5.7 Teste

O mesmo aquário teste e procedimentos utilizados no Experimento 3 foram repetidos.

3.5.8 Estatística

Foram utilizados o mesmo programa e os mesmos testes do Experimento 1.

3 ARTIGOS

3.1 MELATONINA E PEIXES: UMA REVISÃO

Resumo

Desde o surgimento da vida no planeta os seres vivos estão sujeitos a ciclos ambientais. Mecanismos internos regulam o ritmo biológico do ser vivo, gerando impulsos e sincronizando a atividade dos seus sistemas com o ciclo de luminosidade e escuridão do meio ambiente. O sistema utiliza vias de saída nervosa para demandar variações fisiológicas e comportamentais no sujeito. Nos vertebrados o neurohormônio melatonina parece ser a principal via bioquímica de saída dos relógios biológicos, conduzindo a informação rítmica a todo o organismo. Esta revisão tem por objetivo fazer um levantamento na literatura sobre melatonina e sua correlação com peixes e com o *Zebrafish*, *Danio rerio*. A melatonina, tanto endógena como exógena, influencia o ciclo circadiano de peixes, incluindo o *Zebrafish*. A fisiologia (desenvolvimento, sono, alimentação, memória, reprodução) e o comportamento (aprendizado, ansiedade) do *Danio rerio* são afetadas por esse neurohormônio.

Palavras-chave: Melatonina, peixes, *Zebrafish*, *Danio rerio*.

Abstract

Since the appearance of life on the planet living beings are subject to environmental cycles. Internal mechanisms regulate the biological rhythm of the living being, generating pulses and synchronizing the activity of their systems with the cycle of light and darkness of the environment. The system utilizes output nerve pathways to require behavioral and physiological changes in the subject. In vertebrates, the neurohormone melatonin seems to be the main biochemical pathway output of the biological clock, leading to rhythmic information to the entire system. This review aims to survey the literature on melatonin and its correlation with fish and with the *Zebrafish*, *Danio rerio*. Melatonin, both endogenous and exogenous influences the circadian cycle of fish, including *Zebrafish*. The physiology (development, sleeping, eating, memory, reproduction) and behavior (learning, anxiety) *Danio rerio* are affected by this neurohormone.

Keywords: Melatonin, fish, *Zebrafish*, *Danio rerio*.

Introdução

Desde o surgimento da vida no planeta os seres vivos estão sujeitos a ciclos ambientais. Regimes de luminosidade e escuridão, ciclos lunares e ciclo de marés

são causados pelos movimentos de translação e rotação da Terra (Cymborowski, 2010; Rocha et al., 2011).

A fisiologia de um ser vivo tem a propriedade de variar de acordo com o tempo. O peristaltismo, os batimentos cardíacos, as ondas elétricas na transmissão nervosa, a respiração, o ciclo menstrual em mamíferos, a temperatura central em homeotermos e a reprodução são exemplo de variações que obedecem a ciclos internos próprios (Barrera-Mera, 2012; Lahiri et al., 2005; Moura & Silva, 2010). Essa variação é denominada ritmo biológico, existindo uma forte associação entre ela e os períodos de luminosidade/escuridão do meio ambiente. Os períodos luminosos e escuros sinalizam para que o ritmo biológico dos seres vivos se sincronize com as 24 horas de um dia. O ritmo biológico é chamado circadiano (cerca de um dia – 20 a 28 horas) porque obedece as sinalizações ambientais deste período de tempo (Cymborowski, 2010; Neves et al., 2000; Pereira, Tufik, & Pedrazzoli, 2009).

Os sinalizadores externos ou Zeitgebers (“doadores de tempo” ou arrastadores) fazem com que os ritmos biológicos internos funcionem sincronizados ao meio ambiente (homeostase reativa) (Baldomero, 2011; Cavallari et al., 2011; Cymborowski, 2010; Sousa, Cruz-Machado, & Tamura, 2008) A capacidade de coordenar seus próprios ciclos fisiológicos e também coordená-los com os ciclos ambientais são importantes para ajudar a regular as atividades dos seres vivos, tanto unicelulares como pluricelulares (Barrera-Mera, 2012; Bell-Pedersen et al., 2005).

Os ritmos circadianos se mantêm mesmo com a ausência de sinalização externa ao ser vivo (livre-curso). Há fatores celulares e fisiológicos próprios que os fazem acontecer, independente do meio ambiente (P. Li et al., 2005). Esse ciclo interno (ritmo biológico ou circadiano) pode não corresponder ao ciclo do ambiente, permitindo assim uma antecipação do funcionamento fisiológico (homeostase preditiva) (Baldomero, 2011; Moura & Silva, 2010; Sousa et al., 2008), como, por exemplo, na liberação de cortisol e no aumento da temperatura central em humanos (na preparação do despertar de períodos de sono ou repouso) (Baldomero, 2011; Neves et al., 2000). Essa antecipação permite que o ser vivo se prepare para mudanças ambientais relacionadas com variações na quantidade de luz ou mudanças na temperatura do seu habitat (Sousa et al., 2008), que são situações importantes para a manutenção e adaptação da sua espécie (Jansen, Lopes, Jansen, & Capone, 2007; Pereira et al., 2009; Rocha et al., 2011).

Esta ritmicidade em livre-curso é mantida por diferentes estruturas anatômicas e por vários processos fisiológicos que funcionam de maneira integrada (Sousa et al., 2008), chamado sistema de temporização circadiana (CTS = Circadian Timing System) (Pontes et al., 2010).

A luminosidade do ambiente é capaz de influenciar estruturas anatômicas e funcionais dos animais (Aarseth, Frøiland, & Jørgensen, 2010; Bayarri et al., 2004). Mecanismos internos regulam o ritmo biológico do ser vivo, gerando impulsos e sincronizando a atividade dos seus sistemas com o ciclo de luminosidade e escuridão do meio ambiente (Cardoso, Cruz, Silva, & Cortez, 2009). Essa sinalização externa necessita de vias bioquímicas e/ou biofísicas de recepção nervosa no corpo que a levem até a parte do sistema nervoso responsável pelo processamento da informação (relógio endógeno). Então o sistema utiliza uma via de saída nervosa para demandar variações fisiológicas e comportamentais no sujeito. O autocontrole é feito com feedbacks no centro nervoso regulador ou até no próprio sensor de entrada do estímulo (Cymborowski, 2010) (Figura 1).

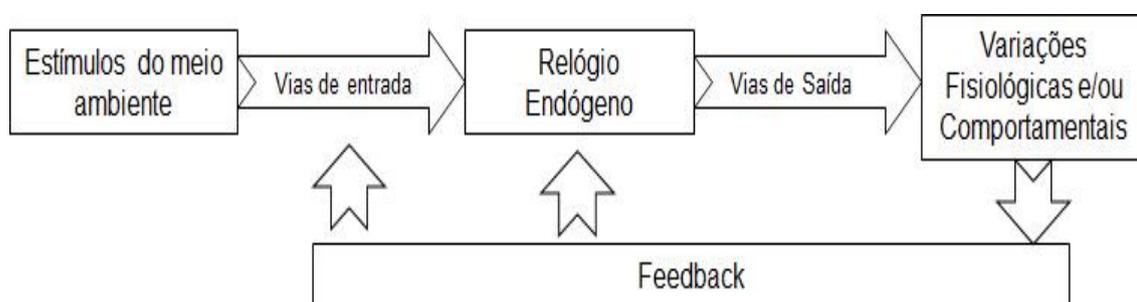


Figura 1 Entrada de estímulos no sujeito, processamento e saída (Adaptado de Cymborowski (2010)).

Em organismos multicelulares existe um “relógio” endógeno central, interligado a relógios endógenos periféricos. Normalmente a glândula pineal, localizada no cérebro, atua como relógio endógeno central. A entrada de estímulos pode fazer com que o relógio central mande informações aos relógios periféricos, conjuntos de células espalhadas pelo organismo. Células da retina enviam impulsos nervosos à glândula pineal (relógio endógeno central) ao escurecer, fazendo-a liberar moléculas de indolamina que atuam no organismo, provocando modificações fisiológicas e/ou comportamentais (Cymborowski, 2010) (Figura 2).

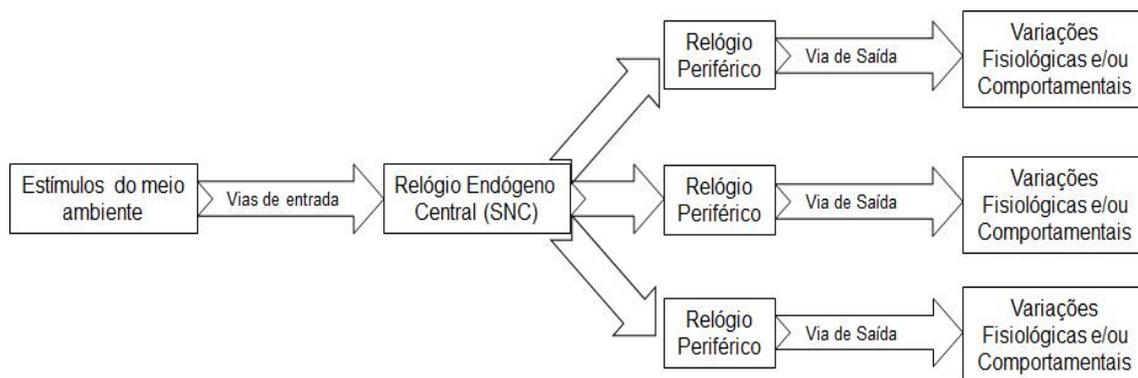


Figura 2 Relógio central, relógios periféricos e múltiplas saídas (Adaptado de Cymborowski 2010)).

Em peixes, como o *Zebrafish*, *Danio rerio*, os relógios periféricos possuem seus próprios fotorreceptores, que mantêm algum grau de dependência do relógio central (Cymborowski, 2010) (Figura 3). Algumas variações fisiológicas e comportamentais influenciadas pelos fotoperíodos externos são: atividade locomotora, comportamento de formação de cardumes, pigmentação da pele, ingestão de alimento, consumo de oxigênio e preferência térmica (Falcón et al., 2011).

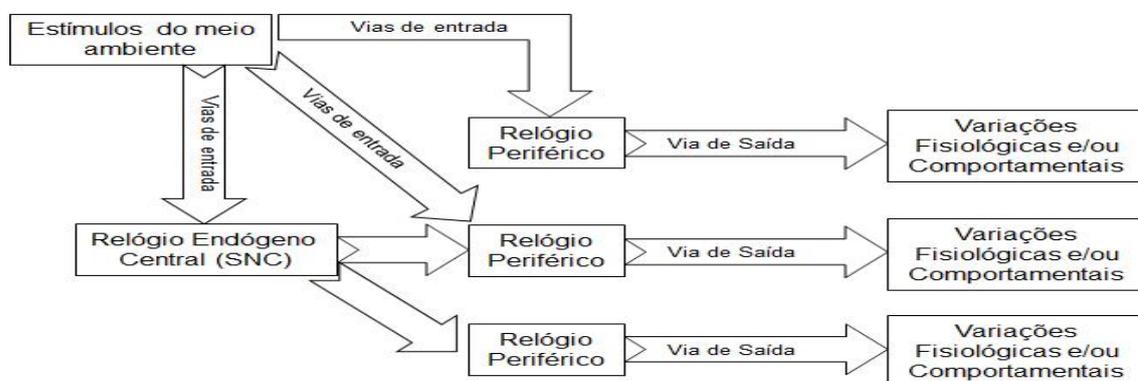


Figura 3 Diferentes vias de entrada de estímulos em peixes (Adaptado de Cymborowski (2010)

Nos vertebrados a melatonina parece ser o principal efector bioquímico das vias de saída dos relógios biológicos, conduzindo a informação rítmica a todo o organismo (Falcón, Migaud, Muñoz-Cueto, & Carrillo, 2010b).

Melatonina

Em 1917, ao alimentar girinos com extratos de glândula pineal, notou-se a alteração da coloração de sua pele e o aparecimento de manchas escuras

devido ao acúmulo de melanócitos. Isolou-se, em 1958, esta substância, então denominada melatonina. Apenas na década de 1970 a ritmicidade de sua secreção e sua influência no sono foram descritos (Illnait-Ferrer, 2012).

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina) (Figura 4) é uma molécula do grupo das indolaminas, encontrada desde organismos simples como bactérias até organismos complexos como os mamíferos (Tan et al., 2010; Turk et al., 2014).

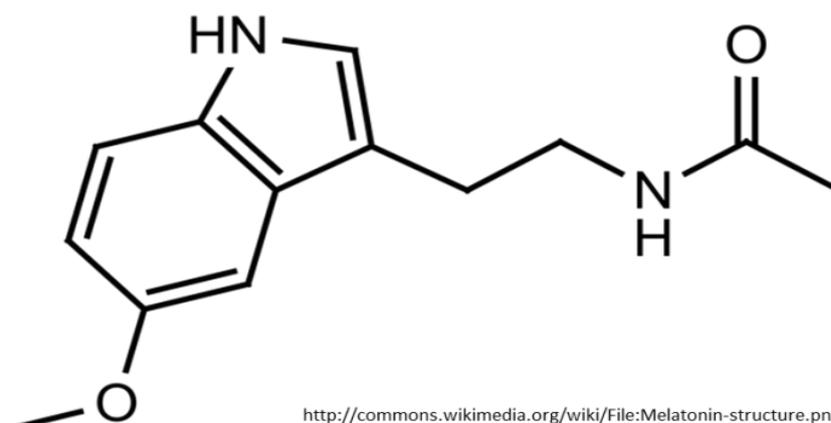


Figura 4 Molécula de melatonina (WikimediaCommons, 2011).

Apresenta peso molecular de 232,28g/mol e é sintetizada a partir do aminoácido essencial L-Triptofano (Figura 5). Tem no funcionamento da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) – também conhecida como serotonina-N-acetiltransferase (NAT) (Seabra & Neto, 2008) – o controle quantitativo da sua produção no organismo (Amaral, 2009; Ben-Moshe, Foulkes, & Gothilf, 2014b; Capitelli, 2007; Gonçalves, 2008; Kasekar, Gupta, Jadhav, & Kadam, 2014).

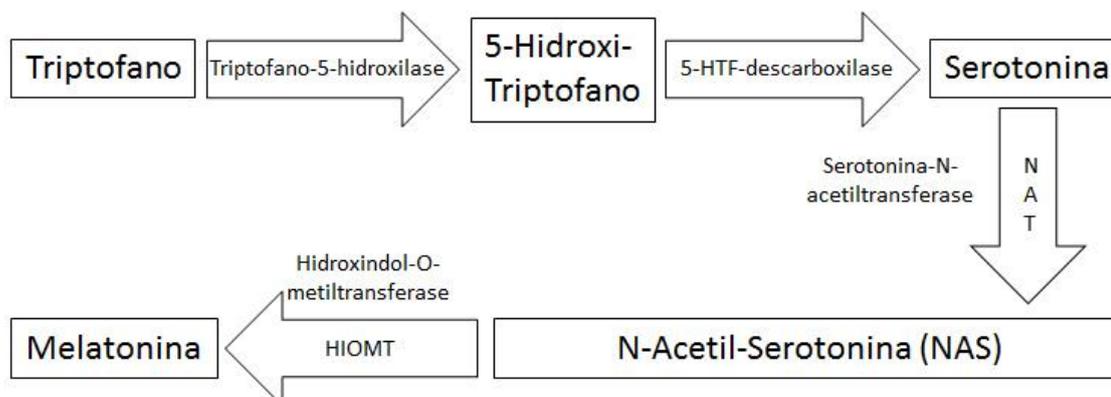


Figura 5 Síntese de melatonina a partir do aminoácido triptofano (Dias, Fagundes, Gouveia JR, Silanes, & Sá-Oliveira, 2013).

Essa molécula é considerada de pouca ou nenhuma solubilidade em água, sendo usualmente diluída em etanol quando usada em experimentos científicos (Díaz Rodríguez, Garnacho Gayarre, Valdés Cañedo, Marín Fernández, & Díaz López, 2001; Garcia-Moreno, Calvo, & Maldonado, 2013; Wang et al., 2014; Zahra, Ibtissam, Abdelhalim, Aboubakr, & Ali, 2012; Zhang et al., 2013) porém alguns autores consideram-na solúvel em água até a concentração limite de 2,4 mg/mL a 25°C (Carnevali, Gioacchini, Maradonna, Olivotto, & Migliarini, 2011; Elia, Azoulay, & Zeiri, 2012; Garcia-Moreno et al., 2013; Shida, 1993; Turk et al., 2014).

Quando o período escuro começa, as células retinianas geram uma informação que percorre um conjunto de neurônios (eixo retino-hipotalâmico) até uma assembleia de células neuronais do hipotálamo, denominada Núcleo Supraquiasmático (NSQ), no Sistema Nervoso Central (SNC) (Detanico, 2010). O NSQ envia, então, um estímulo até a glândula pineal que produz melatonina. O aumento da melatonina sérica induz a um gradativo feedback negativo sobre o NSQ (relógio endógeno) (Baldomero, 2011).

A secreção de melatonina se inicia a noite e atinge seu nível mais alto na madrugada, sendo inibida pela luminosidade (Akosman, Özdemir, Taskiran, Akalan, & Bülbül, 2013; Veras et al., 2013). A molécula circula no plasma em concentração aproximada de 1nM e no líquido cefalorraquidiano em concentração de 100nM (Benítez-King et al., 2013) e é capaz de passar rapidamente pelas membranas celulares, atravessando com facilidade a barreira hemato-encefálica (Ferreira et al., 2010; Zhang et al., 2013).

A administração de melatonina é capaz de inibir a ativação de células de defesa cerebrais (microglia) e diminuir a produção de substâncias que ativam a inflamação (citocinas) em modelos de neuroinflamação em ratos (Benítez-King et al., 2013). Essa indolamina funciona como antioxidante e diminui o estresse em peixes (Dias et al., 2013).

A melatonina participa de vários processos fisiológicos (Arruda, 2013; Huang, Wang, Weng, Sun, & Yang, 2013), tendo influência sistêmica no ajuste do desenvolvimento sexual, na produção de estrogênio pelas gônadas, no ciclo circadiano sono-vigília e atuando na atividade antioxidante (Akosman et al., 2013; Fusatto, 2012; Vidor, 2010).

Objetivos

Este trabalho tem por objetivo fazer um levantamento na literatura sobre melatonina e sua correlação com peixes e com o *Zebrafish*, *Danio rerio*.

Melatonina e os peixes

Em peixes, como nos mamíferos, partes do sistema nervoso estão envolvidas em mecanismos para regulação dos sistemas corporais em sintonia com o meio (Evans, 1998; Kulczykowska, Popek, & Kapoor, 2010). A sincronização ocorre mediada pelos NSQ do hipotálamo do SNC, pela retina e pela glândula pineal, que secreta melatonina, importante na sensibilidade das mudanças luminosas do ambiente (Maitra, Chatteraj, Mukherjee, & Moniruzzaman, 2013; Veras et al., 2013).

A glândula pineal dos peixes se distingue da dos mamíferos por apresentar células fotorreceptoras parecidas morfofisiologicamente com as da sua retina. Essas células fotorreceptoras, na ausência de luminosidade, transmitem impulsos nervosos que induzem a glândula pineal a liberar o hormônio melatonina no sangue e no fluido cérebro-espinhal (Falcón et al., 2010a). As células de peixes possuem receptores específicos para este hormônio (D. Y. Li et al., 2013). Parece não haver barreiras morfofisiológicas para esta indolamina, isto é, a melatonina perfunde-se rapidamente em cada célula do organismo e interage com receptores de membrana situados na superfície celular (Godson & Reppert, 1997; Pandi-Perumal et al., 2008).

Veras et al. (2013) sugerem que exista uma plasticidade quanto à liberação de melatonina pelo sistema circadiano de peixes teleósteos. Estas compartimentalizações circadianas existiriam devido a adaptações evolutivas aos diferentes níveis de luminosidade, cujos grupos estariam expostos. Salmões, trutas e peixes dourados quando oftalmectomizados mantiveram os níveis noturnos de melatonina no plasma, devido à sensibilidade da glândula pineal à luz. Robalos e bacalhaus oftalmectomizados apresentaram uma diminuição plasmática do nível noturno de melatonina denotando uma ação conjunta da retina e das células fotossensíveis da glândula pineal na liberação hormonal. Tilápias e bagres oftalmectomizados tiveram sua produção noturna

de melatonina suprimida ou extremamente reduzida o que implicaria em uma especialização do sistema em comparação a outros teleósteos. Existiriam então três diferentes controles luminosos de liberação de melatonina em peixes.

O neurohormônio melatonina dos peixes parece estar fisiologicamente ligado à ingestão de alimentos, preferência térmica, osmorregulação, reprodução migração, crescimento, resposta ao estresse e atividade locomotora (regulação de ritmos circadianos fisiológicos e comportamentais) (Conde-Sieira et al., 2014; Navarro & Navarro, 2012; Piccinetti et al., 2010; Irina V. Zhdanova & Reeb, 2005). Além disso, parece possuir propriedades antidepressivas e ansiolíticas (Yang, Li, & Huang, 2013; Zahra et al., 2012).

Em duas espécies de peixes, uma diurna e outra noturna, o hormônio melatonina foi testado para verificar sua influência na alimentação e na ritmicidade biológica, utilizando diferentes regimes de luz (períodos de doze horas de luz e doze horas de escuro e períodos com vinte e quatro horas de luz). O tratamento afetou o apetite de ambas as espécies e variou na alteração da atividade entre as espécies (López-Olmeda, Madrid, & Sánchez-Vázquez, 2006).

Em vários animais, incluindo os peixes, a coloração do tegumento influencia na escolha de parceiros para reprodução (seleção sexual). Pigmentos denominados carotenoides estão associados a esta coloração da pele. A suplementação de melatonina aumenta significativamente a produção de carotenoides, influenciando a coloração (Tan et al., 2010).

O aumento da melatonina e períodos curtos de luminosidade parece afetar a reprodução dos peixes. Em salmão macho a maturação das gônadas ocorre em fotoperíodos com menor luminosidade (dia curto). Se tratados com melatonina em fotoperíodos com maior luminosidade (dias longos) haverá uma aceleração no desenvolvimento gonadal. Em carpas a administração melatonina parece alterar a maturação gonadal, dependendo do estado reprodutivo do peixe (Maitra et al., 2013; Irina V. Zhdanova & Reeb, 2005).

Linguados (*Solea senegalensis*) foram mantidos em fotoperíodo de nove horas de luz e quinze horas de escuridão (grupo experimental) e sob mudança natural do fotoperíodo (grupo controle). Notou-se aumento da concentração de melatonina noturna no grupo controle. No grupo

experimental estas mudanças sazonais não ocorreram. Quando houve alteração da produção de melatonina por manipulação do fotoperíodo, o tempo de desova avançou levemente (Catarina Oliveira, Mañanós, Ramos, & Sánchez-Vázquez, 2011).

Em peixe coelho dourado (*Siganus guttatus*) o período lunar parece ter influência na atividade reprodutiva, desenvolvimento de gônadas e desova. O brilho do luar em determinadas fases lunares, sendo uma fonte de iluminação natural, foi avaliado como supressor da síntese de melatonina pineal e melatonina plasmática. A luz da lua e o índice de melatonina seriam então responsáveis por sinalizar o período do ciclo reprodutivo mais propício para o desenvolvimento das gônadas e liberação de gametas (Kashiwagi et al., 2013).

Corvinas do Atlântico (*Argyrosomus regius*), como outros peixes, têm sincronização reprodutiva com o fotoperíodo ambiental. A desova ocorre no período do ano mais favorável para a sobrevivência dos filhotes. Com isso o fotoperíodo exerce um papel sinalizador para a gametogênese, muito antes da desova. Estudos com corvinas do Atlântico e melatonina, in vitro, demonstraram que baixas taxas de melatonina estimulam a liberação de hormônio luteinizante, importante para a reprodução (Falcón et al., 2010b). Estudos feitos com um bagre de água doce (*Channa punctatus*) indicam a possibilidade de manipular a função das gônadas com melatonina exógena. Estas respostas parecem variar de acordo com o tempo, o modo e o período da administração do hormônio. No experimento os peixes foram mantidos em fotoperíodos de 14 horas de luz por 10 horas de escuridão e receberam melatonina via intramuscular ou melatonina via hídrica. O GSI (Índice Gonadossomático = peso da gônada / 100g de peso corporal) aumentou em peixes que receberam o hormônio dissolvido no meio e diminuiu naqueles que receberam a injeção. Assim, a atuação da melatonina na reprodução parece estar ligada ao tempo e modo de exposição do peixe a ela (Renuka & Joshi, 2010).

Salmões (*Salmo salar*) submetidos à retirada da glândula pineal apresentaram problemas na formação da coluna e da resistência mecânica das vértebras. Isso indica a ligação entre o fotoperíodo, a melatonina, e a formação do esqueleto. O mesmo estudo sugere que a intensidade luminosa

mantida acima de 20-40 lux parece garantir o bom desenvolvimento fisiológico deste peixe (Handeland et al., 2013).

A melatonina e seus precursores (serotonina e L-triptofano) podem funcionar como um supressor de estresse em peixes. Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram testadas por 10 dias recebendo melatonina na alimentação. Foram avaliadas a ingestão de alimentos, os padrões bioquímicos e os enzimáticos. Os resultados demonstraram que a melatonina atenuou muitos dos efeitos ocasionados pelo estresse (Conde-Sieira et al., 2014).

Um estudo com peixe palhaço de barbatana amarela (*Amphiprion clarkii*) testou os efeitos da melatonina sobre o estresse oxidativo causado por emissões de luz de LEDs vermelho, verde e azul. Os efeitos foram medidos através da expressão de Arianquilamina-N-Acetyltransferase (AANAT), das atividades das enzimas antioxidantes e dos níveis plasmáticos de melatonina. A expressão, o nível de hormônio, a atividade enzimática foram mais intensos sob o efeito de luz vermelha, indicando que esta induz estresse oxidativo. Para avaliar o efeito da melatonina sobre o estresse foram realizados testes in vivo e in vitro. Todos os níveis utilizados como parâmetros do estresse foram menores com o tratamento hormonal do que sem. Então parece que a luz vermelha induz o estresse oxidativo e que o hormônio melatonina funciona como antioxidante (Shin, Lee, & Choi, 2011).

A influência luminosa controla a produção de melatonina, hormônio capaz de influenciar níveis de agressividade em tilápias (*Oreochromis niloticus*). A redução da sua produção durante a fase luminosa aumenta a agressividade influenciando na estabilidade social do cardume (Carvalho, Mendonça, Costa-Ferreira, & Gonçalves-de-Freitas, 2013; Falcón, Besseau, Sauzet, & Boeuf, 2007).

A melatonina pode, também, ser produzida em locais distintos da glândula pineal em peixes, como, por exemplo, no trato gastrointestinal, onde estaria relacionada à motilidade e a processos metabólicos e digestivos (Conde-Sieira et al., 2014). A função da melatonina no trato digestivo está intimamente relacionada com a regulação da movimentação intestinal, reduzindo a motilidade (Barajas-López, Peres, Espinosa-Luna, Reyes-Vázquez, & Prieto-Gómez, 1996) e a amplitude das contrações espontâneas

in vitro em musculatura lisa de duodeno (Fagundes, Gonzalo, Arruebo, Plaza, & Murillo, 2010), estando ainda envolvida com a absorção de nutrientes (Motilva, Cabeza, & Alarcón de la Lastra, 2001). Um fato importante relatado por Bubenik (2002) passa a ideia de que o aumento da concentração de melatonina em resposta ao alimento no trato digestório desencadeia uma série de processos digestivos essenciais para um melhor aproveitamento dos nutrientes no evento denominado alimentação. Lepage, Larson, Mayer, e Winberg (2005) suportam a ideia que a ingestão do aminoácido triptofano estimula a produção de melatonina no trato digestório.

Em *Zebrafish*, *Danio rerio*, a melatonina apresenta papel na homeostase de várias funções fisiológicas que dependem da sincronização cronobiológica (Lima-Cabello et al., 2014).

Melatonina e o *Zebrafish*, *Danio rerio*

O *Danio rerio*, como alguns outros vertebrados não-mamíferos, pode ser utilizado como modelo para experimentos com relógio circadiano e arrastadores como a luminosidade. Sua glândula pineal, que se desenvolve durante os primeiros estágios embrionários, está localizada na superfície dorsal do cérebro anterior em uma posição central entre o telencéfalo e o teto óptico. Está ligada à porção dorsal do diencéfalo, e contém células fotorreceptoras (cones e bastonetes), sensíveis à influência luminosa, e capazes de gerar impulsos circadianos no organismo, controlando a produção de melatonina. Tecidos distintos da glândula pineal possuem capacidade de produzir melatonina e podem ser modulados por ela (relógios biológicos). Isso faz com que o *Zebrafish* se torne um importante modelo para estudo com melatonina exógena (Ben-Moshe et al., 2014a; Laura et al., 2012; X. Li et al., 2012; Lima-Cabello et al., 2014).

O trabalho de I.V. Zhdanova, Wang, Leclaira, e Danilova (2001), demonstrou que a melatonina atua nos receptores de membranas celulares no *Zebrafish*, e ajudou a esclarecer os processos químicos que envolvem o estado tipo-sono deste vertebrado, fortalecendo este peixe como modelo viável para este tipo de estudo. Segundo Lombardo et al. (2012) a melatonina

exógena é capaz de aumentar o nível de melatonina cerebral em *Zebrafish*, sugerindo uma ação em nível de SNC.

A ectotermia (pecilotermia) em peixes faz com que sua temperatura interna varie diariamente e sazonalmente. A temperatura é capaz de atuar na secreção de melatonina, por meio do funcionamento das enzimas da glândula pineal. Estudos demonstram correlação entre a temperatura fisiológica ótima do *Zebrafish* (30°C) e o pico de produção de enzimas do metabolismo da melatonina. O fotoperíodo e a temperatura parecem determinar a produção de melatonina, definindo assim o ciclo circadiano do animal (Falcón et al., 2010b; Rath, Gothilf, Guido, & Muñoz, 2014).

A melatonina atua induzindo a divisão celular de embriões de *Zebrafish*, acelerando assim seu desenvolvimento durante o período noturno. Parece haver uma ligação entre luminosidade, expressão gênica e melatonina durante o desenvolvimento (Lima-Cabello et al., 2014).

Em *Zebrafish*, a melatonina atua nos receptores de membrana celulares regulando a divisão celular, a diferenciação celular e a migração celular. Esse neurohormônio é considerado parte do sistema de desenvolvimento embrionário normal (Hassell, Reiter, & Robertson, 2013). Segundo Danilova, Krupnik, Sugden, e Zhdanova (2004) receptores celulares de melatonina são expressos na membrana em maior número na fase embrionária do desenvolvimento do que na fase adulta do *Zebrafish*, e o neurohormônio estimula a mitose acelerando o desenvolvimento.

Embriões e larvas de paulistinha (*Danio rerio*) mantidos em um ambiente de 14 horas de luminosidade por 10 horas de escuridão produzem o hormônio melatonina 48 horas após a formação do zigoto. Mudando os embriões para ambientes com maior tempo de escuridão verificou-se que a síntese do hormônio ocorre entre 20 e 26 horas após a formação do zigoto. Como nessa fase os fotorreceptores da glândula pineal já existem e os da retina não, o controle da produção da melatonina baseada na luminosidade parece ser glandular (Kazimi & Cahill, 1999).

O *Zebrafish* apresenta um padrão de secreção de melatonina noturno, por ter hábitos de atividade diurna. Seu período de repouso se assemelha ao padrão comportamental de sono nos mamíferos, incluindo diminuição de sensibilidade a estímulos do sistema sensorial. Este período de repouso

noturno é regulado pelo sistema circadiano, e nele ocorre o aumento do tempo de percepção e a diminuição da atividade locomotora (Lima-Cabello et al., 2014; Paciorek & McRobert, 2012). Segundo Irina V. Zhdanova (2011), peixes diurnos como o *Zebrafish* respondem à produção de melatonina com diminuição de atividade.

O trabalho de Sigurgeirsson et al. (2013) caracterizou a privação de sono no comportamento se sono-vigília do *Zebrafish* levando em conta a influência luminosa na expressão gênica. Foi identificada uma regulação positiva em condições de luz para um gene (*mtnr1b*) que expressa um dos receptores celulares para melatonina. A regulação positiva de genes por luminosidade está relacionada à divisão celular e plasticidade sináptica.

A homeostase e o relógio circadiano regulam o sono, que parece estar envolvido na plasticidade sináptica, na aprendizagem e formação de memória. O *Danio rerio* é um modelo eficaz para estudo de processos fisiológicos do sono, pois permite manipulações genéticas simples, imagens de circuitos nervosos e acompanhamento comportamental em períodos luminosos e escuros (Elbaz, Foulkes, Gothilf, & Appelbaum, 2013).

Em *Danio rerio* o aprendizado e formação de memória ocorrem mais eficientemente no período diurno. Em seu cérebro (hipocampo e corpo estriado) há receptores celulares de melatonina. A recepção deste neurohormônio é responsável pelo disparo de potenciais de ação que contribuem para a formação de memória de longo prazo. Uma distorção no período para aprendizagem ou no período normal de produção de melatonina pode interferir na formação da memória (Lima-Cabello et al., 2014).

Borsetti et al. (2011) investigaram como a luminosidade e a melatonina agem sobre a diferenciação neuronal no tecido adjacente à glândula pineal em cérebros de embriões de *Zebrafish*. Embriões mantidos na escuridão apresentavam atraso na diferenciação celular e uma maior duração nos processos neuronais. Quando adicionada, a melatonina restaurava a diferenciação e a velocidade dos processos nesses embriões. A melatonina parece exercer um papel de programadora da diferenciação de neurônios nesta área cerebral do peixe.

O tratamento com melatonina também é capaz de alterar a expressão de alguns neuropeptídeos cerebrais no *Zebrafish*, responsáveis por regular a

ingestão de alimentos (Conde-Sieira et al., 2014). O trato gastrointestinal (TGI) de peixes, como o de muitos vertebrados, possui células produtoras de melatonina (células enterocromafins), amplamente distribuídas, o que sugere várias possíveis funções deste neurohormônio neste sistema (Lima-Cabello et al., 2014). Ciprinídeos, como o *Danio rerio*, tem poucas células enterocromafins no TGI e uma alta população de células com receptores para serotonina (5-HT). A melatonina partilha esses receptores com a serotonina (5-HT) (Velarde, Delgado, & Alonso-Gomez, 2010). A exposição do *Zebrafish* à melatonina exógena diminui sua ingestão de alimentos, não só devido à diminuição da atividade locomotora, mas também pela ligação desta molécula com a leptina e a melanocortina (Lima-Cabello et al., 2014).

A melatonina foi estudada como moduladora do comportamento alimentar em *Danio rerio*. Duas doses de melatonina (100nM e 1µM) foram administradas em peixes adultos, via hídrica, por dez dias. Avaliações fisiológicas e moleculares demonstraram que a melatonina influencia a fisiologia da ingestão de alimentos ao modular, a nível molecular, a expressão gênica para a leptina. A melatonina parece integrar-se completamente ao metabolismo de regulação da ingestão de alimentos, desempenhando papel importante na regulação do apetite no *Zebrafish* (Piccinetti et al., 2010; Piccinetti et al., 2013).

A reprodução em peixes obedece a um controle nervoso central e de órgãos do sistema endócrino. A melatonina influencia a reprodução em *Zebrafish*. A maturação de folículos ovarianos, gametas e fecundidade têm sido descritos em experimentos com esta espécie de teleosteo, assim como em outras espécies (Lima-Cabello et al., 2014; Maitra et al., 2013). Ela ainda sincroniza a reprodução com o ambiente, otimizando o sucesso deste comportamento (Carnevali et al., 2011).

A melatonina pode não interferir diretamente nos receptores celulares de estrogênio no *Zebrafish*, mas podem induzir mudanças e inibir a vitelogenina (proteína do sangue que fará parte do vitelo da célula-ovo) deste e de outros peixes, influenciando seu desenvolvimento (Dang, 2014; C. Oliveira, Duncan, Pousão-Ferreira, Mañanós, & Sánchez-Vázquez, 2010).

Estudo através de imageamento e ensaios biológicos foi conduzido com ovários de *Zebrafish* utilizando comparação entre gônadas normais e tratadas

com melatonina (doses de 100nM e 1µM). A melatonina apresentou efeito sobre as células ovarianas induzindo a absorção da proteína do sangue que fará parte do vitelo da célula-ovo e sobre a expressão dos genes envolvidos na maturação dos gametas (Giorginia et al., 2012).

A melatonina exerce efeito sobre a reprodução do *Zebrafish*. Fêmeas adultas expostas diariamente a doses diferentes de melatonina (100nM e 1µM), via hídrica, foram estudadas. O GSI (Índice Gonadossomático = peso da gônada / 100g de peso corporal) aumentou, assim como o aumento de vitelogenina e do número de ovos. A fecundidade aumentada foi compatível com o aumento da expressão de genes cerebrais e de hormônios ligados à reprodução (Carnevali et al., 2011).

A produção de melatonina esta ligada a luminosidade do ambiente. Alterações nesta luminosidade influenciam a produção do neurohormônio que conseqüentemente afeta a homeostase comportamental. Larvas de *Zebrafish* tem sua atividade locomotora diminuída quando expostas ao período noturno, com maior produção de melatonina (Vatine, Vallone, Gothilf, & Foulkes, 2011). Moura e Silva (2010) demonstraram a preferência do *Zebrafish* adulto pelo lado escuro ao isolar grupos em ambientes com diferentes períodos de luminosidade. Ficou evidente também fator de arrastamento que o fotoperíodo ocasiona em grupos de *Zebrafish*, depois testá-los em diferentes períodos, em um aquário branco/preto.

Wang et al. (2014) expuseram o *Zebrafish* por 60 horas (três dias) a um aquário branco/preto a fim de avaliar o comportamento relativo à preferência a ambiente claro e escuro. Expuseram o peixe, no início do terceiro dia, a diferentes concentrações de melatonina (10nM, 0,001 e 0,1mM). A adição do neurohormônio (0,1mM) fez com que a proporção de preferência pelo lado preto aumentasse significativamente.

A melatonina influencia no comportamento locomotor de peixes (atividade locomotora). Esse hormônio influencia de maneira variada o comportamento destes animais, dependendo do seu modo de vida e das condições de luminosidade. Em ciprinídeos, como o *Zebrafish*, a melatonina é capaz de induzir a diminuição da atividade locomotora e aumentar o limiar de excitação (o que é considerado sono nas larvas de *Danio rerio*) (Falcón et al., 2010b; Hur et al., 2012; Maximino & Herculano, 2010).

Conclusão

A melatonina, tanto endógena como exógena, influencia o ciclo circadiano de peixes, incluindo o *Zebrafish*. A fisiologia (desenvolvimento, sono, alimentação, memória, reprodução) e o comportamento (aprendizado, ansiedade) do *Danio rerio* são afetadas por esse neurohormônio.

3.2 COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE APARATOS DE ISOLAMENTO PARA TESTES COMPORTAMENTAIS EM CYPRINIDAE, *Danio rerio*

Resumo

O *Danio rerio* é largamente utilizado como modelo experimental pois possui uma manutenção fácil e barata e é um peixe ornamental muito bem adaptado à vida em aquários. Estudos conduzidos com peixes demonstram o efeito ansiogênico que ambientes brancos ocasionam quando sujeitos são colocados em aquários com uma metade branca e outra metade preta para testes de exploração. Estudos realizados com *Zebrafish* demonstram a preferência desta espécie pelo ambiente escuro e sua aversão ao ambiente claro. Esta nota científica tem o objetivo de comparar dois aparatos de isolamento em testes comportamentais utilizando o ciprinídeo *Danio rerio*, *Zebrafish*. Foram isolados, em cada aparato, 08 sujeitos, por sete dias, em

aquários transparentes idênticos. Os sujeitos, um por vez, foram testados em um aquário teste branco/preto. O tempo de permanência em cada lado do aquário foi computado. Não há diferença estatisticamente significativa entre eles ($F(1, 28) = 0,000$, $p=1,000$). Ambos os aparatos demonstraram ser igualmente eficazes na manutenção do *Zebrafish* para testes comportamentais com variável luminosa.

Palavras-chave: Aparato, preferencia claro/escuro, *Danio rerio*, *Zebrafish*.

Abstract

Danio rerio is widely used as an experimental model because it has an easy and inexpensive maintenance and is an ornamental fish well adapted to life in aquariums. Studies conducted with fish demonstrate the anxiogenic effect white environments cause when subjects are placed in aquariums with a half white half black for exploration tests. Studies with *Zebrafish* demonstrate the preference of this species for the dark environment and its aversion to light environment. This scientific notes aims to compare two insulation apparatus in behavioral tests using cyprinid *Danio rerio*, *Zebrafish*. In each apparatus, 08 subjects were isolated for seven days in identical transparent aquariums. The subjects, one at a time, were tested in a test white / black tank. The time spent on each side of the aquarium was computed. There is no statistically significant difference between them ($F(1, 28) = 0,000$, $p=1,000$). Both devices were equally effective in maintaining the *Zebrafish* to behavioral tests with variable light.

Keywords: Apparatus, light / dark preference, *Danio rerio*, *Zebrafish*.

Introdução

O *Zebrafish* é um pequeno peixe ósseo (aproximadamente 30 milímetros), da ordem dos Ciprinídeos, oriundo do delta do rio Ganges, Índia subcontinental (localização aproximada 22° N, 90° E, próximo ao Trópico de Câncer). Apresenta hábitos diurnos (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008), e originalmente vive em águas claras e limpas, sob pontes, em fossos ou lagos rasos que tenham vegetação abundante às suas margens. Observado desde a superfície até o fundo da coluna de água do seu habitat, comumente entre a vegetação e em plantações de arroz (Spence et al., 2006). Seu crescimento, após a

fecundação, ocorre de maneira rápida nos três primeiros meses desacelerando até os dezoito meses, em uma vida média de aproximadamente quarenta e dois meses (Spence et al., 2008).

O *Danio rerio*, é largamente utilizado como modelo experimental, pois possui uma manutenção fácil e barata e é um peixe ornamental muito bem adaptado à vida em aquários (Houart, 2001). A regularidade da postura de ovos pelas fêmeas, o número de embriões gerados, o desenvolvimento e o amadurecimento sexual rápidos são algumas de suas vantagens (Bilotta & Saszik, 2001).

Estudos conduzidos com peixes demonstram o efeito ansiogênico que ambientes brancos ocasionam quando sujeitos são colocados em aquários com uma metade branca e outra metade preta para testes de exploração. Ciprinídeos foram colocados em uma área central de um aquário onde podiam escolher nadar para o ambiente preto ou para o ambiente branco. Fatores como a primeira escolha do ambiente, quantas vezes cada ambiente foi visitado e o tempo de permanência em cada ambiente foram considerados, chegando-se a conclusão que existe uma preferência pelo lado escuro (Gouveia Jr et al., 2005; Maximino, Brito, Dias, Gouveia Jr, & Morato, 2010c).

Estudos realizados com *Zebrafish* demonstram a preferência desta espécie pelo ambiente escuro e sua aversão ao ambiente claro. Serra, Medalha, e Mattioli (1999) verificaram a preferência do paulistinha (*Danio rerio*) por ambientes escuros em dois experimentos que utilizaram um aquário com uma metade branca e outra metade preta, separados por um anteparo removível. O primeiro foi realizado em dois dias consecutivos, com os mesmos animais, e consistia em colocá-los, um por vez, ou no lado branco ou no preto por trinta segundos, retirando depois o anteparo e deixando-os explorar por dez minutos. Em ambos os dias o tempo de permanência em cada lado do aquário foi registrado. O segundo experimento repetiu o primeiro, sendo que metade dos animais, inicialmente, foram postos no lado branco do aquário e a outra metade no lado preto, um por teste. O tempo medido foi o que o animal levava para passar do lado em que foi colocado para o lado oposto do aquário.

A preferência pelo lado escuro em aquário teste é bastante resistente a manipulações ambientais, não sendo afetada pelo enriquecimento ambiental do alojamento, isolamento do animal, formato aquário, entre outras, (Maximino et al.,

2010b). Essa preferência apresenta um efeito de habituação espécie-dependente, não sendo relatada para o *Danio rerio*, mas sim no *Carassius auratus* (Brito et al., 2007). Dias et al. (2014) demonstrou a preferência do *Danio rerio* pelo lado escuro ao isolar grupos em ambientes com diferentes períodos de luminosidade. Ficou evidente também fator de arrastamento que o fotoperíodo ocasiona em grupos de *Zebrafish*, depois testá-los em diferentes períodos, em um aquário como o de Serra et al. (1999).

Objetivo

Comparar a eficiência de dois aparatos de isolamento em testes comportamentais utilizando o ciprinídeo *Danio rerio*, *Zebrafish*, e variáveis de luminosidade ambiental.

Material e métodos

Procedimento de Isolamento

Foram isolados, em cada aparato, 08 sujeitos (16 sujeitos no total), por sete dias, em dois diferentes aparatos. Cada um desses aparatos teve sua luminosidade controlada por temporizadores (*timers*) ligados a lâmpadas internas, num ciclo com 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12).

Aparatos

O aparato 1 foi construído com placas de MDF (aglomerado de alta densidade) de quinze milímetros, suas medidas são: 64,5 x 79,0 x 42,0 centímetros. É dividido em quatro compartimentos de 30,0 x 30,0 x 40,0 centímetros. Cada compartimento possui uma porta vedada duplamente com fita espuma autocolante de três milímetros, instaladas uma na beirada interna da porta e outra, na mesma posição, no aparato, o que garante a vedação luminosa completa do mesmo. Lâmpadas internas, em cada compartimento, ligadas a temporizadores (*timers*) garantem o controle do período luminoso. Orifícios dotados de ventoinhas (*coolers*)

retiram o ar quente de cada compartimento, independentemente, através de orifícios que não permitem a entrada ou saída de luz. Abaixo dos quatro compartimentos há uma gaveta de 61,0 x 12,0 x 40,0 centímetros com função de armazenamento de insumos. Na parte superior, o aparato possui um tampo de acrílico branco de cinco milímetros de espessura, 64,5 centímetros de comprimento e 42,0 centímetros de profundidade. Para aferição da temperatura, manutenção da aeração dos aquários de isolamento e alimentação sem abrir os compartimentos existe respectivamente termômetros com visor externo, bomba de ar e tubos com abertura externa.

O aparato 2 foi construído com placas de MDF (aglomerado de alta densidade) de seis milímetros. Suas medidas são: 60,0 x 30,0 x 40,0 centímetros (comprimento x profundidade x altura). Possui uma tampa com bordas internas, o que proporciona vedação luminosa completa ao mesmo, quando fechado. Uma lâmpada interna, ligada a um temporizador (*timer*) deverá controlar o fotoperíodo de cada um dos aparatos. Ventoinhas (*coolers*) retiram o ar quente através de orifícios não permitindo a entrada ou saída de luz. Para aferição da temperatura da água, manutenção da aeração dos aquários de isolamento e alimentação sem abrir os compartimentos (portanto sem afetar o fotoperíodo de cada aparato) foram instalados, respectivamente, termômetros com visor externo, bombas de ar e tubos com abertura externa (Figura 1).

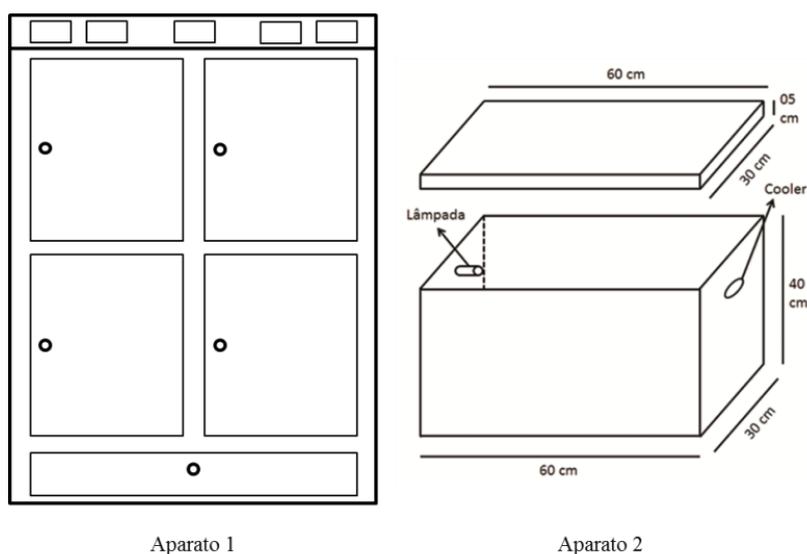


Figura 1 Esquemas simples mostrando a aparência externa dos aparatos 1 e 2.

Teste

Os sujeitos, um por vez, foram testados em um aquário teste branco/preto (45,0 x 15,0 x 10,0 centímetros), composto por uma metade completamente preta e a outra completamente branca, com um espaço central de cinco centímetros, delimitado por duas comportas removíveis. Ocorreu um tempo de cinco minutos (300 segundos) para habituação no espaço delimitado pelas comportas. Após este tempo as comportas foram removidas e o sujeito pôde explorar o aquário por quinze minutos (900 segundos). O tempo de permanência em cada lado do aquário, a primeira latência (tempo que o sujeito leva para ir ao lado oposto à primeira escolha) e o número de cruzamentos foram computados.

Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA de duas via com o programa BioStat 2009

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos, após análise (ANOVA de duas vias) comparando os aparatos, não apontou diferença estatisticamente significativa entre eles ($F(1, 28) = 0,000$, $p=1,000$), sem diferenças entre aparatos ($F(1, 28) = 0,000$, $p=1,000$) e sem interação $F(1,28)=1,620$, $p=0,214$. Os dados demonstram a mesma eficiência entre os aparatos (Figura 2).

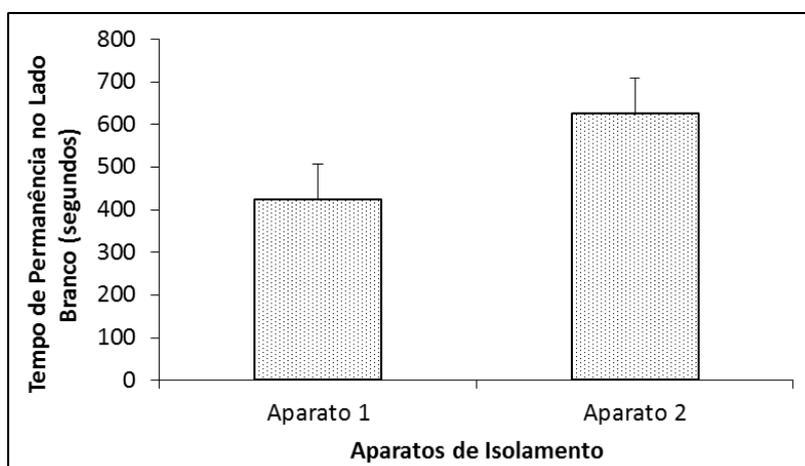


Figura 2 Comparação do tempo de permanência do lado branco do aquário teste para ambos os aparatos, sem diferença significativa (ANOVA $F(1, 28) = 0,000$, $p=1,000$).

Isso parece indicar que a espessura do material utilizado para a fabricação dos aparatos, suas dimensões, o tipo de isolamento, os tipos e o posicionamento dos exaustores (*coolers*), e o posicionamento da iluminação não afetam os testes comportamentais que derivam da manutenção dos sujeitos dentro deles.

Conclusão

Ambos os aparatos demonstraram ser igualmente eficazes na manutenção do *Zebrafish* para testes comportamentais com variável luminosa.

3.3 PREFERÊNCIA CLARO/ESCURO EM *Danio rerio*: EFEITOS DA MELATONINA SOBRE O HORÁRIO DA COLETA E REGIME DE LUZ

Resumo

O *Zebrafish* (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo, ciprinídeo, de hábitos diurnos e que vive em meio a plantações de arroz. A melatonina é uma molécula ubíqua, encontrada desde organismos simples como bactérias até organismos complexos como os mamíferos. O *Danio rerio* é um importante modelo utilizado para testes com arrastadores e ciclos circadianos. Quando testado em aquários branco/preto parece ser evidente a preferência do *Zebrafish* pelo lado escuro, indicando que o lado branco é aversivo. O objetivo deste trabalho é testar a influência da luminosidade e do período de coleta no comportamento de preferência claro/escuro em *Danio rerio* no aquário branco/preto e testar a influência de sete diferentes doses de melatonina na variação da resposta em *Zebrafish* submetidos ao teste claro-escuro, em ciclos circadianos manipulados. Os resultados mostram algumas inversões no tempo médio de permanência, nos lados do aquário branco/preto, em alguns grupos. O *Zebrafish* parece preferir permanecer mais tempo no lado branco do aquário quando isolado em fotoperíodo de 12/12 horas e testado em período noturno. Parece existir subpopulações dentro da mesma amostra, cronotipos, que responderiam diferentemente quando expostas à mesma concentração de melatonina. A melatonina parece influir na alteração causada pelo fotoperíodo, diminuindo ou anulando o arrastamento. Estudos com cepas específicas de *Zebrafish* e com um leque maior de concentrações de melatonina parecem ser necessários para identificar a possível dose específica para contrabalancear a atuação luminosa no arrastamento do ciclo circadiano em *Danio rerio*.

Palavras-chave: Melatonina, preferência claro/escuro, *Danio rerio*, *Zebrafish*, cronotipos.

Abstract

The *Zebrafish* is a teleost fish, cyprinid, diurnal and lives amidst the rice paddies. Melatonin is a ubiquitous molecule found from simple organisms like bacteria to complex organisms like mammals. *Danio rerio* is an important model used for testing with *zeitgebers* and circadian cycles. When tested in white / black tanks seems evident *Zebrafish* preference the dark side, indicating that the white side is aversive. The aim of this work is to test the influence of light and the collection period in behavior preference light / dark *Danio rerio* in the white / black tank, and test the influence of seven different doses of melatonin in response variation in *Zebrafish* submitted to light / dark test in circadian cycles manipulated. The results show some reversals in the mean residence time, the sides of the aquarium white / black in some groups. The *Zebrafish* seems to prefer to stay longer on the white side of the aquarium when isolated in a photoperiod of 12/12 hours and tested at nighttime. There seems subpopulation within the same sample, chronotypes, which respond differently when exposed to the same concentration of melatonin. Melatonin appears to influence the change caused by photoperiod, decreasing or canceling the dragging. Studies with specific strains of *Zebrafish* and with a wider range of concentrations of melatonin appear to be necessary to identify the specific dosage possible to counteract the performance in light entrainment of the circadian cycle in *Danio rerio*.

Keywords: Melatonin, preference light / dark, *Danio rerio*, *Zebrafish*, chronotypes.

1 Introdução

O *Danio rerio* é um peixe teleósteo, ciprinídeo, de hábitos diurnos, oriundo do delta do rio Ganges, Índia subcontinental (próximo ao Trópico de Câncer), onívoro e que vive em meio a plantações de arroz (Spence et al., 2008).

Os seres vivos conseguem adaptar processos fisiológicos de acordo com o tempo e com o ambiente, tais como ciclos reprodutivos, respiração e transmissão elétrica no sistema nervoso (Barrera-Mera, 2012; Dias, 2010; Lahiri et al., 2005). Esse ritmo biológico interno é associado à luminosidade/escuridão do ambiente. A periodicidade da luz ambiental a torna um sinal externo para a fisiologia do ser vivo se adaptar às 24 horas de um dia (ritmo circadiano) (Cymborowski, 2010; Neves et al., 2000; Pereira et al., 2009). Os sinais externos (arrastadores ou Zeitgebers) facilitam a homeostase reativa do ser vivo, mudanças fisiológicas adaptativas que permitem maior chance de sobrevivência (Baldomero, 2011; Cavallari et al., 2011; Cymborowski, 2010; Sousa et al., 2008).

O ritmo biológico interno e o processo fisiológico ocorrem também de forma independente ao meio ambiente (livre-curso) (P. Li et al., 2005). Isso permite que haja uma homeostase preditiva, onde o ser vivo é capaz de antecipar funções biológicas adaptativas, como alterações de temperatura ou luminosidade (Baldomero, 2011; Dias, 2010; Sousa et al., 2008).

A sinalização externa necessita de recepção nervosa para que a parte responsável pelo processamento da informação (relógio endógeno) seja estimulada. Informado, o sistema utiliza vias de saída nervosas para demandar variações fisiológicas e comportamentais nos seres vivos. Em organismos multicelulares existe um relógio endógeno central, localizado no cérebro, e interligado a relógios endógenos periféricos que são responsáveis pelo trâmite destas informações externas e das respostas nervosas (Cymborowski, 2010).

Em peixes, como o *Zebrafish*, *Danio rerio*, os relógios periféricos possuem seus próprios fotorreceptores, que mantêm algum grau de dependência do relógio central (glândula pineal) (Cymborowski, 2010). Algumas variações fisiológicas e comportamentais influenciadas pelos fotoperíodos externos são: atividade locomotora, comportamento de formação de cardumes, pigmentação da pele, ingestão de alimento, consumo de oxigênio e preferência térmica (Falcón et al., 2011).

O *Zebrafish* é um importante modelo utilizado para testes com arrastadores e ciclos circadianos, pois tem desenvolvimento precoce da glândula pineal (ainda no embrião), localizada no cérebro. Ela contém células com capacidade fotorreceptora que controlam a produção de melatonina, molécula que parece ser o principal efetor bioquímico das vias de saída dos relógios biológicos, mediante a luminosidade ambiental. Além da glândula pineal, o *Zebrafish* exibe capacidade de produzir esta indolamina em outros tecidos corporais, o que permite que seja usado como modelo para testes com melatonina exógena (Ben-Moshe et al., 2014a; Cymborowski, 2010; Laura et al., 2012; X. Li et al., 2012; Lima-Cabello et al., 2014; Rocha et al., 2011). A luz parece desempenhar um importante papel incitando o oscilador circadiano da glândula pineal a gerar picos de produção de melatonina (Borsetti et al., 2011).

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina) é uma molécula ubíqua, encontrada desde organismos simples como bactérias até organismos complexos como os mamíferos (Tan et al., 2010; Turk et al., 2014). Ela parece ser a principal via condutora da informação rítmica do SNC ao organismo (Falcón et al., 2010b). Essa indolamina é produzida pela glândula pineal sobre influência do Núcleo Supraquiasmático (NSQ), do Sistema Nervoso Central (SNC) (Detanico, 2010).

A secreção de melatonina se inicia a noite e atinge seu nível mais alto na madrugada, sendo inibida pela luminosidade (Akosman et al., 2013; Veras et al., 2013). A molécula circula no plasma e no líquido encefalorraquidiano em concentração (Benítez-King et al., 2013) e é capaz de passar rapidamente pelas membranas celulares, atravessando com facilidade a barreira hemato-encefálica (Ferreira et al., 2010; Zhang et al., 2013).

A administração de melatonina é capaz de inibir a ativação de células de defesa cerebrais (micróglia) e diminuir a produção de substâncias que ativam a inflamação (citocinas) em modelos de neuroinflamação em ratos (Benítez-King et al., 2013). Essa indolamina funciona como antioxidante em peixes, pois é muito eletroreativa, atuando como potente doadora de elétrons e estimulando a atividade enzimática interna que reduzem espécies reativas de oxigênio reduzindo o dano causado pela oxidação. Também é capaz de diminuir o estresse influenciando a reprodução. Em tilápias a mudança de fotoperíodo é capaz de diminuir a queda da sua produtividade em cativeiro (Dias et al., 2013).

A melatonina participa de vários processos fisiológicos e neuronais (Arruda, 2013; Huang et al., 2013), tendo influências sistêmicas no ajuste do

desenvolvimento sexual, na produção de estrogênio pelas gônadas, no ciclo circadiano sono-vigília e atuando na atividade antioxidante (Akosman et al., 2013; Fusatto, 2012; Vidor, 2010).

O *Zebrafish* é amplamente utilizado em testes comportamentais) em aquários branco/preto, possuindo um protocolo para específico para tal, que permite a testagem de drogas e estudos circadianos(Maximino et al., 2010c).

Três grupos de *Zebrafish* testados em três aquários, cada um com o ambiente interno diferenciado (vazio, com objetos no lado esquerdo do aquário, ou com luz estroboscópica do lado esquerdo do aquário), apresentaram preferência pelo lado do aquário que continha objetos e uma tendência a evitar o lado do aquário iluminado (Mesquita, Godinho, Azevedo, & Young, 2008).

A atividade do *Zebrafish* foi medida em função da quantidade de luz do ambiente. Mantidos em um ciclo de doze horas de luminosidade por doze horas de escuridão, a maioria demonstra atividade locomotora durante a fase clara do ciclo. Quando mantidos em ambientes totalmente iluminados ou totalmente escuros demonstraram uma queda nessa locomoção, indicando uma regulação luminosa (circadiana) para essa atividade (Hurd, Debruyne, Straume, & Cahill, 1998).

O *Zebrafish* apresenta um padrão de secreção de melatonina noturno, por ter hábitos de atividade diurna. Seu período de repouso se assemelha ao padrão comportamental de sono nos mamíferos, incluindo diminuição de sensibilidade a estímulos do sistema sensorial. Este período de repouso noturno é regulado pelo sistema circadiano, e nele ocorre o aumento do tempo de percepção e a diminuição da atividade locomotora (Lima-Cabello et al., 2014; Paciorek & McRobert, 2012). Segundo Irina V. Zhdanova (2011) peixes diurnos como o *Zebrafish* respondem à produção de melatonina com diminuição de atividade.

Embriões e larvas de *Zebrafish* mantidos em um ambiente de 14 horas de luminosidade por 10 horas de escuridão produzem o hormônio melatonina 48 horas após a formação do zigoto. Mudando os embriões para ambientes com maior tempo de escuridão verificou-se que a síntese do hormônio ocorre entre 20 e 26 horas após a formação do zigoto. Como nessa fase os fotorreceptores da glândula pineal já existem e os da retina não, o controle da produção da melatonina baseada na luminosidade, nesse ponto do desenvolvimento, parece ser glandular (Kazimi & Cahill, 1999).

Estima-se que haja uma ligação entre estímulo luminoso, expressão do gene e melatonina durante o desenvolvimento (Borsetti et al., 2011). O tratamento com melatonina também seria capaz de alterar a expressão de alguns neuropeptídeos cerebrais no *Zebrafish* (Conde-Sieira et al., 2014). A produção de melatonina estaria ligada à luminosidade do ambiente. Alterações nesta luminosidade influenciariam a produção do neurohormônio que conseqüentemente afetaria a homeostase comportamental. Larvas de *Zebrafish* tem sua atividade locomotora diminuída quando expostas ao período noturno, com maior produção de melatonina (Vatine et al., 2011).

Em um trabalho anterior Dias (2010), demonstrou que a preferência do *Zebrafish* adulto pelo lado escuro é dependente do fotoperíodo. Grupos isolados em ambientes com diferentes períodos de luminosidade parecem demonstrar um fator de arrastamento que o fotoperíodo ocasiona, quando testados em diferentes luminosidades e períodos do dia, em um aquário branco/preto.

O teste de preferência por escuridão (escototaxia foi descrito em 1999) (Serra et al., 1999) e posteriormente padronizado (Maximino et al., 2010c) e validado farmacologicamente (Maximino et al., 2010b; Maximino & Herculano, 2010; Maximino, Silva, Gouveia Jr, & Herculano, 2011). Ele consiste de um único teste de exposição de 15 min a um aquário branco e preto, precedido de um período de habituação ao ambiente em uma área de contenção inicial com portas removíveis. O tempo de início para a exploração (primeira latência), o tempo de permanência em cada ambiente (claro e escuro) e o número de cruzamentos são as medidas mais comuns no teste. Os autores que padronizaram o aparato consideram que estas podem ser respectivamente medidas de impulsividade ou coragem (exposição a ambiente novo, inversamente correlacionada), ansiedade (aversão ao branco, inversamente correlacionada) e atividade motora (diretamente correlacionada)(Gouveia Jr et al., 2005; Maximino et al., 2010c).

2 Objetivos

- 1) Testar a influência da luminosidade e do período de coleta no comportamento de preferência claro/escuro em *Danio rerio* no aquário branco/preto.

- 2) Testar a influência de sete diferentes doses de melatonina na variação da resposta em *Zebrafish* submetidos ao teste claro-escuro, em ciclos circadianos manipulados.

3 Material e métodos

3.1 Experimento 1

3.1.1 Sujeitos

Foram isolados 60 sujeitos (12 em cada aparato), (*Danio rerio*) adultos, de sexos indeterminados, experimentalmente ingênuos, provenientes de pet .shops locais. Os sujeitos foram alimentados com ração própria (*TetraMin Tropical Crisps*, *Tetra GmbH*, 49324 Meile Alemanha). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurociências e Comportamento II do Núcleo de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal do Amapá.

3.1.2 Fotoperíodos

Foram utilizados cinco aparatos de isolamento com cinco fotoperíodos diferentes: 14 horas de luminosidade por 10 horas de escuro total (denominado 14/10); 10 horas de luminosidade por 14 horas de escuro total (denominado 10/14); 24 horas de escuro total (denominado 00/24); 24 horas de luminosidade total (denominado 24/00); e 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12).

3.1.3 Aparato de isolamento

O aparato é composto por placas de MDF (aglomerado de alta densidade) de seis milímetros. Suas medidas são: 60,0 x 30,0 x 40,0 centímetros (comprimento x profundidade x altura). Possui uma tampa com bordas internas, o que proporciona vedação luminosa completa ao mesmo, quando fechado. Uma lâmpada interna, ligada a um temporizador (*timer*) controla o fotoperíodo de cada um dos aparatos. Ventoinhas (*coolers*) retiram o ar quente através de orifícios não permitindo a

entrada ou saída de luz. Para aferição da temperatura da água, manutenção da aeração dos aquários de isolamento e alimentação sem abrir os compartimentos (portanto sem afetar o fotoperíodo de cada aparato) foram instalados, respectivamente, termômetros com visor externo, bombas de ar e tubos com abertura externa.

3.1.4 Aquários

Os aquários de manutenção dos peixes possuíam 47,0 x 30,0 x 30,0 centímetros (comprimento x altura x profundidade) e se destinavam a abrigar os peixes ingênuos. Os aquários de isolamento possuía 40,0 x 25,0 x 23,0 (comprimento x altura x profundidade) e se destinava a abrigar os sujeitos dentro do aparato de isolamento.

O aquário de teste era branco/preto (45,0 x 15,0 x 10,0 centímetros / comprimento x altura x profundidade), composto por uma metade completamente preta e a outra completamente branca, com um espaço central de cinco centímetros, delimitado por duas comportas removíveis, com cinco centímetros de água do aquário de manutenção.

3.1.5 Teste

Os testes foram realizados em períodos do dia, divididos da seguinte forma: Manhã (06:00 – 12:00 horas); Tarde (12:00 – 18:00 horas); Noite (18:00 – 24:00 horas); e Madrugada (24:00 – 06:00 horas) . Os sujeitos, um por vez, foram testados no aquário teste . Ocorreu um tempo de cinco minutos (300 segundos) para habituação no espaço delimitado pelas comportas. Após este tempo as comportas foram removidas e o sujeito pôde explorar o aquário por quinze minutos (900 segundos). O tempo de permanência, o número de alternâncias e a primeira latência (tempo que o sujeito leva para passar pela primeira vez para o lado oposto da primeira escolha) em cada lado do aquário foram computados. O Ciclo de luz utilizado no teste foi o mesmo do aparato de isolamento.

3.1.6 Estatística

Os dados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via, com pós-teste Tukey, utilizando o programa Sigma Stat 3.1, considerando-se como significativos quando $p \leq 0,05$.

3.2 Experimento 2

3.2.1 Sujeitos

Foram isolados 10 sujeitos, (*Danio rerio*) de características similares ao do experimento anterior e igualmente mantidos.

3.2.2 Fotoperíodos

Foi utilizado um aparato de isolamento com um fotoperíodo de 12 horas de luminosidade por 12 horas de escuro total (denominado 12/12).

3.2.3 Aparato de isolamento

O aparato utilizado é idêntico ao do Experimento 1.

3.2.4 Aquários

Os aquários utilizados são idênticos aos do Experimento 1

3.2.5 Teste

Os testes foram realizados no período da Noite (18:00 – 24:00 horas. em aparato igual e de forma similar que o experimento anterior. .

3.2.6 Estatística

Foram utilizados o mesmo programa e os mesmos testes do Experimento 1.

3.3 Experimento 3

3.3.1 Sujeitos

Foram isolados 112 sujeitos (14 em cada grupo), (*Danio rerio*) de características similares ao do experimento anterior e mantidos da mesma forma (Figura 1).

3.3.2 Fotoperíodos

O mesmo do experimento anterior.

3.3.3 Aparato de isolamento

O aparato utilizado é idêntico ao do Experimento 1.

3.3.4 Aquários

Os aquários utilizados são idênticos aos do Experimento 1

3.3.5 Preparação da solução de melatonina

Foi preparada uma solução mãe de melatonina (1mg) (*KAL, Park City, UT 84060, USA*) em água destilada (431ml) com concentração de 10000 nanomolar (nM), preparada e mantida sem presença de luz.

3.3.6 Regime de exposição à melatonina

Os sujeitos foram expostos à droga após o período de isolamento de sete dias em aparato próprio. A exposição dos sujeitos ocorreu individualmente por vinte minutos, em 30 ml de água do aquário de manutenção, em sete concentrações diferentes de melatonina (25nM, 50nM, 100nM, 125nM, 150nM, 175nM e 200nM),

antes do teste no aquário branco/preto, em recipiente próprio, sem luminosidade. O grupo controle foi exposto aos mesmos vinte minutos em recipiente semelhante, porém sem melatonina (0nM). Posteriormente à exposição, ambos foram testados no aquário branco/preto.

3.3.7 Teste

Os testes foram realizados no período da Noite (18:00 – 24:00 horas). O mesmo aquário teste e procedimentos utilizados no Experimento 1 foram repetidos.

3.3.8 Estatística

Foram utilizados o mesmo programa e os mesmos testes do Experimento 1.

3.3.8.1 Análises

Para as análises a amostra foi utilizada de dois modos: a) utilizou-se a amostra total de sujeitos (n=14); b) utilizou-se uma parte da amostra total de sujeitos (n=12), em ordem crescente, desprezando-se os extremos maiores e menores valores de tempo gasto no branco em cada dose de exposição de melatonina, subdividida em 3 grupos (3 quartis), cada quartil contendo o resultado de 4 sujeitos.

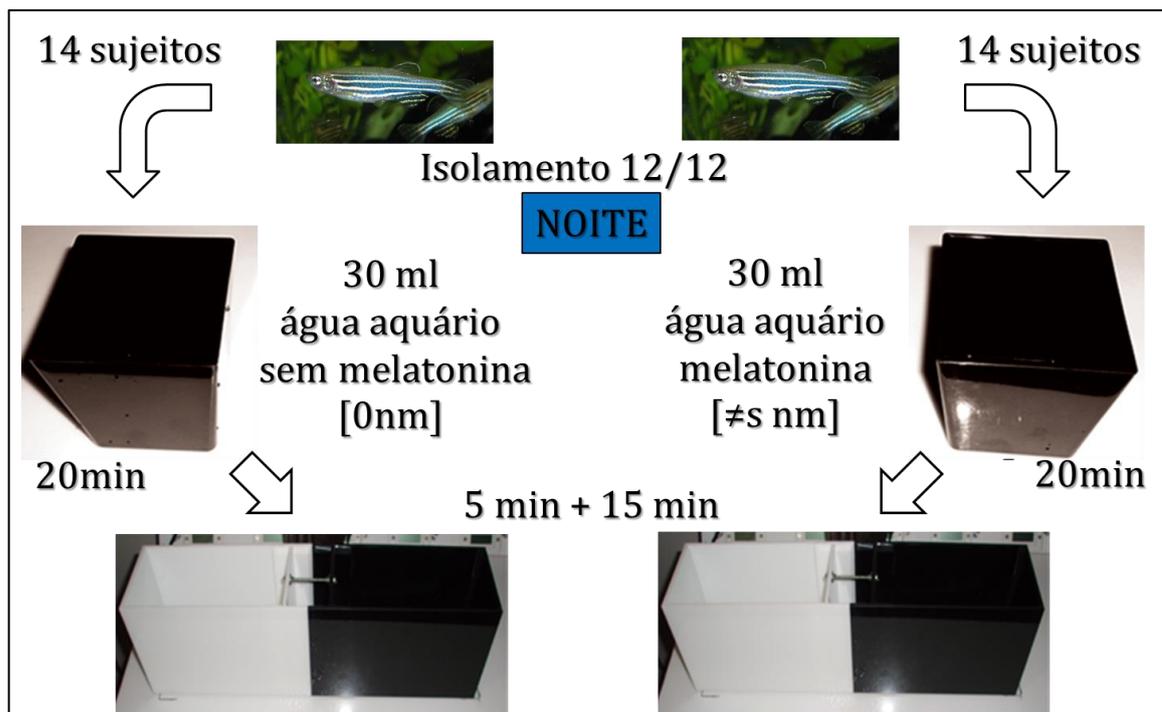


Figura 1 Esquemaização do método utilizado.

4 Resultados

Experimento 1

Os resultados demonstram comparativamente algumas inversões no tempo médio de permanência, nos lados do aquário branco/preto, nos grupos 00/24 Madrugada; 12/12 Tarde; 24/00 Tarde; 12/12 Noite; 14/10 Noite; 24/00 Noite. A estatística realizada, considerando dentro de todos os grupos ou entre todos os grupos, não mostra diferença significativa ($F(20,11)=0,0212$, $p=1,000$) (Anexo A).

Experimento 2

A Figura 2 mostra o gráfico com a diferença entre o tempo de permanência do *Zebrafish* no lado branco e no lado preto do aquário teste, quando mantidos em fotoperíodo de 12/12 horas (12 horas de luminosidade por 12 horas de escuridão) e testados no período noturno (18:00 às 24:00). Houve uma permanência maior do lado branco, estatisticamente significativa (ANOVA $F(18,1)=9,4199$, $p=0,0066$).

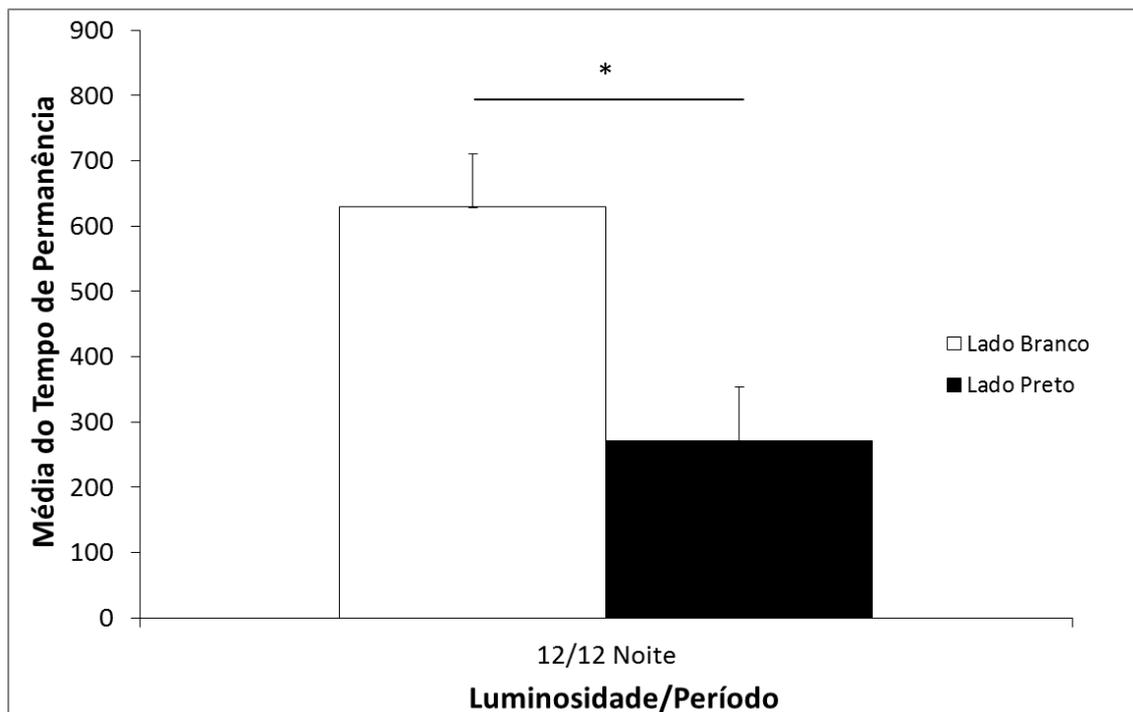


Figura 2 O gráfico demonstra a média do tempo de permanência (em segundos) dos sujeitos nos lados do aquário teste, com diferença estatisticamente significativa (*) (ANOVA $F(18,1)=9,4199$, $p=0,0066$) entre eles.

Experimento 3

A figura 3 mostra a comparação realizada entre os tempos médios de permanência nos lados do aquário teste, nas doses controle e de melatonina. Ocorre inversão no tempo médio de permanência desde a dose 50nM até a dose 175nM, considerando o padrão de maior permanência no lado branco, que ocorre no período noturno e fotoperíodo 12/12 horas (12 horas de luminosidade por 12 horas de escuridão). A estatística realizada considerando o tempo de permanência dentro das doses ou entre todas as doses não mostra diferença significativa ($F(104, 7)=1,2736$, $p=0,2736$).

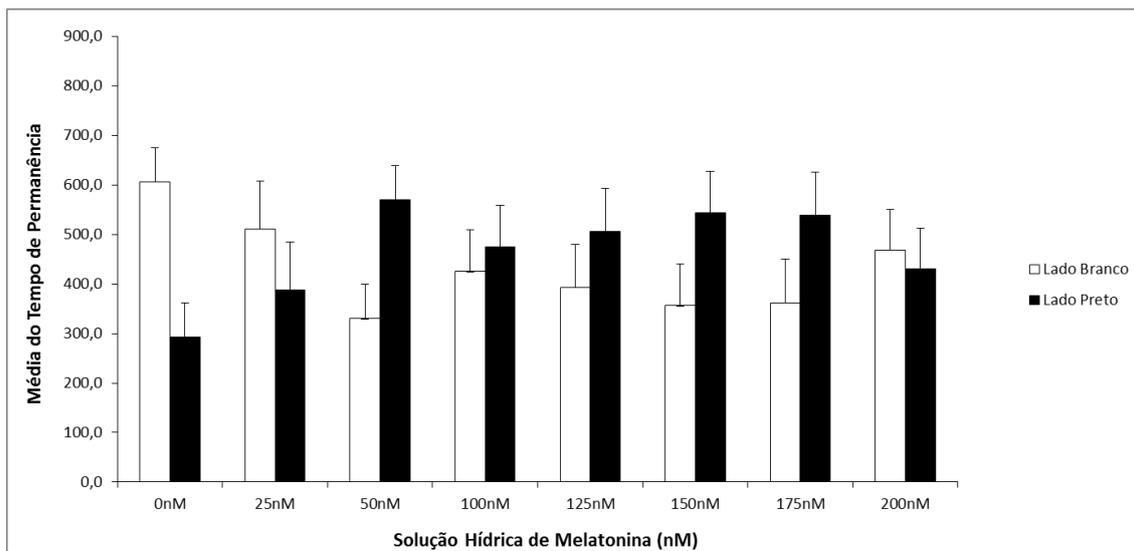


Figura 3 Gráfico mostrando as diferenças entre os lados branco e preto do aquário teste pelas doses (controle e de melatonina) pelo tempo (em segundos) , estatisticamente não significantes (ANOVA $F(104, 7)=1,2736$, $p=0,2736$).

A comparação entre as médias de tempo de permanência do lado branco do aquário teste (Figura 4) aponta para uma diferença estatística significativa (ANOVA $F(7,72)=10$, $p<0,001$). O pos teste (Tukey) indica diferença entre as doses de exposição à melatonina e a dose controle (0nM), e entre algumas das doses de melatonina entre si. Todas as doses são diferentes estatisticamente da dose 0nM, exceto a dose 25nM (Tabela 1).

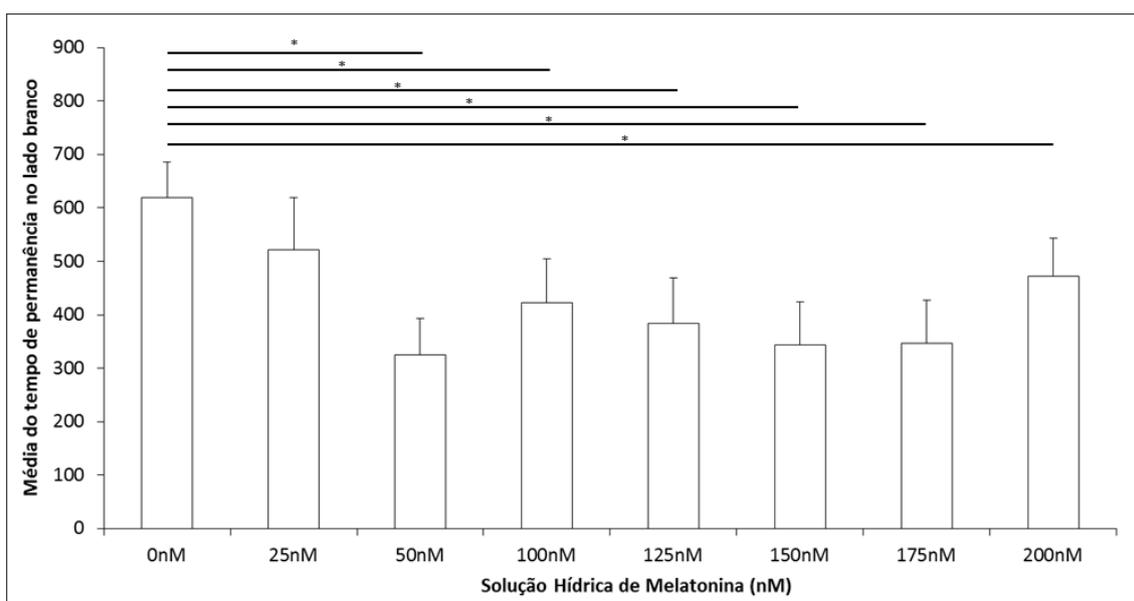


Figura 4 Gráfico mostrando as médias de tempo de permanência (em segundos) no lado branco do aquário teste pelas doses controle e de melatonina, estatisticamente significantes (*) (Dados Tabela 1).

Tabela 1 Diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,005$) entre as doses de melatonina em relação ao tempo médio de permanência no lado branco.

Dose	F(7,72)=10, $p < 0,001$
Tukey	0nMx50nM $p < 0,001$
	0nMx100nM $p < 0,001$
	0nMx125nM $p < 0,001$
	0nMx150nM $p < 0,001$
	0nMx175nM $p < 0,001$
	0nMx200nM $p = 0,026$
	25nMx50nM $p < 0,001$
	25nMx125nM $p = 0,048$
	25nMx150nM $p = 0,003$
	25nMx175nM $p = 0,004$
	200nMx50nM $p = 0,028$

A comparação entre os três quartis (A, B e C) de cada dose de melatonina evidencia a provável existência de três subpopulações de sujeitos testados em período noturno e fotoperíodo 12/12 horas (12 horas de luminosidade por 12 horas de escuridão), no grupo controle (0nM) e em diferentes doses de melatonina (Figura 5) no critério de tempo de permanência no branco.

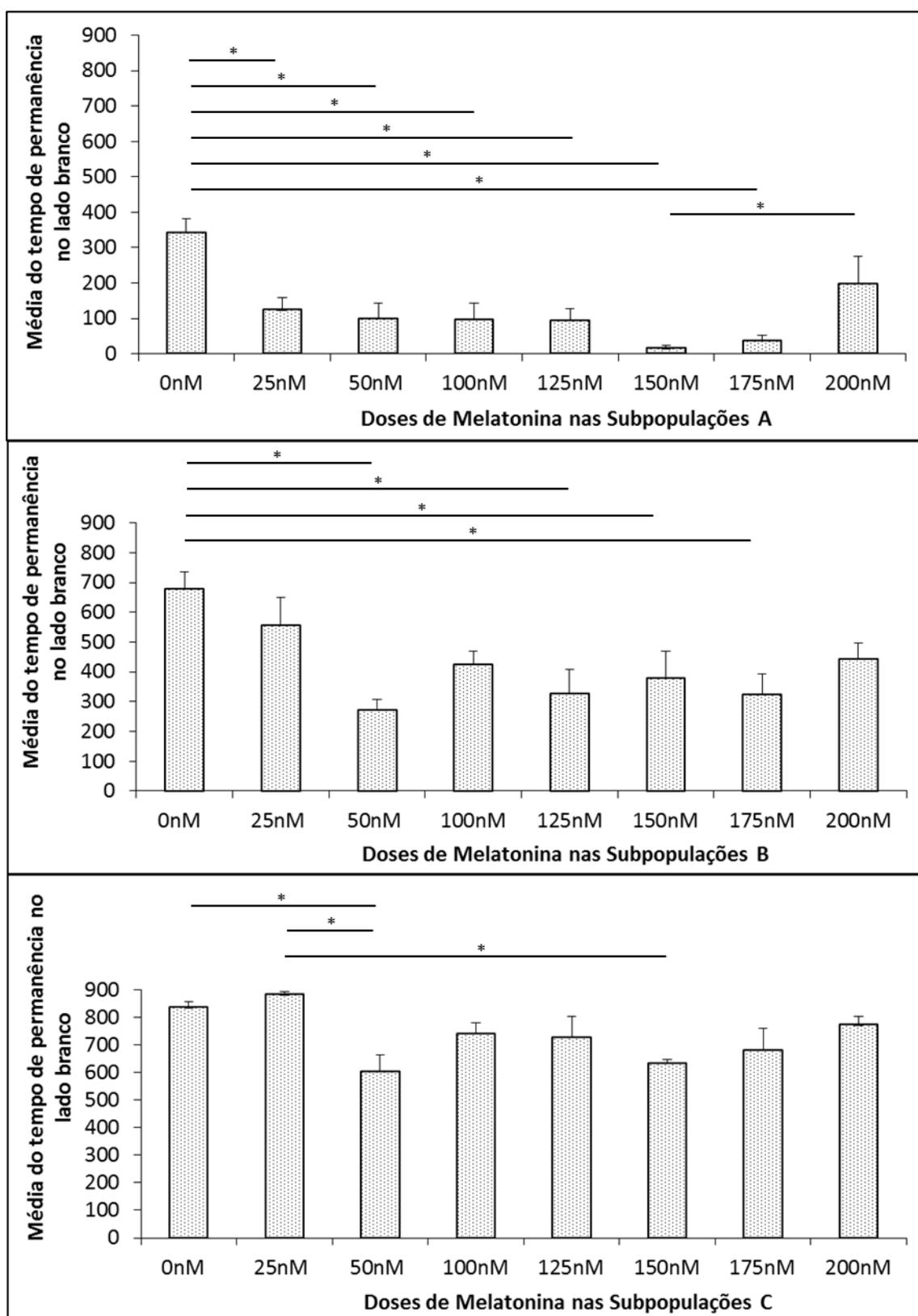


Figura 5 Os gráficos mostram comparação entre as doses de exposição de melatonina nas subpopulações (quartis) A, B e C, pelo tempo (em segundos). Existe diferença estatística entre subpopulações (quartis ou subgrupos) e entre algumas doses (*) (Dados Tabela 2).

A figura 6 mostra a comparação das subpopulações (quartis ou subgrupos) A, B e C em cada dose de melatonina no tempo de permanência no branco. Existe diferença estatística entre algumas doses. Na subpopulação (quartil ou subgrupo) A, há diferença significativa entre os sujeitos expostos à dose 0nM comparadas a todas as outras doses, exceto à dose 200nM. Os dados mostram também uma diferença estatística entre os sujeitos expostos à dose de 150nM quando comparados aos expostos às doses 200nM. Na comparação entre os sujeitos da subpopulação B, há diferença significativa entre os sujeitos expostos à dose 0nM em relação à todas as outras doses, exceto às doses 25nM, 100nM e 200nM. Na subpopulação C, há diferença significativa entre os sujeitos expostos à dose 0nM comparada a dose 50nM; 25nM comparada a dose 50nM; e 25nM comparada a dose 150nM (Tabela 2).

Tabela 2 Diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,005$) entre as subpopulações (quartis ou subgrupos) e entre as doses de melatonina em cada subpopulação.

Subgrupos	Entre Grupos	Tukey
A	$F(24,7)=6,0286, P=0,0004$	0nM x 25nM $p=0,0209$ 0nM x 50nM $p=0,0089$ 0nM x 100nM $p=0,0042$ 0nM x 125nM $p=0,0041$ 0nM x 150nM $p=0,0002$ 0nM x 175nM $p=0,0005$ 150nM x 200nM $p=0,0478$
B	$F(24,7)=4,0012, P=0,0049$	0nM x 50nM $p=0,0055$ 0nM x 125nM $p=0,0124$ 0nM x 150nM $p=0,0213$ 0nM x 175nM $p=0,0084$
C	$F(24,7)=3,8952, P=0,0049$	0nM x 50nM $p=0,0428$ 25nM x 150nM $p=0,0156$ 25nM x 50nM $p=0,0046$

A Figura 5 mostra subpopulações (quartis ou subgrupos) comparados dentro de cada dose de exposição de melatonina. A estatística mostra diferença significativa entre as doses e diferença significativa entre as subpopulações (Tabela 3), excetuando-se entre as subpopulações A e B da dose 50nM; e entre as subpopulações A e B da dose 125nM.

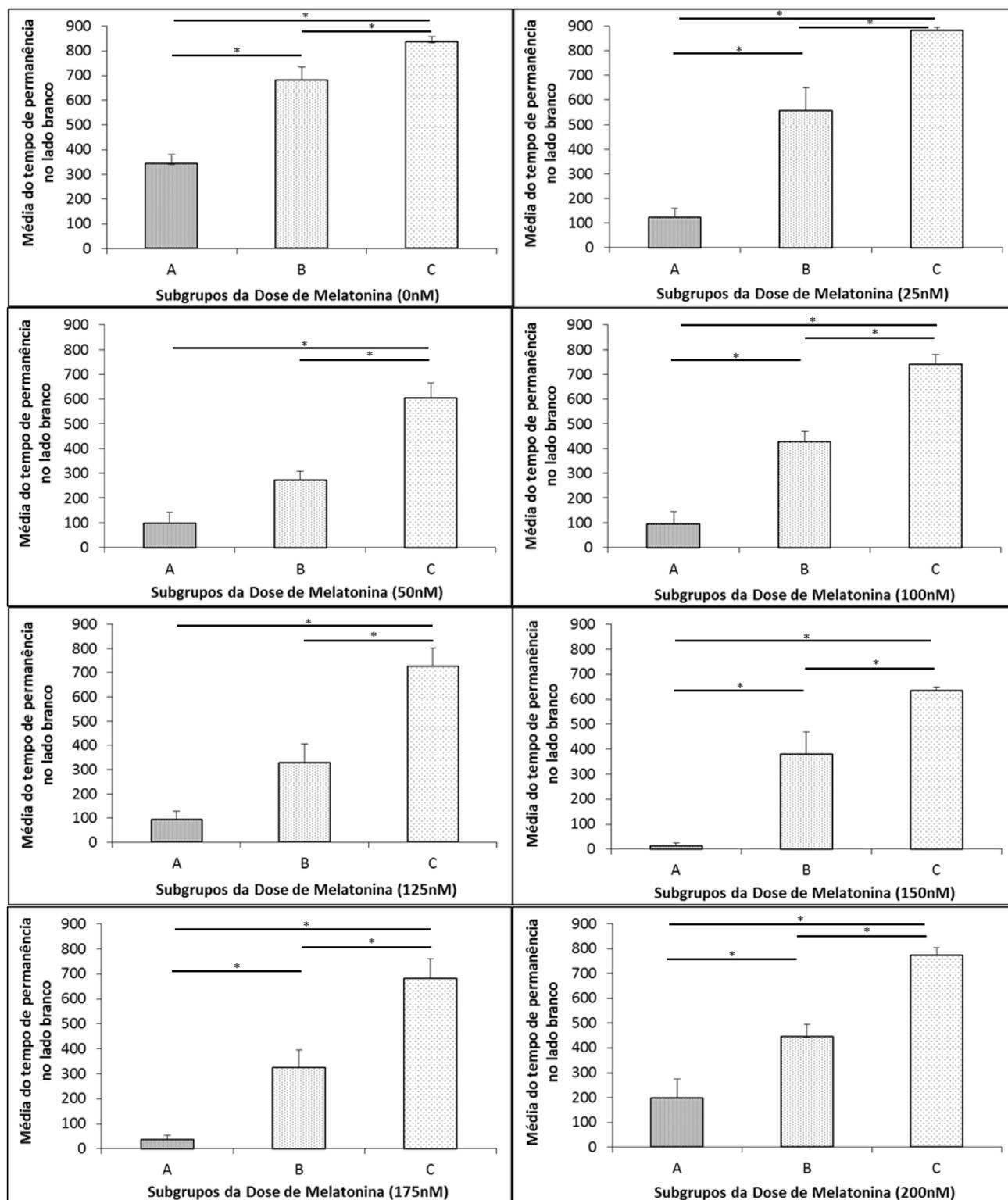


Figura 6 Os gráficos mostram a média do tempo de permanência (em segundos) no lado branco do aquário teste três subpopulações dentro de cada dose de melatonina. Existe diferença estatística significativa entre as doses e diferença significativa entre as subpopulações (quartis ou subgrupos) (*) (Dados Tabela 3).

Tabela 3 Diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,005$) entre as doses de exposição de melatonina e entre as subpopulações (quartis ou subgrupos) de em cada dose.

Doses	Entre Grupos	Tukey
0Nm	F(9,2)=39,5593, $p=0,0000$	A x B $p=0,0005$ A x C $p=0,0001$ B x C $p=0,0391$
25nM	F(9,2)=44,2945, $p=0,0000$	A x B $p=0,0009$ A x C $p=0,0001$ B x C $p=0,0053$
50nM	F(9,2)=29,2461, $p=0,0001$	A x C $p=0,0002$ B x C $p=0,0015$
100nM	F(9,2)=55,6254, $p=0,0000$	A x B $p=0,0008$ A x C $p=0,0001$ B x C $p=0,0012$
125nM	F(9,2)=23,6732, $p=0,0003$	A x C $p=0,0003$ B x C $p=0,0036$
150nM	F(9,2)=34,2214, $p=0,0001$	A x B $p=0,0017$ A x C $p=0,0001$ B x C $p=0,0141$
175nM	F(9,2)=27,4038, $p=0,0001$	A x B $p=0,0161$ A x C $p=0,0002$ B x C $p=0,0049$
200nM	F(9,2)=26,0384, $p=0,0002$	A x B $p=0,0318$ A x C $p=0,0002$ B x C $p=0,0068$

A alternância apresenta diferença estatística entre as doses de exposição de melatonina (ANOVA $F(7,72)=14$, $p < 0,001$); entre as subpopulações (quartis ou subgrupos) (ANOVA $F(2,72)=210$, $p < 0,001$); e na comparação entre subpopulações e doses (ANOVA $F(14,72)=2$, $p=0,002$). O gráfico 7 mostra a comparação da média das alternâncias das subpopulações (quartis ou subgrupos) A, B e C em cada dose de melatonina. As doses 125nM ($p < 0,001$) e 200nM ($p < 0,001$) da subpopulação C apresentam diferenças significativas quando comparadas com a dose controle (0nM). As demais doses das subpopulações A, B e C não apresentam diferenças significativas quando comparadas com a dose 0nM. Quando comparadas entre si, dentro de cada dose, todas as três subpopulações apresentam diferenças estatísticas significativas, exceto a comparação entre as subpopulações A e B dentro das doses 100nM, 150nM e 175nM (Tabela 4).

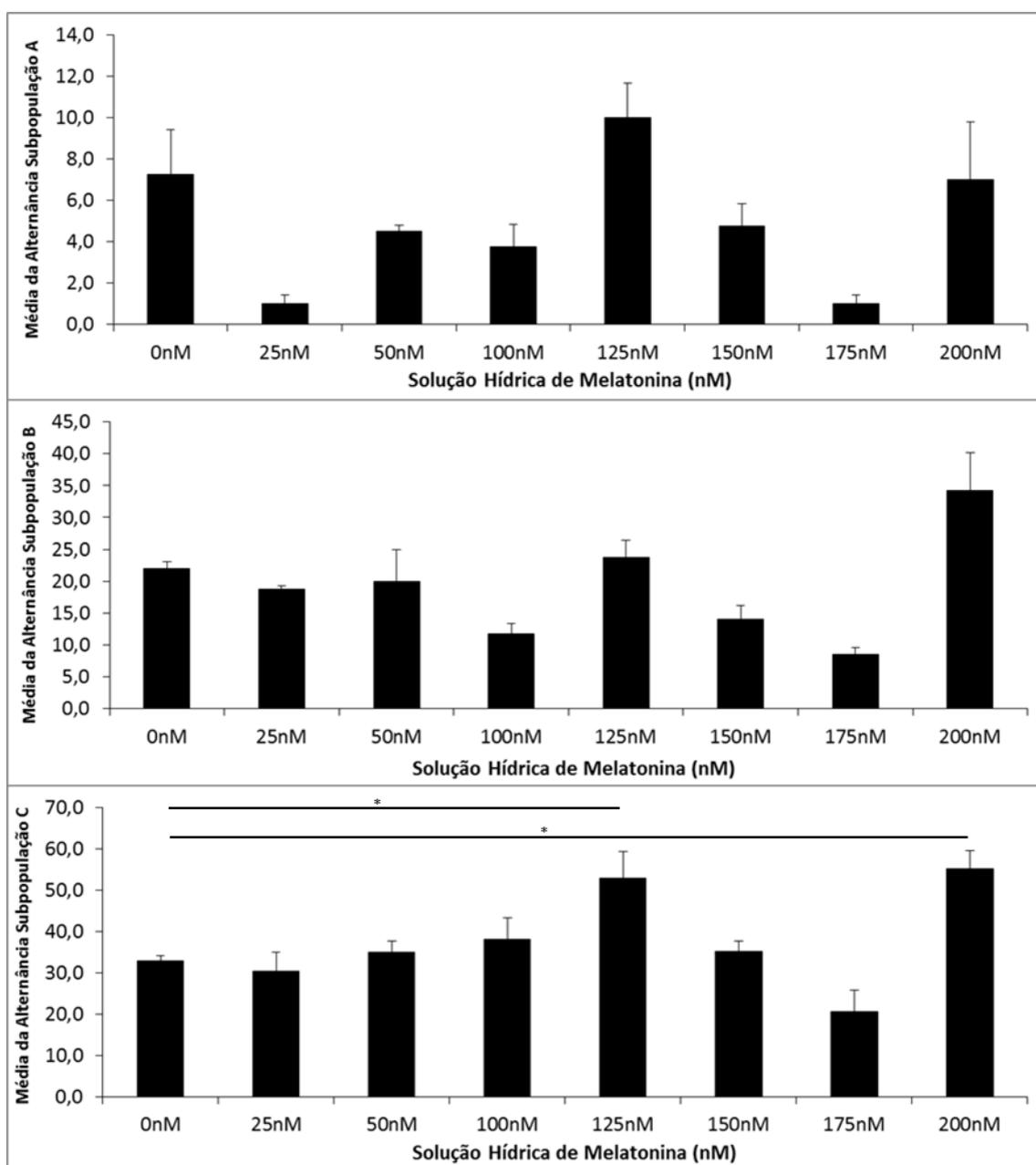


Figura 7 Os gráficos mostram a comparação da média das alternâncias das subpopulações (quartis) A, B e C em cada grupo (dose) de melatonina. Existe diferença estatística entre as doses de exposição de melatonina dentro das subpopulações (subgrupos ou quartis) (Dados Tabela 4). Demonstrando a diferença significativa entre as doses 0nM e 125nM ($p < 0,001$) e entre as doses 0nM e 200nM ($p < 0,001$) na subpopulação C (*).

Tabela 4 Diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,005$) relativas às alternâncias entre as doses de melatonina; entre as subpopulações (subgrupos ou quartis); entre as subpopulações e as doses de exposição de melatonina.

Subgrupos	F(2,72)=210, $p < 0,001$				
Dose	F(7,72)=14, $p < 0,001$				
Subgrupo x Dose	F(14,72)=2, $p = 0,002$				
Tukey	Subgrupos	Entre as doses	Doses	Entre os subgrupos	
	B	200nMx175nM $p < 0,001$ 200nMx150nM $p < 0,001$ 200nMx100nM $p < 0,001$ 200nMx50nM $p = 0,046$ 200nMx25nM $p = 0,021$ 125nMx175nM $p = 0,025$		0nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p = 0,046$ B x A $p = 0,005$
				25nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p = 0,003$ B x A $p < 0,001$
				50nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p = 0,004$ B x A $p = 0,003$
				100nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p < 0,001$
				125nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p < 0,001$ B x A $p = 0,009$
				150nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p < 0,001$
	C	200nMx175nM $p < 0,001$ 200nMx150nM $p < 0,001$ 200nMx100nM $p = 0,008$ 200nMx50nM $p < 0,001$ 200nMx25nM $p < 0,001$ 200nmx0nM $p < 0,001$ 150nMx175nM $p = 0,04$ 125nMx175nM $p < 0,001$ 125nMx150nM $p = 0,005$ 125nMx100nM $p = 0,034$ 125nMx50nM $p = 0,004$ 125nMx25nM $p < 0,001$ 125nMx0nM $p < 0,001$ 100nMx175nM $p = 0,006$ 50nMx175nM $p = 0,046$		175nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p = 0,023$
				200nM	C x A $p < 0,001$ C x B $p < 0,001$ B x A $p < 0,001$

A latência apresenta diferença estatística entre as doses de exposição de melatonina (ANOVA $F(7,72)=4$, $p < 0,001$); entre as subpopulações (quartis ou subgrupos) (ANOVA $F(2,72)=99$, $p < 0,001$); e na comparação entre subpopulações e doses (ANOVA $F(14,72)=2$, $p = 0,002$). O gráfico 8 mostra a comparação da média das alternâncias das subpopulações (quartis ou subgrupos) A, B e C em cada dose de melatonina. As doses 25nM ($p < 0,001$) e 200nM ($p = 0,011$) da subpopulação C apresentam diferenças significativas quando comparadas com a dose controle (0nM). As demais doses das subpopulações A e B não apresentam diferenças significativas quando comparadas com a dose 0nM. Quando comparadas entre si, dentro de cada dose, na subpopulação C algumas doses apresentam diferenças estatísticas significativas. Entre as doses, dentro da subpopulação A, e as doses, dentro da subpopulação B, não aparecem diferenças estatísticas (Tabela 5).

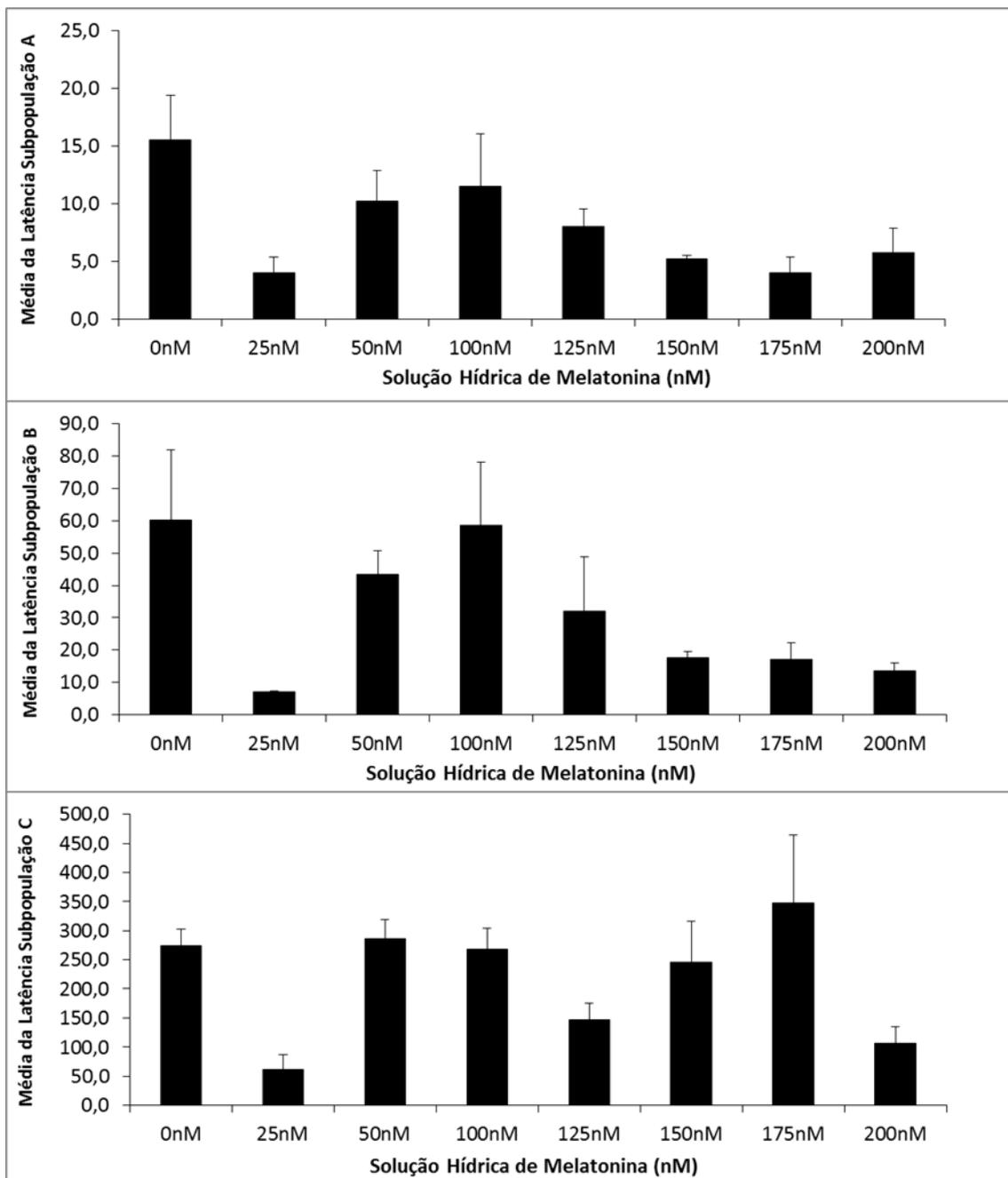


Figura 8 Os gráficos mostram a comparação da média das latências das subpopulações (quartis) A, B e C em cada grupo (dose) de melatonina. Existe diferença estatística entre alguns grupos (doses) (*) (Dados Tabela 5).

Tabela 5 Diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,005$) relativas às latências entre as doses de melatonina; entre as subpopulações (subgrupos ou quartis); entre as subpopulações e as doses de exposição de melatonina.

Subgrupos	F(2,72)=99, $p < 0,001$			
Dose	F(7,72)=4, $p < 0,001$			
Subgrupo x Dose	F(14,72)=2, $p = 0,002$			
	Subgrupos	Entre as doses	Doses	Entre os subgrupos
Tukey	C	175nMx200nm $p < 0,001$ 175nMx125nM $p = 0,001$ 175nx25nM $p < 0,001$ 150nMx25nM $p = 0,004$ 100nMx200nM $p = 0,017$ 100nMx25nM $p < 0,001$ 50nMx200nM $p = 0,005$ 50nMx25 nM $p < 0,001$ 0nMx200nM $p = 0,011$ 0nMx25nM $p < 0,001$	0nM	C x A $p < 0,001$
				C x B $< 0,001$
			50nM	C x A $p < 0,001$
				C x B $< 0,001$
			100nM	C x A $p < 0,001$
				C x B $p < 0,001$
			125nM	C x A $p = 0,01$
				C x B $p < 0,04$
			150nM	C x A $p < 0,001$
				C x B $p < 0,001$
			175nM	C x A $p < 0,001$
				C x B $< 0,001$

5 Discussão

O *Zebrafish* parece preferir permanecer mais tempo no lado branco do aquário quando isolado em fotoperíodo de 12/12 horas e testado em período noturno (Figura 2, Experimento 2). Esta permanência se mostra contrária à aversão apresentada por este peixe ao lado branco do aquário teste, em outros trabalhos (Gouveia Jr et al., 2005; Maximino et al., 2010a; Maximino et al., 2007; Serra et al., 1999). O padrão comportamental do *Danio rerio* no teste com aquário preto/branco é que o maior tempo de permanência seja no lado preto do aquário (lado menos aversivo) (Gouveia Jr et al., 2005; Maximino et al., 2010c; Serra et al., 1999). Estes dados se replicam no trabalho de Dias et al. (2014).

O fotoperíodo parece exercer o papel de arrastador no ritmo circadiano. A variação de luminosidade do ambiente pode influenciar o ciclo circadiano de peixes, afetando o comportamento alimentar (Krebs & Davies, 1996) e reprodutor destes (Bapary, Amin, Takeuchi, & Takemura, 2011; Fiszbein, Cánepa, Vázquez, Maggese, & Pandolfi, 2010; Gunnarsson et al., 2012; Spence et al., 2008). O clima subtropical de monções da Índia tem fotoperíodos de 14/10 horas no verão (estação de chuvas) e 10/14 horas no inverno (estação seca). Peixes de regiões tropicais e subtropicais são sujeitos a oscilações hidrométricas que alteram a área do seu habitat, influenciando na sua dieta e reprodução (Abelha, Agostinho, & Goulart, 2001). O

Zebrafish, em ambiente natural, apresenta picos de atividade no início da tarde e nas últimas horas de luminosidade (Spence et al., 2008). A luminosidade ambiental funciona como arrastador que altera o padrão comportamental do *Zebrafish* em relação à aversão (Dias et al., 2014). A diminuição da luminosidade no ambiente natural aumenta o período de escuro, que está intimamente associado ao aumento de produção endógena de melatonina (Dias et al., 2013). Em alguns vertebrados a variação na concentração sanguínea de melatonina é capaz de sinalizar a estação do ano para o sistema reprodutivo (Bastianetto, Escrivão, & Oliveira, 2005). A maturação de gônadas, a maturação de gametas e a fecundidade têm sincronia com o aumento desse hormônio no *Zebrafish* (Giorginia et al., 2012; Lima-Cabello et al., 2014; Maitra et al., 2013). Os fatores fisiológicos associados a ecologia do animal, bem como uma base evolutiva de reprodução, poderiam explicar a alteração comportamental observada na figura 2 do experimento 2.

Um maior do tempo de permanência no lado branco do aquário teste denota aversão a este estímulo, e é tomada como um indicador de ansiedade no *Zebrafish* (Maximino et al., 2010b). A exposição à melatonina (Figura 4 Experimento 3) evidencia diferenças estatísticas entre a dose controle (0nM) e as demais doses, exceto a dose 25nM, parecendo mostrar que a exposição via hídrica ao hormônio exerce efeito sobre o sujeito, alterando esta resposta, aumentando a aversão e consequentemente tendo um efeito ansiogênico. Parece haver duas curvas de resposta ansiogênica: uma que vai da dose 25nM até a dose 100nM; e outra da dose 125nM até a dose 200nM.

As irregularidades no tempo de permanência parecem apontar para a existência subpopulações (quatis ou subgrupos) na amostra, que responderiam diferentemente às mesmas doses de melatonina (Figura 5 Experimento 3). A estatística demonstra o efeito ansiogênico da exposição às doses de melatonina em relação a dose 0nM. Todas têm diferença significativa, exceto a dose 200nM. A subpopulação B também apresenta diferença significativa, mas de maneira mais atenuada. A estatística demonstra o efeito ansiogênico entre doses de melatonina em relação a dose controle 0nM e as doses 50nM, 125nM, 150nM e 175nM. A subpopulação C apresenta diferença estatística apenas entre a dose controle 0nM e a dose 50nM. Ao que parece apenas a dose 50nM é efetiva em todas as três subpopulações.

A melatonina tem ampla capacidade de ligação a proteínas receptoras na superfície celular (Godson & Reppert, 1997; Pandi-Perumal et al., 2008). Subpopulações dentro da mesma amostra, por suas variações gênicas intrínsecas, poderiam ser considerados cronotipos e responderiam diferentemente quando expostas à mesma concentração de melatonina (Pereira et al., 2009)(Pereira et al., 2009). A expressão gênica e o metabolismo enzimático poderiam ser afetados, influenciando a fisiologia e o comportamento do *Zebrafish*. A presença de subpopulações nestes peixes parece demonstrar que uma predisposição gênica, aliada ou não a fatores ambientais, leva a consistentes variações individuais nos traços comportamentais. Em bubalinos demonstrou-se esta diferença, apresentando indivíduos mais sensíveis ou menos sensíveis ao fotoperíodo. Nos menos sensíveis a quantidade sérica de melatonina se mostra menor (Bastianetto et al., 2005). O *Zebrafish* também demonstrou alto grau de herdabilidade destas variações (Tran & Gerlai, 2013). A herança da variabilidade poderia levar a existir, na mesma população, indivíduos com respostas gênicas diferentes a exposição à melatonina. Dias et al. (2014) sugeriu a presença de subpopulações de *Zebrafish* em trabalho comportamental com o aquário teste banco/preto, quando obteve resultados distintos utilizando fotoperíodo 12/12. Alguns resultados corroboram a presença de três subpopulações na amostra (Figura 7 Experimento 3). Distribuídas de acordo com as doses controle (0nM) e de melatonina (de 25nM a 200nM), nota-se a diferença estatística entre a maioria das populações A, B e C da amostra.

O número de alternâncias de cada subpopulação (A, B e C), para a dose controle (0nM) e para as doses de exposição de melatonina, revelaram padrões gráficos semelhantes entre elas, porém com diferença significativa apenas entre as doses 0nM e 125nM, e 0nM e 200nM, na subpopulação C (Figura 6 Experimento 3). Estas diferenças significantes apenas nessa população poderiam ser explicadas pela diferença entre os cronotipos (Pereira et al., 2009). A alternância pode ser utilizada como medida de comportamento de atividade motora no *Zebrafish* (Maximino et al., 2010b). As doses de exposição de melatonina utilizadas não parecem afetar a atividade motora dos sujeitos nas três populações. A melatonina parece causar uma resposta ansiogênica nas subpopulações (principalmente na A), mas esse efeito parece não alterar a atividade locomotora. Como a atividade locomotora parece estar atrelada à dopamina e não à serotonina (precursora da melatonina) (Peruca, 2012), os neurônios dopaminérgicos modulariam circuitos

cerebrais e induziriam a execução de movimentos. A liberação de dopamina pode ser influenciada por aprendizagem aversiva ou apetitiva (ações motoras que foram aversivas ou que foram gratificantes) (Lima, 2014). Ativações diferentes poderiam explicar o efeito ansiogênico, mas não na atividade locomotora nas subpopulações em relação às doses de exposição de melatonina.

A latência (tempo que o sujeito leva para passar para o lado oposto ao da primeira escolha) pode fornecer uma medida de coragem ou impulsividade (Maximino et al., 2010a). A figura 8 do experimento 3 mostra as subpopulações (A, B e C) em relação à dose controle (0nM) e às outras doses de exposição de melatonina. Os resultados das doses nas subpopulações são muito semelhantes, e não apresentam diferenças estatísticas em relação à dose controle (0nM), excetuando-se as doses 25nM e 200nM da subpopulação C. A exposição a melatonina não parece afetar a latência, quando comparada principalmente na dose de 50nM, que causa ansiogênese nas três subpopulações (Figura 5). Provavelmente a iniciação da exploração também depende de mediação dopaminérgica em detrimento da ação da melatonina no comportamento observado nas doses de 25nM e 200nM da subpopulação C.

O aquário teste branco/preto e a escototaxia (preferência pelo lado preto) que o *Zebrafish* apresenta, quando testado nele, são amplamente utilizados para medidas de ansiedade (Maximino et al., 2010b; Maximino et al., 2010c). A inversão do tempo de permanência (aumenta no lado branco) na presença de alguns fotoperíodos específicos foram demonstrados em outro (Dias et al., 2014) e neste trabalho. A influência ansiogênica parece estar aqui demonstrada quando, independente das subpopulações, nota-se o efeito quando da exposição dos sujeitos à dose 50nM. Abre-se a possibilidade de continuidade destes experimentos utilizando cepas específicas de *Zebrafish* a fim de tentar uniformizar a população testada com uma maior variedade de concentrações de melatonina. O efeito da atividade motora, que não aparece com as doses de melatonina aqui utilizadas podem ser investigados com utilização de fármacos que influenciem dopamina. A continuação deste trabalho é pretendida a fim de explorar as questões que emergiram.

6 Conclusões

A luminosidade parece arrastar o ciclo circadiano do *Zebrafish*, quando testado em aquário branco/preto, diminuindo sua aversão ao lado branco do aquário, no fotoperíodo 12/12 horas e período de coleta noturno. A melatonina parece influir na alteração causada pelo fotoperíodo, diminuindo ou anulando o arrastamento. Cronotipos (subpopulações) de *Zebrafish* parecem responder de maneiras diferenciadas à exposição às mesmas doses de melatonina, o que parece demonstrar a atuação exógena desta indolamina no metabolismo, fisiologia e comportamento deste ciprinídeo. Estudos com cepas específicas de *Zebrafish* e com um leque maior de concentrações de melatonina parecem ser necessários para identificar a possível dose específica para contrabalancear a atuação luminosa no arrastamento do ciclo circadiano em *Danio rerio*.

Agradecimentos

CNPq, CAPES, Prof^a Dr^a Raquel Amaral.

4 CONCLUSÕES GERAIS

- A melatonina, tanto endógena como exógena, influencia o ciclo circadiano de peixes, incluindo o *Zebrafish*. A fisiologia (desenvolvimento, sono, alimentação, memória, reprodução) e o comportamento (aprendizado, ansiedade) do *Danio rerio* são afetadas por esse neurohormônio.
- Ambos os aparatos de isolamento comparados demonstraram ser igualmente eficazes na manutenção do *Zebrafish* para testes comportamentais com variável luminosa.
- A luminosidade parece arrastar o ciclo circadiano do *Zebrafish*, quando testado em aquário branco/preto, diminuindo sua aversão ao lado branco do aquário, no fotoperíodo 12/12 horas e período de coleta noturno.
- A melatonina parece influir na alteração causada pelo fotoperíodo, diminuindo ou anulando o arrastamento.
- Cronotipos (subpopulações) de *Zebrafish* parecem responder de maneiras diferenciadas à exposição às mesmas doses de melatonina, o que parece demonstrar a atuação exógena desta indolamina no metabolismo, fisiologia e comportamento deste ciprinídeo.
- Estudos com cepas específicas de *Zebrafish* e com um leque maior de concentrações de melatonina parecem ser necessários para identificar a possível dose específica para contrabalancear a atuação luminosa no arrastamento do ciclo circadiano em *Danio rerio*.

REFERÊNCIAS

- Aarseth, J. J., Frøiland, E., & Jørgensen, E. H. (2010). Melatonin implantation during spring and summer does not affect the seasonal rhythm of feeding in anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Polar Biol* 33, 379–388.
- Abelha, M. C. F., Agostinho, A. A., & Goulart, E. (2001). Plasticidade trófica em peixes de água doce. *Acta Scientiarum*, 23(2), 425-434.
- Akosman, M. S., Özdemir, V., Taskiran, N., Akalan, M. A., & Bülbül, A. (2013). Effect of Photoperiod and Melatonin on Volume and Cellular Parameters of Testis in Pinealectomized Rats. *Int. J. Morphol.*, 31(3), 1062-1067.
- Amaral, F. G. (2009). *Pineal melatonin production in Streptozotocin-diabetic rats: mechanisms and microdialysis daily profile*. Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Arruda, C. C. (2013). *Influência de fotoperíodo artificial no comportamento de um primata neotropical diurno (Callithrix jacchus)*. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal RN.
- Baldomero, E. B. (2011). *Depresión y ritmos circadianos* (Vol. 1): E.U.R.O.M.E.D.I.C.E., Ediciones Médicas, S.L.
- Bapary, M. A. J., Amin, N., Takeuchi, Y., & Takemura, A. (2011). The stimulatory effects of long wavelengths of light on the ovarian development in the tropical damselfish, *Chrysiptera cyanea*. *Aquaculture*, 314, 188–192.
- Barajas-López, C., Peres, A. L., Espinosa-Luna, R., Reyes-Vázquez, C., & Prieto-Gómez, B. (1996). Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *Eur J Pharmacol*, 312(3), 319-325.
- Barrera-Mera, B. (2012). Circadian rhythms in the second half of the 20th century: 52 years (1959-2011) in the study of systematized chronobiology. *Arch Neurocién (Mex)*, 17(1), 3-4.
- Bastianetto, E., Escrivão, S. C., & Oliveira, D. A. A. d. (2005). Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. *Rev Bras Reprod Anim*, 29(1), 49-52.
- Bayarri, M. J., Munõz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Lama, M. A. R. d., Madrid, J. A., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior*, 81, 577– 583.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). Circadian Rhythms From Multiple Oscillators: Lessons From Diverse Organisms. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1-13.
- Ben-Moshe, Z., Alon, S., Mracek, P., Faigenbloom, L., Tovín, A., Vatiné, G. D., . . . Gothilf, Y. (2014a). The light-induced transcriptome of the zebrafish pineal gland reveals complex regulation of the circadian clockwork by light. *Nucleic Acids Research*, 1-18.
- Ben-Moshe, Z., Foulkes, N. S., & Gothilf, Y. (2014b). Functional Development of the Circadian Clock in the Zebrafish Pineal Gland. *BioMed Research International*, 1-8.
- Benítez-King, G., Valdés-Tovar, M., Maya-Ampudia, V., Jiménez-Rubio, G., Domínguez-Alonso, A., Riquelme, A., . . . Berlanga, C. (2013). La melatonina

- como un factor promotor de la diferenciación neuronal: implicaciones en el tratamiento de las demencias. *Salud Mental*, 36, 193-199.
- Bilotta, J., & Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. *Int. J. Devl Neuroscience*, 19, 621–629.
- Borsetti, N. H., Dean, B. J., Bain, E. J., Clanton, J. A., Taylor, R. W., & Gamse, J. T. (2011). Light and melatonin schedule neuronal differentiation in the habenular nuclei. *Developmental Biology* 358 (2011) 251–261, 358, 251–261.
- Brito, T. M., Maximino, C., Colmanetti, R. B., Pontes, A. A. A., Castro, H. M., Lacerda, R. T., . . . Gouveia Jr., A. (2007). *Padrões de preferência Claro-escuro de duas espécies de teleósteos em um paradigma de teste-reteste*. Paper presented at the XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Aguas de Lindóia SP. www.fesbe.org.br/fesbev4/sistema/static/52/04.015.html
- Bubenik, G. A. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci.*, 47(10), 2336-2348.
- Capitelli, C. S. (2007). *Efeito Da Melatonina Em Modelo Animal De Parkinsonismo Induzido Pelo MPTP*. Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- Cardoso, F. R. G., Cruz, F. A. O., Silva, D., & Cortez, C. M. (2009). A simple model for circadian timing by mammals. *Braz J Med Biol Res*, 42(1), 122 - 127.
- Carnevali, O., Gioacchini, G., Maradonna, F., Olivotto, I., & Migliarini, B. (2011). Melatonin Induces Follicle Maturation in *Danio rerio*. *PLoS ONE*, 6(5), 1-9.
- Carvalho, T. B., Mendonça, F. Z., Costa-Ferreira, R. S., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2013). The effect of increased light intensity on the aggressive behavior of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Zoologia*, 30(2), 125–129.
- Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Frohlich, N., Lopez-Olmeda, J. F., Foa, A., . . . Foulkes, N. S. (2011). A Blind Circadian Clock in Cavefish Reveals that Opsins Mediate Peripheral Clock Photoreception. *PLoS Biology*, 9(9), 1-13.
- Conde-Sieira, M., Muñoz, J. L. P., López-Patiño, M. A., Gesto, M., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2014). Oral administration of melatonin counteracts several of the effects of chronic stress in rainbow trout. *Domestic Animal Endocrinology*, 46, 26–36.
- Cymborowski, B. (2010). Introduction to Circadian Rhythms. In E. Kulczykowska, W. Popek & B. G. Kapoor (Eds.), *Biological Clock in Fish* (Vol. 1, pp. 1-8): Science Publishers.
- Dang, Z. (2014). Fish biomarkers for regulatory identification of endocrine disrupting chemicals *Environmental Pollution*, 185, 266-270.
- Danilova, N., Krupnik, V. E., Sugden, D., & Zhdanova, I. V. (2004). Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development. *The FASEB Journal*, 18, 751-753.
- Detanico, B. C. (2010). *Avaliação do padrão temporal no catabolismo do ATP extracelular: possível modulação noradrenérgica*. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Dias, C. A. G. M. (2010). *Preferência Claro/Escuro em Danio rerio: Efeitos do horário da Coleta e de Regime de Luz*. Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém PA.
- Dias, C. A. G. M., Fagundes, D. S., Gouveia JR, A., Silanes, M. D. M. L., & Sá-Oliveira, J. C. (2013). Luz, melatonina e estresse oxidativo na piscicultura. *Biota Amazônia*, 3(3), 169-176.

- Dias, C. A. G. M., Santos, B. R., Mansur, B. M., Pinheiro, M. S., Fecury, A. A., Sá-Oliveira, J. C., . . . Gouveia JR, A. (2014). Light / Dark preference in *Danio rerio*: effects of light exposure duration and day period. *Biota Amazônia*, 4(3), 106-111.
- Díaz Rodríguez, E., Garnacho Gayarre, N., Valdés Cañedo, M. M., Marín Fernández, B., & Díaz López, B. (2001). Efectos de la melatonina sobre el mantenimiento de parámetros corporales durante el envejecimiento. Estudio en *Rattus norvegicus*. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 36(5), 287-292.
- Elbaz, I., Foulkes, N. S., Gothilf, Y., & Appelbaum, L. (2013). Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish. *Front Neural Circuits*, 7(9), 1-11.
- Elia, P., Azoulay, A., & Zeiri, Y. (2012). On the efficiency of water soluble antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 314–324.
- Evans, D. H. (1998). *The Physiology of Fishes*: CRC Press.
- Fagundes, D. S., Gonzalo, S., Arruebo, M. P., Plaza, M. A., & Murillo, M. D. (2010). Melatonin and Trolox ameliorate duodenal LPS-induced disturbances and oxidative stress. *Dig Liver Dis*, 42(1), 40-44.
- Falcón, J., Besseau, L., Magnanou, E., Herrero, M. J., Nagai, M., & Boeuf, G. (2011). Melatonin, the time keeper: biosynthesis and effects in fish. *Cybium*, 35(1), 3-18.
- Falcón, J., Besseau, L., Magnanou, E., Sauzet, S., Fuentès, M., & Boeuf, G. (2010a). The Pineal Organ of Fish In E. Kulczykowska, W. Popek & B. G. Kapoor (Eds.), *Biological Clock in Fish* (Vol. 1, pp. 9-34). Science Publishers.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., & Boeuf, G. (2007). Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18(2), 81-88.
- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J. A., & Carrillo, M. (2010b). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 469–482.
- Ferreira, C. d. S., Maganhin, C. C., Simões, R. d. S., Girão, M. J. B. C., Baracat, E. C., & Soares-Jr, J. M. (2010). Melatonina: modulador de morte celular. *Rev Assoc Med Bras* 56(6), 715-718.
- Fiszbein, A., Cánepa, M., Vázquez, G. R., Maggese, C., & Pandolfi, M. (2010). Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology & Behavior* 99, 425–432.
- Fusatto, E. d. L. (2012). *Análise da Influência da Administração da Melatonina no Sistema Cardiovascular e Muscular de Ratos Desnervados*. Mestrado, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba.
- García-Moreno, H., Calvo, J. R., & Maldonado, M. D. (2013). High levels of melatonin generated during the brewing process. *J. Pineal Res.*, 55, 26–30.
- Giorginia, E., Giocchini, G., Conti, C., Ferraris, P., Sabbatini, S., Tosi, G., . . . Carnevali, O. (2012). The role of melatonin on zebrafish follicle development: An FT-IR imaging approach. *Vibrational Spectroscopy* 62, 279– 285.
- Godson, C., & Reppert, S. M. (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology*, 138(1), 397-404.
- Gonçalves, M. d. C. F. (2008). *Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica de quitossomas para liberação cutânea de melatonina*. Mestrado, UFRGS, Porto Alegre.

- Gouveia Jr, A., Zampieri, R. A., Ramos, L. A., Silva, E. F., Matiulli, R., & Morato, S. (2005). Preference of goldfish (*Carassius auratus*) for dark places. *Revista de Etologia*, 7(2), 63-66.
- Gunnarsson, S., Imsland, A. K., Siikavuopio, S. I., Árnason, J., Gústavsson, A. ó., & Thorarensen, H. (2012). Enhanced growth of farmed Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) following a short-day photoperiod. *Aquaculture*, 350-353, 75–81.
- Handeland, S. O., Imsland, A. K., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Hofeld, C. D., Baeverfjord, G., . . . Stefansson, S. O. (2013). Low light intensity can reduce Atlantic salmon smolt quality. *Aquaculture* 384–387, 19–24.
- Hassell, K. J., Reiter, R. J., & Robertson, N. J. (2013). Melatonin and its Role in Neurodevelopment During the Perinatal Period: A Review. *Fetal and Maternal Medicine Review*, 24(2), 76–107.
- Houart, C. (2001). Zebrafish as an Experimental Organism. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1 - 5.
- Huang, H., Wang, Z., Weng, S.-J., Sun, X.-H., & Yang, X.-L. (2013). Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Progress in Retinal and Eye Research*, 32, 64-87.
- Hur, S.-P., Takeuchi, Y., Itoh, H., Uchimura, M., Takahashi, K., Kang, H.-C., . . . Takemura, A. (2012). Fish sleeping under sandy bottom: Interplay of melatonin and clock genes. *General and Comparative Endocrinology*, 177, 37–45.
- Hurd, M. W., Debruyne, J., Straume, M., & Cahill, G. M. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 65(3), 465–472.
- Illnait-Ferrer, J. (2012). Melatonina: actualidad de una hormona olvidada. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3), 1-13.
- Jansen, J. M., Lopes, A. J., Jansen, U., & Capone, D. (2007). Cronbiologia e seus mecanismos. In E. Fiocruz (Ed.), *Medicina da Noite: da Cronbiologia à Prática Clínica* (pp. 47-69). Rio de Janeiro.
- Kasekar, N. M., Gupta, G. J. C., Jadhav, K. R., & Kadam, V. J. (2014). A Review On Melatonin – A Miraculous Drug And Its Applications. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 3(6), 1974-1985.
- Kashiwagi, T., Park, Y.-J., Park, J.-G., Imamura, S., Takeuchi, Y., Hur, S.-P., & Takemura, A. (2013). Moonlight Affects mRNA Abundance of Arylalkylamine N-Acetyltransferase in the Retina of a Lunar-Synchronized Spawner, the Goldlined Spinefoot. *J. Exp. Zool.*, 319A, 505–516.
- Kazimi, N., & Cahill, G. M. (1999). Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Developmental Brain Research*, 117, 47–52.
- Krebs, J. R., & Davies, N. B. (1996). *Introdução à ecologia comportamental*: Atheneu Editora.
- Kulczykowska, E., Popek, W., & Kapoor, B. G. (2010). *Biological Clock in Fish*: Science Publishers.
- Lahiri, K., Vallone, D., Gondi, S. B., Santoriello, C., Dickmeis, T., & Foulkes, N. S. (2005). Temperature Regulates Transcription in the Zebrafish Circadian Clock. *PLoS Biology*, 3(11), 2005-20016.
- Laura, R., Magnoli, D., Zichichi, R., Guerrera, M. C., Carlos, F. d., Suarez, A. A., . . . Germana, A. (2012). The Photoreceptive Cells of the Pineal Gland in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Microscopy Research and Technique*, 1-8.
- Lepage, O., Larson, E. T., Mayer, I., & Winberg, S. (2005). Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout. *J. Pineal Res.*, 38, 264-271.

- Li, D. Y., Smith, D. G., Hardeland, R., Yang, M. Y., Xu, H. L., Zhang, L., . . . Zhu, Q. (2013). Melatonin Receptor Genes in Vertebrates. *Int. J. Mol. Sci.*, *14*, 11208-11223.
- Li, P., Temple, S., Gao, Y., Haimberger, T. J., Hawryshyn, C. W., & Li, L. (2005). Circadian rhythms of behavioral cone sensitivity and long wavelength opsin mRNA expression: a correlation study in zebrafish *The Journal of Experimental Biology* (Vol. 208, pp. 497-504).
- Li, X., Montgomery, J., Cheng, W., Noh, J. H., Hyde, D. R., & Li, L. (2012). Pineal Photoreceptor Cells Are Required for Maintaining the Circadian Rhythms of Behavioral Visual Sensitivity in Zebrafish. *PLoS ONE*, *7*(7), 1-12.
- Lima-Cabello, E., Diaz-Casado, M. E., Guerrero, J. A., Otalora, B. B., Escames, G., Lopez, L. C., . . . Acuna-Castroviejo, D. (2014). A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J. Pineal Res.*, *57*, 1-9.
- Lima, B. F. C. d. (2014). *Estudo do Papel dos Neurônios Dopaminérgicos da Substância Negra no Condicionamento de Lugar com Sacarose e Quinino*. Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Lombardo, F., Giorgini, E., Giocchini, G., Maradonna, F., Ferraris, P., & Carnevali, O. (2012). Melatonin effects on *Fundulus heteroclitus* reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*, *24*, 794-803.
- López-Olmeda, J. F., Madrid, J. A., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2006). Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* *144* 180-187.
- Maitra, S. K., Chattoraj, A., Mukherjee, S., & Moniruzzaman, M. (2013). Melatonin: A potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. *General and Comparative Endocrinology*, *181*, 215-222.
- Maximino, C., Brito, T. M., Batista, A. W. S., Herculano, A. M., Morato, S., & Gouveia Jr, A. (2010a). Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behavioural Brain Research* *214* (2010) 157-171, *214*, 157-171.
- Maximino, C., Brito, T. M., Colmanetti, R., Pontes, A. A. A., Castro, B. F., Lacerda, R. I. T., . . . Gouveia Jr, A. (2010b). Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*, *210*, 1-7.
- Maximino, C., Brito, T. M., Dias, C. A. G. M., Gouveia Jr, A., & Morato, S. (2010c). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, *5*, 221-228.
- Maximino, C., Brito, T. M., Moraes, F. D., Oliveira, F. V. C., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., . . . Gouveia Jr, A. (2007). A Comparative Analysis of the Preference for Dark Environments in Five Teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*, *20*, 351-367.
- Maximino, C., & Herculano, A. M. (2010). A Review of Monoaminergic Neuropsychopharmacology in Zebrafish. *Zebrafish*, *7*(4), 359-378.
- Maximino, C., Silva, A. W. B., Gouveia Jr, A., & Herculano, A. M. (2011). Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *35*, 624-631.
- Mesquita, F. O., Godinho, H. P., Azevedo, P. G., & Young, R. J. (2008). A preliminary study into the effectiveness of stroboscopic light as an aversive stimulus for fish. *Applied Animal Behaviour Science* *111*, 402-407.
- Motilva, V., Cabeza, J., & Alarcón de la Lastra, C. (2001). New issues about melatonin and its effects on the digestive system. *Curr Pharm Des*, *7*(10), 909-931.

- Moura, L. N. d., & Silva, M. L. d. (2010). Evolutionary basis of biological rhythmicity Retrieved 19/02/2012, 2012, from www.ufpa.br/lobio/Resumoscongressos/Fundamentosevolutivosdaritmicidade biologica.pdf
- Navarro, F. K. S. P., & Navarro, R. D. (2012). Importância do fotoperíodo no crescimento e na reprodução de peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 36(2), 94-99.
- Neves, W. S., Morioka, R. Y., Koga, A. C., Aparecida, F., Júnior, J. J., & Caldeira, J. d. C. (2000). Cronobiologia e suas Aplicações na Prática Médica. Retrieved 28/03/2012 http://www.ismeppalmas.com.br/revisao_cronobiologia.doc
- Oliveira, C., Duncan, N. J., Pousão-Ferreira, P., Mañanós, E., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). Influence of the lunar cycle on plasma melatonin, vitellogenin and sex steroids rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Aquaculture*, 306, 343–347.
- Oliveira, C., Mañanós, E., Ramos, J., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2011). Impact of photoperiod manipulation on day/night changes in melatonin, sex steroids and vitellogenin plasma levels and spawning rhythms in Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 159, 291–295.
- Paciorek, T., & McRobert, S. (2012). Daily variation in the shoaling behavior of zebrafish *Danio rerio*. *Current Zoology*, 58(1), 129–137.
- Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.*, 85(3), 335-353.
- Pereira, D. S., Tufik, S., & Pedrazzoli, M. (2009). Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes. *Rev Bras Psiquiatr.*, 31(1), 63-71.
- Peruca, J. (2012). *Comportamento compulsivo em cães*. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS.
- Piccinetti, C. C., Migliarini, B., Olivotto, I., Coletti, G., Amici, A., & Carnevali, O. (2010). Appetite regulation: The central role of melatonin in *Danio rerio*. *Hormones and Behavior*, 58, 780–785.
- Piccinetti, C. C., Migliarini, B., Olivotto, I., Simoniello, M. P., Giorgini, E., & Carnevali, O. (2013). Melatonin and Peripheral Circuitries: Insights on Appetite and Metabolism in *Danio Rerio*. *Zebrafish*, 10(3), 275-282.
- Pontes, A. L. B. d., Engelberth, R. C. G. J., Nascimento Jr., E. d. S., Cavalcante, J. C., Costa, M. S. M. d. O., Pinato, L., . . . Cavalcante, J. d. S. (2010). Serotonin and circadian rhythms. *Psychology & Neuroscience*, 3(2), 217 - 228.
- Rath, M. F., Gothilf, Y., Guido, M., & Muñoz, E. (2014). Circadian System Development and Plasticity. *BioMed Research International*, 1-2.
- Renuka, K., & Joshi, B. N. (2010). Melatonin-induced changes in ovarian function in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) held in long days and continuous light. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 42–46.
- Rocha, A. S. C. d., Araújo, M. P. d., Campos, A., Filho, R. C., Mesquita, E. T., & Santos, M. V. (2011). Ritmo circadiano em óbitos hospitalares: comparação entre unidade de tratamento intensivo e unidade de tratamento não intensivo. *Rev Assoc Med Bras*, 57(5), 529-533.
- Seabra, M. d. L. V., & Neto, J. C. (2008). Melatonina e Sono. In S. Tufik (Ed.), *Medicina e Biologia do Sono* (1 ed., pp. 483): Manole.

- Serra, E. L., Medalha, C. C., & Mattioli, R. (1999). Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 1551-1553.
- Shida, C. S. (1993). *Estudo da Interação de Melatonina com Membranas Lipídicas*. Mestrado, Universidade de São Paulo.
- Shin, H. S., Lee, J., & Choi, C. Y. (2011). Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 160, 221–228.
- Sigurgeirsson, B., Þorsteinsson, H., Sigmundsdóttir, S., Lieder, R., Sveinsdóttir, H. S., Sigurjónsson, Ó. E., . . . Karlsson, K. (2013). Sleep–wake dynamics under extended light and extended dark conditions in adult zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 256, 377– 390.
- Sousa, C. E. C., Cruz-Machado, S. d. S., & Tamura, E. K. (2008). The circadian rhythms and reproduction in mammals. *Bol. Cent. Biol.* , 27, 1-16.
- Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. A., Wahab, M. A., Ahmed, Z. F., & Smith, C. (2006). The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69, 1435–1448.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83 13–34.
- Tan, D.-X., Hardeland, R., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Korkmaz, A., Sainz, R. M., . . . Reiter, R. J. (2010). The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol. Rev.*, 85, 607–623.
- Tran, S., & Gerlai, R. (2013). Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research* 257, 224– 229.
- Turk, H., Erdal, S., Genisel, M., Atici, O., Demir, Y., & Yanmis, D. (2014). The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. *Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s10725-014-9905-0
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., & Foulkes, N. S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Letters* 585, 1485–1494.
- Velarde, E., Delgado, M. J., & Alonso-Gomez, A. L. (2010). Serotonin-induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterol Motil* 22, 364–373.
- Veras, G. C., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., Oliveira, M. M., Rosa, P. V., & Felizardo, V. O. (2013). Ritmos Biológicos e Fotoperíodo em Peixes *Arch. Zootec.*, 62, 25-43.
- Vidor, L. P. (2010). *Crônica facial: ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado com placebo*. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Wang, J., Liu, C., Ma, F., Chen, W., Liu, J., Hu, B., & Zheng, L. (2014). Circadian Clock Mediates Light/Dark Preference in Zebrafish (*Danio Rerio*). *ZEBRAFISH*, 11(2), 115-121.
- WikimediaCommons. (2011). Formula Estrutural da Melatinona Retrieved 16/02/2014, 2014, from <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melatonin-structure.png>
- Yang, Z., Li, C., & Huang, F. (2013). Melatonin impaired acquisition but not expression of contextual fear in rats. *Neuroscience Letters*, 552, 10-14.

- Zahra, E. M. F., Ibtissam, L., Abdelhalim, M., Aboubakr, E. H., & Ali, O. (2012). The Influence of Gonadectomy on Anxiolytic and Antidepressant Effects of Melatonin in Male and Female Wistar Rats: A Possible Implication of Sex Hormones. *Neuroscience & Medicine*, 3, 162-173.
- Zhang, L., Zhang, H.-Q., Liang, X.-Y., Zhang, H.-F., Zhang, T., & Liu, F.-E. (2013). Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: Role of oxidative stress, BDNF and CaMKII. *Behavioural Brain Research*, 256, 72– 81.
- Zhdanova, I. V. (2011). Sleep and its regulation in zebrafish. *Rev. Neurosci.*, 22(1), 27–36.
- Zhdanova, I. V., & Reeb, S. G. (2005). Circadian Rhythms in Fish. In K. A. Sloman, S. Balshine & R. W. Wilson (Eds.), *Behaviour and Physiology Fish* (1 ed., pp. 504): Academic Press.
- Zhdanova, I. V., Wang, S. Y., Leclaire, O. U., & Danilova, N. P. (2001). Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Research*, 903, 263–268.

ANEXO A GRÁFICOS E ESTATÍSTICAS DO EXPERIMENTO 1

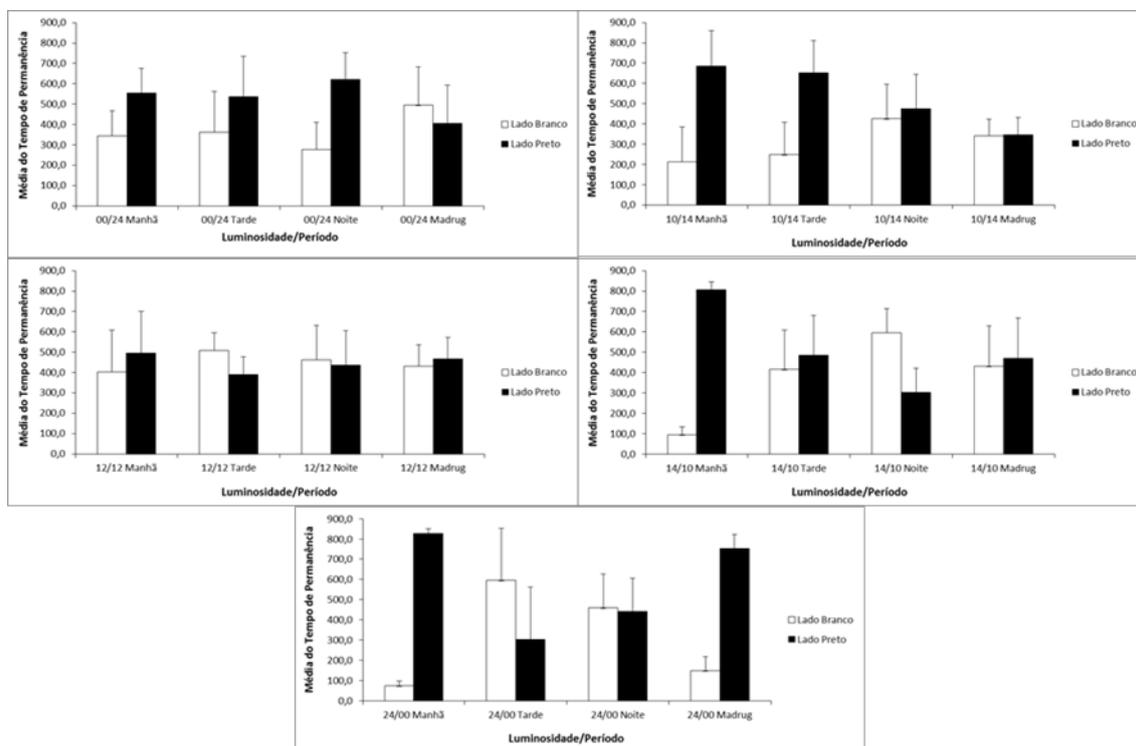


Figura 1 Os gráficos demonstram a comparação do tempo de permanência dos sujeitos em cada lado do aquário teste, em cada fotoperíodo (00/24; 10/14; 12/12; 14/10; 24/00), estatisticamente não significantes (ANOVA $F(20,11)=0,0212$, $p=1,000$).

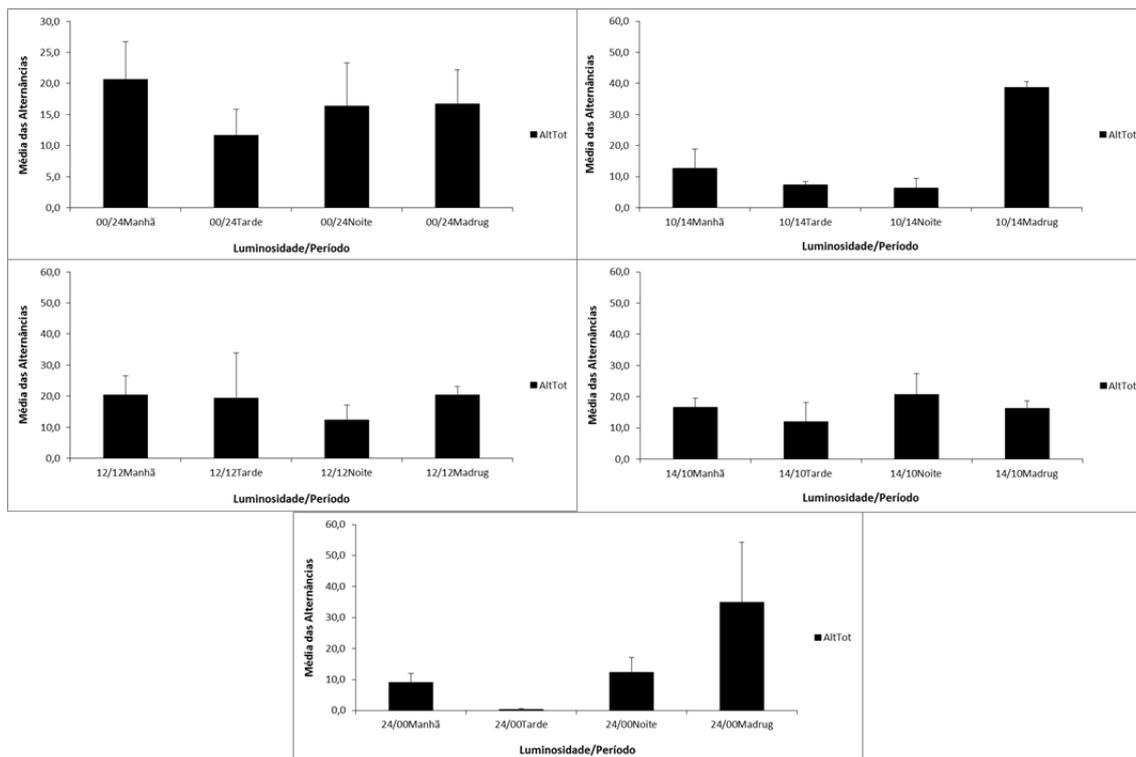


Figura 2 Os gráficos mostram as médias das alternâncias dos sujeitos, entre os lados do aquário teste, em cada fotoperíodo (00/24; 10/14; 12/12; 14/10; 24/00), estatisticamente não significantes (ANOVA $F(19,40)=0,705$, $p=0,792$, Kruskal-Wallis $P = 0,218$).

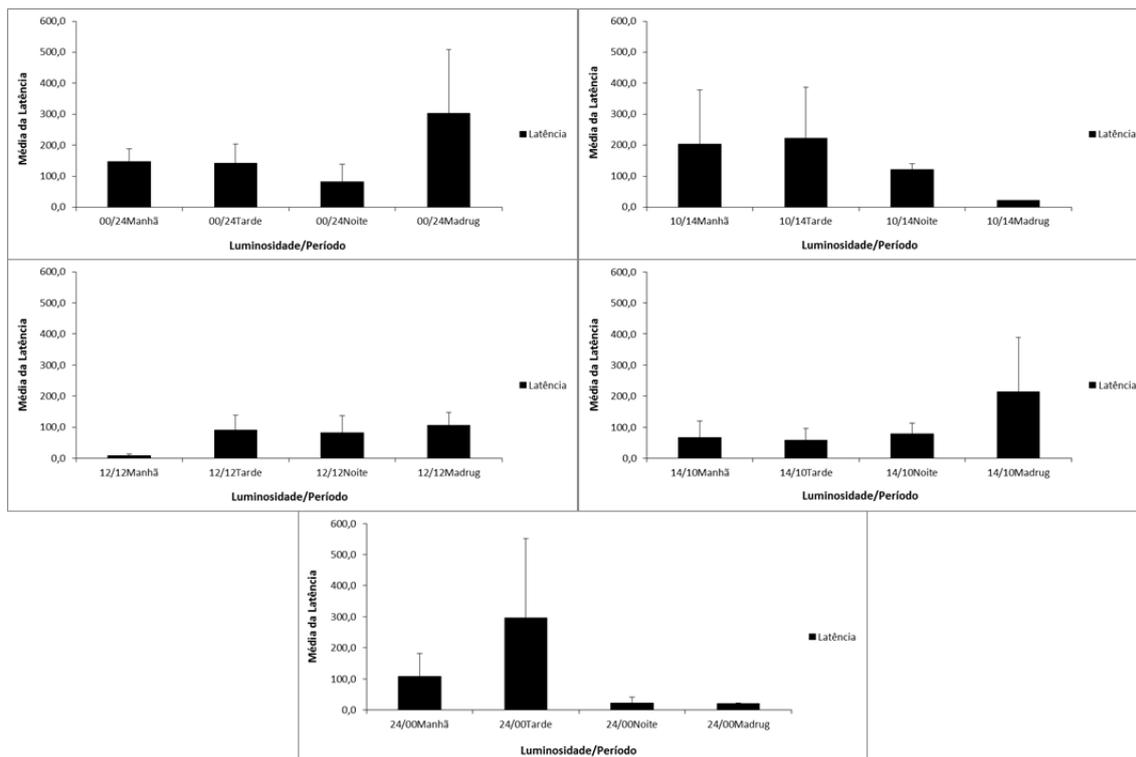


Figura 3 Os gráficos mostram as médias das latências dos sujeitos, entre os lados do aquário teste, em cada fotoperíodo (00/24; 10/14; 12/12; 14/10; 24/00), estatisticamente não significantes (ANOVA $F(19,40)=0,705$, $p=0,792$, Kruskal-Wallis $P = 0,824$).

ANEXO B SUBMISSÃO DE ARTIGO (ITEM 3.1)

De: "Gustavo Gomez Castro" <pa1gocag@uco.es>
Para: claudiodias@unifap.br
Enviadas: Terça-feira, 26 de agosto de 2014 7:04:17
Assunto: AZRecepcionarticulo

Estimado Sr. Claudio Alberto Gellis de Mattos Dias:

Hemos recibido su articulo (Nº 3421)REVISION Melatonina e peixes: uma revisão

, remitido para publicacion en Archivos de Zootecnia. Sera considerado en la proxima sesion del Consejo de Redaccion, en la que, si procede, se le asignaran dos evaluadores de cuyos comentarios le mantendre informado.

El numero asignado a su articulo debera ser empleado en toda la correspondencia relativa al mismo

Un cordial saludo y muchas gracias por su colaboracion.

Prof. Dr. A.G. Gomez Castro
Director
Archivos de Zootecnia
pa1gocag@uco.es

ANEXO C SUBMISSÃO DE ARTIGO (ITEM 3.2)

Claudio Alberto Gellis de Mattos Dias,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito intitulado "COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE APARATOS DE ISOLAMENTO PARA TESTES COMPORTAMENTAIS EM Cyprinidae, Danio rerio" para Biota Amazônia. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://periodicos.unifap.br/index.php/biota/author/submission/1143>

Login: claudiodias

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email.

Agradecemos mais

uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Dr. Júlio César Sá de Oliveira (Editor Gerente) Biota Amazônia

Biota Amazônia

<http://periodicos.unifap.br/index.php/biota>