Valdir Leandro do Nascimento

Desenvolvimento e padronização de uma ração ideal para a criação de zebrafish (*Danio rerio*) utilizado como modelo experimental na Rede PREMIUM do Centro de Bioterismo da FMUSP

Dissertação apresentada ao programa de
Pós Graduação de Endocrinologia como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Maria Frade Costa

São Paulo, 2019

Valdir Leandro do Nascimento

Desenvolvimento e padronização de uma ração ideal para a criação de zebrafish (*Danio rerio*) utilizado como modelo experimental na Rede PREMiUM do Centro de Bioterismo da FMUSP

Dissertação apresentada ao programa de
Pós Graduação de Endocrinologia como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Maria Frade Costa

São Paulo, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Valdir Leandro do
Desenvolvimento e padronização de uma ração ideal
para a criação de zebrafish (Danio rerio) utilizado
como modelo experimental na Rede PREMium do Centro
de Bioterismo da FMUSP / Valdir Leandro do
Nascimento. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Elaine Maria Frade Costa.

Descritores: 1.Crescimento e desenvolvimento
2.Fenômenos fisiológicos da nutrição animal 3.Dieta
4.Ração animal 5.Peixe-zebra 6.Aquicultura
7.Reprodução 8.Artemia

USP/FM/DBD-030/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória:

**Dedico à Deus por ser o Autor da Vida e me permitir
concluir esta trajetória. À meus amores Eliane , Gabriel e Daniel
pelo apoio ,compreensão , paciência e
amor incondicional ...**

Agradecimentos

À Deus, por me conceder saúde, motivação e perseverança em todo momento para superar meus desafios. Sou eternamente agradecido pelo que fez e faz em minha vida. Obrigado Senhor!!!

À minha orientadora Professora Doutora Elaine Maria Frade Costa, por aceitar orientar-me neste trabalho, acolhendo-me como aluno e ter contribuído para o meu desenvolvimento acadêmico e o conhecimento científico.

A Rhoster Ind. e Comércio Ltda e a Mazé, pela parceria, sem a qual este projeto não seria possível..e em especial à Teresa Barreto por sua disposição, prestatividade, sabedoria e paciência ...ferramentas as quais contribuíram para a realização deste trabalho...obrigado por sua amizade.

Ao Prof. Dr. Vinícius Nahime de Brito por sua disposição e especial colaboração a qual em muito contribuiu para a conclusão deste trabalho ...muito obrigado A equipe do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Bianca Ventura que sempre esteve disposta a me auxiliar com o seu conhecimento e sua experiência, meu muito obrigado. Também ao Rodrigo por se disponibilizar sempre que precisei, meu muito obrigado, e a toda equipe do Biotério que sempre esteve de prontidão para me ajudar durante as coletas dos dados na Unidade Zebrafish.

A Cida, secretária de Pós-Graduação que sempre me auxiliou para solucionar os problemas de questões administrativos e me direcionando no decorrer desses anos.

Ao Dr.Raymundo Machado de Azevedo Neto (Ray), pessoa a qual não tenho palavras... sou grato ...muito mesmo pelo apoio e suporte prestado no momento em que mais precisei...Muito obrigado.

Pessoas queridas que me acompanharam direta e indiretamente ficando na torcida, mas que foram essenciais durante esses anos: a biomédica Leila Lima, que muitas vezes me incentivou a não desistir...e pelo grande suporte que me tem dado nesses dias e aos colegas do Inrad, que participaram desta caminhada me trazendo apoio nesse período tão estressante.

À minha família, minha esposa Eliane e meus filhos Gabriel e Daniel pelo carinho e compreensão durante o decorrer deste trabalho que fazem parte do meu dia a dia, e com quem divido todas as minhas alegrias e dificuldades: vocês são tudo o que tenho de mais especial em minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Minha eterna Gratidão !!!!

Epígrafe

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que queremos ser, não somos o que iremos ser, mas, graças a Deus, não somos o que éramos!"

Martin Luther King

Sumário:

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução

1.1. Zebrafish como modelo biológico.....	15
1.2. Características Reprodutivas do Zebrafish.....	17
1.3. Qualidade físico-química da Água.....	17
1.4. Aspectos Biológicos Nutricional.....	18
1.5. Dietas mais comumente utilizadas na criação do <i>zebrafish</i> em laboratório.....	20
2. Justificativa.....	24
3. Objetivo primário.....;	25
4. Objetivo secundário.....	25
5. Material e Métodos.....	26
5.1. Elaboração e preparo da Dieta Ideal.....	27
5.2. Distribuição das Dietas.....	29
5.3 Desenho experimental.....	30
5.4. Parâmetros Analisados nos animais.....	32
5.5. Análise do comportamento durante a alimentação e crescimento dos animais.....	32
5.6. Análise da maturidade sexual e capacidade reprodutiva dos animais.....	33
5.7. Análise da mortalidade dos animais.....	33
5.8. Análise Estatística.....	31
6. Resultados.....	32
6.1. Desenvolvimento dos animais.....	33
6.2. Reprodução.....	35
6.5. Sobrevivência.....	36

6.6. Desenvolvimento.....	38
7. Discussão.....	39
7.1.Limitações na Elaboração da Ração.....	40
8. Conclusão.....	43
9. Referências Bibliográficas.....	44

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: *Zebrafish* (*Danio rerio*) conhecido como paulistinha

Figura 2: Produção científica utilizando o zebrafish como modelo experimental

Figura 3: a.Artemia b.Rotífero c.Paramécio

Figura 4: Modelo Sistema Zebtech- Unidade Zebrafish Biotério- FFMUSP

Figura 5: Alevino do *Zebrafish* com 6 dpf (fase larval)

Figura 6: Mensuração do alevino para início de experimento

Figura 7: Comprimento padrão

Figura 8: Representação Gráfica da taxa de sobrevivência na Gerção 0

Figura 9: Representação Gráfica da taxa de sobrevivência na Gerção 1

Figura 10: Representação Gráfica da taxa de sobrevivência na Gerção 0 e 1

Fig.11: Representação Gráfica da média desenvolvimento dos animais em ambas gerações

Fig.12: Boxplot do desenvolvimento dos animais em ambas gerações

Fig.13: Dado de proporção de viabilidade dos ovos em ambas a gerações

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos ideais da água para o adequado desenvolvimento do Zebrafish	16
Tabela 2. Composição das rações testes A, B e C.....	25
Tabela 3. Número de animais mortos durante o periodo de testes com as rações A,B,C e Controle.....	26
Tabela 4. Tabela comparativa entre a ração C e a composição final.....	31
Tabela 5. Necessidades nutricionais do <i>zebrafish</i> e composição das rações <i>Gemma Micro®</i> e Ideal	32
Tabela 6. Perfil calórico aproximado da ração <i>Gemma Micro®</i> e Ração Idea.....	33
Tabela 7. Índice e Taxa de fertilização da geração 0 e 1.....	35

LISTA DE ABREVIACÕES:

dpf: dias pós fertilização

CP: comprimento padrão

EPA: cido eicosapentaenóico

DPA: cido docosahexaenóico

OR: osmose reversa

Resumo:

Nascimento VL. *Desenvolvimento e padronização de uma ração ideal para a criação de zebrafish (Danio rerio) utilizado como modelo experimental na Rede PREMiUm do Centro de Bioterismo da FMUSP* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A nutrição tem sido identificada como um fator chave que afeta diretamente o crescimento e o bom desempenho reprodutivo do animal quando utilizado como modelo experimental. Desta forma, é essencial uma dieta ideal acessível através da qual o *zebrafish* possa suprir todas suas necessidades nutricionais desde a fase larval até a sua fase adulta sem que haja necessidade de complementá-la com outros tipos de dietas, simplificando o cultivo destes animais. A dieta recomendada nos *guidelines* para a alimentação do *Zebrafish* criado em laboratório é composta por náuplios de Artemias (crustáceo rico em proteínas) em conjunto com uma ração seca rica em proteínas e sais minerais fundamentais para o bom desenvolvimento e reprodução desses animais. Este estudo teve como objetivo desenvolver e padronizar uma dieta ideal de alimentação simples, eficaz, saudável e de baixo custo a fim de obter o melhor desempenho possível nos experimentos desenvolvidos com o *zebrafish*. Foram utilizadas 4 diferentes modelos de dietas preparadas a partir de 3 formas de alimentação que consistiram em náuplios de Artemias, a ração padrão-ouro disponível no mercado europeu denominada *Gemma Micro®* desenvolvida pela *Skretting* e a ração elaborada para este estudo identificada como **Ração Ideal**. Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com a dieta recebida: Grupo1- alimentados com Ração Gemma(G), Grupo 2- alimentados com Ração Gemma + Artemia (G+A), Grupo 3- alimentados com Ração Ideal (I) e Grupo 4- alimentados com Ração Ideal+Artemia (I+A). Para avaliar o desempenho da Ração Ideal, foram analisados comparativamente entre os grupos os parâmetros de sobrevivência, crescimento, maturação sexual e fertilidade em duas gerações de animais (Geração 0 Geração 1). Após a análise e vários testes realizados dentro de um modelo de ração que se ajustasse ao perfil de referência, *Gemma Micro®* e que atendesse as necessidades do *zebrafish* passamos a dar início aos experimentos utilizando a ração que apresentou melhor desempenho que passou a ser denominada Ração Ideal. Em relação a sobrevivência dos animais, observamos que, na Geração 0 os animais dos grupos 3 e 4 apresentaram maiores taxas de sobrevivência em relação aos outros grupos, no entanto na geração 1 todos os grupos apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes. Analisando o crescimento dos animais, na geração 0 os animais dos grupos 2 e 4 apresentaram crescimento semelhante e foram maiores que os animais dos grupos 1 e 3. Na geração 1, os animais do grupo 2 foram os que mais cresceram e o grupo 4 cresceu mais em relação ao grupo 3. Todos os animais estavam maduros sexualmente aos 90dpf e quantidade de ovos viáveis foram maior nos grupos 1 e 2 em ambas as gerações. A Ração Ideal forneceu um aporte calórico suficiente e semelhante á ração *Gemma* para a sobrevivência dos animais nas fases iniciais do desenvolvimento, apresentando taxas de sobrevivência semelhantes entre os grupos. O acréscimo da artêmia á ração ideal foi fundamental para que o crescimento dos animais alimentados com essa ração demonstrassem um crescimento semelhante á ração referência, demonstrando a deficiência proteica da ração ideal. Todas as dietas promoveram maturidade sexual na faixa etária

esperada (a partir de 90dpf) no entanto parece que a fertilidade foi maior nos grupos 1 e 2, possivelmente pelo maior aporte proteico que esses animais receberam. Este estudo conseguiu desenvolver e padronizar uma dieta ideal de alimentação, eficaz, saudável e de baixo custo semelhante ao padrão-ouro utilizado em laboratórios europeus e americanos que, após alguns ajustes em sua formulação poderá ser comercializada e utilizada pelos laboratórios de pesquisa ao redor do país.

Descritores: crescimento e desenvolvimento; fenômenos fisiológicos da nutrição animal; dieta; ração animal; peixe-zebra; aquicultura; reprodução; artemia.

Abstract:

Nascimento VL. *Development and standardization of an ideal ration for the breeding of zebrafish (Danio rerio) used as an experimental model in the PREMiuM Network of the Facility Center* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Nutrition has been identified as a key factor that directly affects the growth and good reproductive performance of the animal when used as an experimental model. In this way, an ideal diet should be accessible through which the zebrafish can meet all their nutritional needs from the larval phase to adulthood without any complement with other types of diets, simplifying the management of these animals. The diet recommended in the Zebrafish feeding guidelines is composed of Artemias nauplii (crustacean rich in proteins) together with a dry diet rich in proteins and minerals that are essential for the proper development and reproduction of these animals. This study aimed to develop and standardize an ideal diet for simple, effective, healthy and low-cost feeding in order to obtain the best possible performance in the experiments developed with zebrafish. Four different diets were prepared from 3 feeding forms consisting of Artemias nauplii, the gold-standard feed available in the Europe, the Gemma Micro® developed by Skretting and the dry feed elaborated in this study identified as Ideal . The animals were divided into 4 groups according to the diet received: Group 1 fed with Gemma (G), Group 2 fed with Gemma + Artemia (G + A), Group 3 fed with Ideal dry feed (I) and Group 4- fed with Ideal dry feed+ Artemia (I + A). To evaluate the performance of the Ideal dry feed, the parameters of survival, growth, sexual maturation and fertility in two generations of animals (Generation 0 Generation 1) were comparatively analyzed between the groups. After several tests performed within a feed model that fits the reference profile, Gemma Micro® and meets the zebrafish needs, we initiated the experiments using the feed that presented the best performance, named Ideal. Regarding the animals survival, we observed that in the Generation 0 animals of groups 3 and 4 presented higher survival rates in relation to the other groups, however in generation 1 all groups had similar survival rates. Analyzing the growth of the animals, in generation 0 the animals of groups 2 and 4 presented similar growth and were larger than the animals of groups 1 and 3. In generation 1, the animals of group 2 were the ones that were bigger than other ones. Animals of group 4 were bigger than group 3. All animals were sexually mature at 90dpf and fertility was evaluated by viable egg count. The number of viable egg were higher in groups 1 and 2 in both generations. The Ideal feed provided a sufficient caloric intake similar to the Gemma for the survival of the animals in the early stages of development, once survival rates were similar between the groups. Adding artemia to the ideal feed was fundamental for animal development, once the growth of the animals fed with ideal plus artemia demonstrated a similar growth to the reference feed, demonstrating the protein deficiency of the ideal feed. All diets promoted sexual maturity at the expected age range (from 90dpf), however it appears that fertility was higher in groups 1 and 2, possibly due to the higher protein intake of these animals. This study was able to develop and standardize an ideal, effective, healthy and low-cost diet similar to the gold standard feed used in laboratories around the world. After some adjustments in its formulation, the ideal feed should be marketed and used in the research laboratories in the country.

Keywords: growth and development; physiological phenomena of animal nutrition; diet; animal food; zebrafish; aquaculture; reproduction; Artemia.

1. Introdução

1.1. Zebrafish como modelo biológico

A utilização do *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo experimental vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Este teleósteo, também conhecido como *paulistinha* é um membro da família dos ciprinídeos, nativo da Índia e do Paquistão inicialmente criado apenas como peixe ornamental (figura 1). Por apresentar características atrativas como modelo experimental, este animal tem sido utilizado em muitos campos da ciência, incluindo doenças humanas, biologia do desenvolvimento e da genética, toxicologia ambiental, indução de vícios por drogas, evolução e aquicultura ⁽¹⁻⁵⁾. Além disso, por conter homólogos próximos de muitas proteínas humanas, como os receptores de estrógeno, o *zebrafish* tem sido também utilizado em estudos com contaminantes ambientais, especialmente os desreguladores endócrinos que podem exercer atividade estrogênica através da ligação a estes receptores ^(6,7). Com a caracterização do genoma do animal, o uso do *zebrafish* tornou-se um vantajoso modelo experimental para o estudo de doenças e genética humana ^(8,9).

Figura 1: *Zebrafish* (*Danio rerio*) conhecido como paulistinha

Trabalhos desenvolvidos demonstram o crescimento em âmbito nacional e internacional na produção científica utilizando o *zebrafish*. A produção científica mundial é de 25.480 registros. O primeiro artigo é datado de 1955, desde então até os finais dos anos 1980 não há profundas modificações em termos de produtividade. É somente a partir dos anos de 1990 que a produção científica no tema tem um crescimento ininterrupto (figura 2).

Fig. 2: Produção científica utilizando o zebrafish como modelo experimental. ⁽⁶³⁾

No Brasil, o estado com maior produção é o Rio Grande do Sul e a Instituição de Ensino Superior com maior número de registros é a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul até 2014.⁽⁶³⁾ De acordo com a The *Zebrafish* Information Network (Zfin), o número de laboratórios cadastrados trabalhando com *zebrafish* aumentou de 228 para 621 no mesmo período. O número de genes sequenciados aumentou de 220 em 1998 para 30.976 em 2009.

As principais características que fazem do *zebrafish* um atraente modelo experimental são: 1- reprodução realizada em pequenos grupos de maneira assíncrona e de fácil manipulação; 2- intervalos de geração curtos com um desenvolvimento embrionário relativamente rápido, eclodindo entre 48 a 72 horas após a fertilização em condições ótimas de crescimento; 3- um grande número de ovos por postura; 4- transparência durante as fases iniciais do desenvolvimento permitindo a visualização da morfologia tecidual interna; 5- fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário externo; 6- embriões relativamente grandes, que permitem rastrear a expressão gênica monitorando genes repórteres (ex: GFP (*green fluorescent protein*) e seus derivados) e o desenvolvimento dos órgãos e tecidos *in vivo*; 6- a alta resistência à manipulação dos embriões em procedimentos como microinjeções e transplante de células ^(12,11,13,10,61,62). Desta

forma o *zebrafish* constitui, uma ferramenta essencial para pesquisa, tornando-se fundamental um conhecimento profundo acerca da sua biologia, reprodução, e manutenção em cativeiro e, em particular, de um ambiente favorável e de suas necessidades nutricionais ^(12,14).

1.2. Características Reprodutivas do Zebrafish:

Com base no comprimento padrão (CP) e nos dias pós-fertilização (DPF), a 28,5C° o ciclo de vida do zebrafish pode ser dividido em três fases distintas: **fase larval**, com duração de aproximadamente 28 dias (3 a 12 mm CP) com início no terceiro DPF; **fase juvenil** com início em torno dos 28/31 DPF (12 a 18 mm CP), apresentando crescimento exponencial e alterações morfológicas; **fase adulta** que ocorre em torno do 3º mês (90 DPF e CP superior a 18 mm), na qual a taxa de crescimento é menor, os peixes atingem a maturidade sexual e são capazes de reproduzir ^(65,66). O crescimento do *Danio rerio* não ultrapassa os 5 cm de comprimento e o dimorfismo sexual pode ser assim definido: fêmeas comumente maiores que os machos, tendo o corpo de forma arredondada, devido a presença dos ovários na região ventral, enquanto os machos apresentam corpo esguio de tonalidade mais escura, o corpo da fêmea predomina o branco prateado e no macho o amarelo ouro. Com cerca de 5 a 7 semanas após a eclosão (10 a 15 mm de comprimento total) inicia o processo de desenvolvimento dos testículos, passando por uma fase interssexual e no terceiro mês (12 a 17 mm de comprimento total) o processo de diferenciação gonadal se torna completo. Porém, o desenvolvimento gonadal depende das condições de criação (meio ambiente) e das características genéticas. ^(67,68)

Em condições ideais, o *Zebrafish* tem capacidade reprodutiva contínua durante o período de maturidade sexual devido sua capacidade de fertilização, sendo essa uma das suas principais vantagens. A liberação de feromônios pelo macho induz a ovulação da fêmea que por sua vez, induz o comportamento de acasalamento no macho através da liberação de espermatozóides na água durante a ovulação, razão pela qual devem ser mantidos juntos compartilhando a mesma água antes do acasalamento. ⁽⁶⁸⁾

1.3. Qualidade físico-química da Água:

Num ambiente favorável, a qualidade da água tem grande impacto na saúde e produtividade do *zebrafish*, uma vez que influencia no seu desenvolvimento, imunidade, fisiologia, anatomia, comportamento e reprodução. Desta forma, os parâmetros de qualidade da água devem ser bem conhecidos e compreendidos, não apenas no seu aspecto geral, mas também em relação às preferências do *zebrafish* (pH, amônia, alcalinidade, temperatura, dureza, salinidade e oxigênio dissolvido)^(12,15).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos ideais da água para o adequado desenvolvimento do Zebrafish ^(12,14).

Parâmetros	Valor
pH	~ 8.0
Temperatura	28.5 °C
Condutividade	800 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$
Salinidade	0.25 - 0.75 ppm
Dureza (CaCO_3)	75 - 200 mg/L
Oxigênio Dissolvido (O_2)	~ 7.8 mg/L
Nitrato (NO_3)	< 200 ppm
Nitrito (NO_2)	< 1 ppm
Amônia (NH_3)	< 0.02 ppm

Um dos grandes desafios encontrados na criação de qualquer peixe em cativeiro, é conciliar a alimentação das larvas e a manutenção da qualidade da água em seu ambiente ⁽⁸⁾. O estresse decorrente da piora da qualidade da água pode reduzir o crescimento e a saúde dos animais, bem como a coloração dos peixes. A qualidade da água e alimentação são fatores interdependentes e diretamente relacionados com o sistema de produção e da ração utilizada, logo a qualidade e quantidade de água, densidade de animais e manejo alimentar são fatores importantes responsáveis pelo desenvolvimento adequado e sobrevivência do *zebrafish*.

1.4. Aspectos Biológicos Nutricionais

Durante os últimos anos, têm sido realizados esforços para melhor compreensão das características biológicas do *zebrafish* importantes para as áreas

de biologia reprodutiva ^(16,17), larvicultura ⁽¹⁸⁾, comportamento, história natural ⁽¹⁹⁾, e principalmente na área de nutrição ⁽²⁰⁾.

Como outros setores da cadeia animal, a piscicultura ornamental tem sua expansão atrelada a otimização dos sistemas de produção e ao emprego de tecnologias específicas, como por exemplo, o conhecimento das exigências nutricionais de cada espécie para formulação de dietas balanceadas aos animais de cultivo ⁽⁶⁰⁾

A grande preocupação relacionada à nutrição do *zebrafish* está diretamente ligada a falta de informações nutricionais que possam levar a padronização de uma dieta ideal. Há grandes variações nas taxas de crescimento dessa espécie por não se ter as exigências nutricionais definidas. Muitos ingredientes que compõem as rações disponíveis no mercado possuem compostos que podem alterar a fisiologia e comportamento do organismo animal ^(20,9).

As fases larval e juvenil são consideradas as mais críticas, devido à elevada vulnerabilidade dos indivíduos aos vários parâmetros de cultivo que se não estiverem em condições ideais, levarão a um alto índice de mortalidade e deformidades que limitam o crescimento saudável. Nestas fases, principalmente na fase larval, é que o alimento tem um papel fundamental e crítico. Uma dieta inadequada aos requisitos nutricionais da fase larval resulta não só na diminuição do crescimento ^(24,25,26,27,48), como também no desenvolvimento dos peixes, contribuindo para a ocorrência de deformações esqueléticas ^(35,49).

O desenvolvimento dos teleósteos de forma saudável é em grande parte dependente da digestão, absorção, assimilação, transporte e metabolismo de determinados nutrientes que compõem o alimento e, principalmente, da composição nutritiva do mesmo. O alimento deve ser, em termos de composição nutritiva, o mais específico e equilibrado possível, de acordo com os requisitos de cada espécie ^(24,25,26,27). Além disso, há uma preocupação com as possíveis contaminações quando do uso de dietas vivas, como as artemias. Neste sentido, é conveniente otimizar a composição do alimento seco na tentativa de substituir os alimentos vivos sem prejudicar a fisiologia animal. ^(58,59)

O crescimento saudável do *zebrafish* atualmente está em grande parte dependente da digestão, absorção, assimilação e metabolismo de determinados nutrientes que compõem o alimento, o que torna indispensável conhecer a

importância de cada um no organismo do zebrafish para a elaboração de uma dieta ideal, como vemos na quadro abaixo :

Quadro 1: Função biológica de cada nutrientes essencial na composição da dieta do *zebrafish* ⁽⁵⁰⁻⁵⁷⁾

Importância Nutricional para o <i>Zebrafish</i>	
Proteínas	Responsável pelo crescimento, reprodução, manutenção geral e reparo dos tecidos. As necessidades proteicas geralmente diminuem com a maturidade.
Ácidos Graxos	Importantes fontes de energia, os ácidos graxos essenciais, são necessários para o crescimento normal, desenvolvimento e promover o crescimento e produção de gametas de alta qualidade e auxiliam na absorção de vitaminas lipossolúveis para diminuir o crescimento e a reprodução de algumas espécies.
Fibras	O uso de fibra na dieta de peixes deve ser ponderada em função de não possuírem valor energético significativo e um trato intestinal curto. A pouca utilização da fibra aumenta a motilidade do trato gastrointestinal (TGI) consequentemente aumenta a velocidade de passagem dos alimentos que diminui a absorção de outros nutrientes. Além disso, seu excesso delimita a ingestão total.
Carboidratos	Sua utilização pode reduzir o catabolismo de proteínas para síntese de glicose, melhorar a eficiência de retenção proteica e diminuir as perdas metabólicas de nitrogênio no ambiente.
Minerais	Importante na ossificação, osmorregulação e funções do sistema nervoso. Podem ser obtidos via dieta ou através do próprio ambiente aquático. São todos naturalmente absorvidos da água circulante através das brânquias.
Vitaminas	Importante para um adequado funcionamento do seu metabolismo ácido ascórbico e ácido retinóico, são importantes na produção de gametas. Artigos que comentam sobre a importância das vitaminas não descrevem a quantidade ou concentração média que deve ser usada, porém referem ser pouca quantidade.

1.5. Dietas mais comumente utilizadas na criação do *zebrafish* em laboratório

Uma maneira muito utilizada de suprir as necessidades nutricionais de *zebrafish* é através da implementação das dietas vivas como artemias (pequeno crustáceo) (figura 3.a) ,rotíferos (diminutos animais aquáticos) (figura 3.b) e paramécios (protozoário ciliado)(figura 3.c).

Fig 3.a. *Artemia sp*

b. *Rotifera*

c. *Paramécia*

Todas elas compartilham características favoráveis, como facilidade de cultivo, perfil nutricional balanceado, alta digestibilidade, atratividade e aceitabilidade. Estas dietas são bastante utilizadas como alimento principalmente na fase larval do *zebrafish* e são consideradas a principal fonte de proteínas, podendo ser utilizadas até a fase adulta^(12,30,29,31). No entanto a grande desvantagem da utilização de alimento vivo é maior chance de contaminação no processo de cultivo.

Dentre os organismos utilizados como alimento vivo na larvicultura de organismos aquáticos, as artemias (*Artemia* sp.) são as mais amplamente empregadas⁽³⁴⁾.

As razões para este sucesso estão na praticidade e conveniência de sua obtenção, visto que os cistos secos em fase latente são facilmente obtidos em grandes quantidades⁽³⁸⁾. A artemia é considerada um dos principais alimentos na fase inicial do crescimento destes animais e o esforço de investigação tem incidido sobre seus aspectos nutritivos, as suas propriedades enquanto presa viva para uso em aquicultura e sobre o modo como é utilizada quando consumida pelos peixes. O valor nutritivo das artemias varia de acordo com seu estágio de desenvolvimento, da origem dos cistos e do alimento oferecido às mesmas. Embora seja um alimento altamente nutritivo no estágio após a eclosão do cisto, a artemia nesta fase é bastante pobre em determinados ácidos graxos, como o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e, especialmente, o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3)⁽³⁰⁾, nutrientes bastante importantes para o desenvolvimento de peixes na fase larval. Devido às carências nutritivas específicas das artemias, diversas estratégias de enriquecimento nutricional têm sido aplicadas para otimizar o crescimento de forma saudável e contribuir, conseqüentemente, para a qualidade dos animais em cativeiro^(29,30 e 31). Embora as quantidades nutricionais ainda não estejam determinadas, sugere-se que a necessidade de proteína estimada seja levada em conta para formular uma dieta mais adequada, econômica e menos poluente para esta espécie.⁽⁴²⁾

Há vários tipos de formulações de dietas secas disponíveis no mercado nacional para o uso em peixes ornamentais, porém nenhuma específica para *zebrafish* e, como já dito anteriormente, muitos dos ingredientes utilizados contêm compostos que podem alterar a fisiologia, o comportamento e o desenvolvimento dos animais.

Com o aumento do uso do *zebrafish* como modelo experimental, rações comerciais específicas têm aparecido no mercado internacional na última década (32,30).

A *Gemma® Micro*, produzida pela *Skretting*, tem sido considerada pelos criadores europeus a melhor dieta para a criação de *zebrafish*. Estudos demonstraram que o uso desta ração no regime alimentar destes animais tem influenciado fortemente no crescimento e na reprodução destes animais, promovendo até 5% no ganho de peso corporal, em comparação com o uso de outras dietas e principalmente, em relação ao uso de artemias devido os níveis deficientes de ácidos graxos poliinsaturados essenciais como citado anteriormente. Mesmo com uma formulação balanceada com nutrientes comprovadamente importantes como proteínas e carboidratos, a *Gemma® Micro* também é rica em ácidos graxos com níveis definidos de DHA, EPA e outros ácidos graxos essenciais (31). Estudos demonstram que o uso da ração *Gemma® Micro* como dieta principal permite a eliminação de alimentos vivos e outros complementos na dieta do *zebrafish*(33), no entanto, esta ração não está disponível em nosso meio e há algumas limitações quanto a sua aquisição devido a ausência de representantes e/ou distribuidores no Brasil, o alto custo do produto e grande dificuldade de importação.

As rações comercializadas em nosso meio são desenvolvidas para o cultivo de peixes ornamentais em geral e, quando comparadas às rações específicas para *zebrafish*, observamos deficiências importantes de nutrientes essenciais ao desenvolvimento destes animais.

Portanto é essencial que os animais obtenham um aporte nutricional completo, e que possamos determinar os ingredientes ofertados de tal forma que a dieta venha contribuir não só para uma boa saúde do animal, mas também para manutenção da qualidade da água determinando melhores resultados nos estudos realizados e otimizando a sua produção em larga escala.

2. Justificativa

Com o grande aumento de estudos realizados com o *zebrafish* (*Danio rerio*) em pesquisas biológicas e genéticas, surge a preocupação com fatores que promovem a qualidade de vida e o alto rendimento no cultivo desses animais. Podemos, sem dúvida, afirmar que a nutrição tem sido identificada com um fator chave que afeta diretamente os pontos importantes que contribuem para o bom desempenho do animal quando utilizado como modelo experimental, no entanto, as necessidades nutricionais diárias para esta espécie ainda não foram totalmente estabelecidas. Torna-se portanto, fundamental o estabelecimento indireto destas necessidades através da elaboração de uma dieta ideal acessível através da qual o *zebrafish* possa suprir todas suas necessidades nutricionais desde a fase larval até a sua fase adulta sem que haja necessidade de complementá-la com outros tipos de dietas, simplificando o cultivo destes animais e produzindo indivíduos saudáveis com alto rendimento, características fundamentais de matrizes um laboratório multiusuário.

3. Objetivo primário:

- Desenvolver e padronizar uma dieta ideal de alimentação simples, eficaz, saudável e de baixo custo de forma que se possa obter um desempenho de excelência nos estudos desenvolvidos na Unidade de *Zebrafish* da Rede PREMiUM da FMUSP.

4. Objetivo secundário:

- Analisar a influência da dieta ideal na taxa de sobrevivência, no crescimento, na maturidade sexual e fertilidade dos animais comparando com a dieta padrão ouro (*Gemma® Micro*).

5. Material e Métodos

Este projeto de estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob o número 160/15.

O projeto foi totalmente desenvolvido na Unidade *Zebrafish* do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em parceria com a Rhoster Indústria e Comércio Ltda. a qual desenvolveu a “Ração Ideal”.

Obtenção dos animais

Os animais utilizados são peixes da espécie *Danio rerio* da linhagem AB, também conhecido como paulistinha ou **zebrafish**. Todas as etapas dos experimentos foram realizadas em triplicatas. Desta forma foram distribuídos em grupos de 25 animais, criados e mantidos em tanques de 3,5 litros no sistema *Zebtec Standalone (Tecniplast, USA)*, sob condições controladas de temperatura (28°C), pH (~7.5), condutividade (400 a 530 µs) e luminosidade, isto é fotoperíodo de 14hs dia/10hs noite como previamente padronizado por Westerfield, 2000 ⁽¹⁴⁾ (Figura 4).

Figura 4: Modelo Sistema Zebtech- Unidade Zebrafish Biotério- FFMUSP

O experimento foi iniciado com o acasalamento das matrizes criadas na Unidade de *Zebrafish*, realizados em tanques de 500 mL específicos para acasalamento à temperatura de 28°C, com uma média de 1 peixe/0,25 ml na proporção de 1:1 (1 fêmea para 1 macho). A coleta dos ovos foi realizada cerca de 30 min. após a postura. Os embriões foram lavados em meio embriônico (com base em soluções salinas), colocados em uma placa de Petri mergulhados nesse mesmo meio e mantidos em estufa a temperatura de 28°C por até 5 dpf (dias pós fertilização). Neste período os embriões não necessitam ser alimentados ⁽¹⁴⁾. No 6ºdpf os alevinos foram transferidos para o sistema *Zebtec Standalone* em aquários de 3,5L. Esta geração foi denominada Geração 0(F0) e sua prole, Geração 1(F1).

5.1. Etapas para elaboração e preparo da Ração Ideal

A análise dos ingredientes e as informações nutricionais da ração *Gemma Micro®* foram utilizadas como referência em relação principalmente à quantidade de carboidratos, proteínas, gorduras e aporte calórico presentes em sua composição e que são fundamentais na alimentação do *zebrafish* (Tabelas 2 e 3). Estas informações foram utilizadas pela Rhoster Indústria e Comércio Ltda. para a elaboração e confecção da ração Ideal além de algumas características físicas tais como o tamanho das partículas, sua distribuição quando em contato com água, ingestão, palatabilidade, digestibilidade e qualidade nutritiva ⁽²⁰⁾. A *Gemma Micro®* foi obtida através de importação.

A Rhoster está localizada na cidade de Araçoiaba da Serra em SP, indústria com ampla experiência em alimentação animal, colaborou atuando em projetos de pesquisa no Biotério do Instituto de Química usando modelos animais e com a principal missão de atender aos inúmeros pedidos dos pesquisadores que não encontravam no mercado, rações customizadas e hoje comercializadas pela Rhoster como Dietas Experimentais.

No primeiro momento foram elaboradas várias possibilidades quanto a composição e a elaboração das rações a partir das matérias-primas disponíveis. Chegamos a 3 formulações testes que mais se aproximavam da composição da ração *Gemma Micro®* em relação principalmente à quantidade de carboidratos, proteínas e gorduras (Tabela 2):

Tabela 2. Composição das rações testes A, B e C

RAÇÃO A		RAÇÃO B		RAÇÃO C	
INGREDIENTES	%	INGREDIENTES	%	INGREDIENTES	%
Farinha de Carne	5,38	Amido de Milho	10,00	Caseína Láctea	40,38
Caseína Láctea	26,24	Farelo de Soja moído	25,97	Levedura	20,00
Farelo de Soja moído	26,37	Óleo de Girassol	5,00	Farinha de Peixe	10,00
Gordura Vegetal de Palma (spray drying)	12,24	Óleo de Peixe	5,00	Glúten de Milho	10,00
Farinha de Peixe	3,0	Caseína Láctea	28,88	Amido Dextrinizado	6,50
Calcário	1,17	Levedura de Cerveja	15,00	Farelo de Arroz	5,0
Celulose Microfina	2,0	Celulose Microcristalina	3,0	Óleo de Peixe	2,0
Glúten de Milho	10,00	Mix Mineral Vitamínico RhosterFish	3,0	Celulose Microcristalina	2,0
Sêmola Grits moída	8,00	Calcário	1,2	Agar Agar	1,0
MixMineral Vitamínico RhosterFish	3,0	Agar Agar	1,0	Farinha de Milho	1,0
L-Lisina	0,8	Farinha de Trigo	1,0	Fosfato bicálcico	1,0
L-Metionina	0,8	Fosfato bicálcico	0,8	Ácido Fosfórico	1,0
Fosfato bicálcico	1,0	Macrogard	0,15	Macrogard	0,1
				Quelato de Zinco	0,008
				Quelato de Ferro	0,006
				Vitamina A	0,004
				Quelato de Manganês	0,002
				Vitamina D3	0,0007
				Quelato de Cobre	0,0006
				Iodato de Potássio	0,0003
				Selenito de Sódio	0,0001

Uma vez elaboradas as dietas, passamos a realizar os testes com os animais que foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1: Alimentados com a Ração A

Grupo 2: Alimentados com a Ração B

Grupo 3: Alimentados com a Ração C

Grupo Controle: Alimentado com *Gemma*® Micro

Para cada grupo foram montados 3 tanques com 25 animais em cada um onde foram avaliados visualmente a distribuição na coluna de água, flutuabilidade, imersão, ingestão e palatabilidade, além das taxas de sobrevivência dos animais, durante o período de 30 dias. Observamos que em todo o experimento se verificou de alto nível de mortalidade entre o 6º e o 30º dpf .(tabela 3)

Tabela 3 :Número de animais mortos durante o periodo de testes com as rações A,B,C e Controle

Grupo/ Ração	6º ao 10º dpf	11º ao 15º dpf	16º a 20º dpf	21º a 25º dpf	26º ao 30º dpf	Total
1/A	4	10	12	4	4	35
2/B	3	6	3	4	2	18
3/C	0	5	4	0	1	10
4/controle	2	6	3	0	0	11

Fatores como o acúmulo de grumos de ração no fundo dos tanques onde os alevinos ficavam presos quando tentavam alimentar-se, levando a queda nos níveis de oxigênio e alterações físico-química da água entre outros, podem ter causado a alta mortalidade nos 3 grupos. Assim houve a necessidade de reformulação das rações e realização de novos testes. Novos ajustes foram então realizados numa nova formulação a qual foi utilizada para a realização do experimento final . A ração C reformulada foi a que mais assemelhou-se as características da *Gemma*® Micro, devido seus níveis nutricionais ,porém após os testes realizados podemos observar o acúmulo de resíduos e turbidez da água . Após serem feitos novos ajustes na formulação da ração e novos testes na água dos tanques para correção destes imprevistos, passamos então a da inicio ao experimento com a ração final.

5.1. Dietas utilizadas durante o experimento:

A fase larval e juvenil são as mais críticas no cultivo de peixes, devido à elevada vulnerabilidade dos indivíduos aos vários parâmetros de cultivo e, conseqüentemente, à ocorrência de elevada taxa de mortalidade, e ainda à susceptibilidade de desenvolverem deformações que limitam o crescimento saudável.

Como fonte de alimento vivo, foram utilizados náuplios de Artemias, cultivados de acordo com a descrição de Dhert, 1996 e Van Stappen, 1996^(29,38) e 2 “dietas secas”, *Gemma Micro®* e Dieta Ideal.

Os náuplios de artemias foram adquiridos através da descapsulação e eclosão dos cistos secos produzidos e importados dos EUA. Para isso utilizou-se um sistema caseiro constituído por uma 1 garrafa pet de 2 litros com tampa e fundo cortados, mangueira de aproximadamente 1,5 metro de pequeno calibre, um pequeno compressor e pedra porosa para ajudar a aeração. A garrafa foi então utilizada com o fundo para cima e na região da tampa foi feito um furo que foi utilizado para encaixe de uma extremidade da mangueira junto com a pedra porosa e a outra extremidade foi conectada ao compressor. Neste sistema foi acrescentado então 1 litro de água de osmose reversa (OR) com 30 gramas de sal marinho e 3g de cistos de artemias que ficaram em aeração por um período de 12 a 16 horas. Após esse período o sistema é desligado e deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos para que haja a separação dos cistos não eclodidos (permanecem no sobrenadante) e dos náuplios que concentram-se ao fundo que foram recolhidos por sifonagem e lavados até que o excesso do sal seja retirado e então foi diluído em água do sistema e fornecido para os animais dos grupos 2 e 3 a partir da fase larval 2.

5.3 Desenho experimental:

Ao 6^o.dpf, antes de serem levados para o sistema e antes de ser iniciada a alimentação, os animais foram medidos .(Figura 5 e 6)

Fig. 5: Alevino do *Zebrafish* com 6 dpf (fase larval)

Fig. 6: Mensuração do alevino para início de experimento

A partir daí foram avaliados a aceitabilidade do alimento, o crescimento e a taxa de mortalidade dos animais nas fases larval (6°.dpf ao 30°.dpf), juvenil (31°.dpf ao 60°.dpf) e adulta (a partir do 61°.dpf). A partir do 90°.dpf foram analisadas também a maturação sexual e as taxas de fertilização, uma vez que os animais atingem a maturidade sexual neste período. Todos os parâmetros foram analisados em ambas, Geração 0 e Geração 1.

No sistema *Zebtec Standalone*, os animais foram separados em 2 grupos na fase larval e 4 grupos nas fases juvenil e adulta de acordo com o tipo de dieta recebida. Cada grupo foi constituído de 3 tanques com 25 animais em cada um e todos o animais foram alimentados 3 vezes ao dia de segunda a sexta e 1 vez ao dia nos finais de semana. A alimentação foi instituída da seguinte forma:

Fase Larval 1 (do 6° ao 15° dpf): os animais foram divididos em 2 grupos somente porque os animais receberam apenas dieta seca, pois nesta fase eles não tem estruturas desenvolvidas para receberem artemias na dieta. O Grupo 1 recebeu ração *Gemma Micro®* pó e o Grupo 2 recebeu ração *Ideal* pó

. **Fase larval 2** (do 16° ao 30° dpf), a partir desta fase os animais foram divididos em 4 grupos com suas respectivas dietas:

Grupo I- recebeu a ração *Gemma Micro® pó*

Grupo II - recebeu a ração *Gemma Micro® pó* + Artemias

Grupo III- recebeu a ração Ideal + Artemias

Grupo IV- recebeu a ração Ideal.

. **Fase juvenil** (do 31° ao 60° dpf) : os animais foram divididos em 4 grupos conforme descrição acima.

Fase Adulta (do 61 ao 90° dpf), os animais foram divididos em 4 grupos conforme descrição acima. No 90°.dpf os animais foram colocados para acasalamento e a maturação sexual e taxa de fertilização foram analisadas.

Em todos os estágios a quantidade de alimento ofertada aos animais correspondiam a aproximadamente 5% do peso corporal do animal ou uma quantidade tal que fosse consumidas dentro de um período de 5 minutos⁽³³⁾.

A qualidade da água foi analisada através do, pH, da quantidade de nitritos , nitratos, O² dissolvido, amônia e ainda a condutividade e temperatura , com intuito de evitarmos possíveis alterações que pudessem prejudicar os resultados do experimento.

5.4. Parâmetros Analisados nos animais:

Sobrevivência e comportamento dos peixes:

Os peixes foram avaliados diariamente, observando-se alterações externas relacionadas ao crescimento, coloração e alterações morfológicas. Em caso de morte, os peixes foram retirados do tanque.

Avaliação comportamental, interação, movimentos anormais, nado descoordenado, falta de equilíbrio e inquietude foram anotados.

Avaliação da maturação sexual e capacidade reprodutiva foram obtidas através da contagem do número de ovos eclodidos por grupo de animais a partir do 90°. dpf.

5.4.1. Análise da taxa de sobrevivência dos animais

A sobrevivência foi determinada semanalmente, através da subtração e contagem dos animais mortos.

5.4.2. Comportamento durante a alimentação e crescimento dos animais.

A análise comportamental foi feita baseada na avaliação da interação entre os animais e observação dos movimentos anormais, nado descoordenados, falta de equilíbrio, inquietude assim como sinais gerais de intoxicação e alterações da coloração dos animais. Estas informações foram anotadas e levadas em conta nos resultados das demais análises.

O crescimento foi avaliado pela determinação do comprimento padrão (CP) (Figura 7) nas fases larval, juvenil e adulta recolhidos aos 30, 60 e 90 dpf . Para realizar a mensuração dos animais foi utilizado um Paquímetro Digital da marca KingTools LR44 (Figura 6) .

Fig. 7: Comprimento padrão ⁽⁷³⁾

5.4.3. Análise da maturidade sexual e capacidade reprodutiva dos animais:

Ao chegarem na fase adulta reprodutiva, aos 90 dpf, foram coletados dados, para quantificar a maturidade sexual e fertilidade dos animais. Foi realizado o acasalamento entre si dos animais de cada grupo a saber, Grupos I, II, III e IV. Foram separados de forma aleatória 2 machos para 3 fêmeas colocados em tanques de 500 mL específicos para acasalamento à temperatura de 28°C e mantidos durante toda a noite com o objetivo de obtermos uma melhor postura na manhã seguinte . A coleta dos ovos foi realizada cerca de 30 min. após o início do período claro do fotoperíodo. A contagem se deu por separação dos embriões viáveis e não-viáveis após 12, 24, 48 e 96 hs, período em que os animais eclodiram e já era possível visualizá-los em movimento nas placas. Os embriões foram lavados em meio embriônico (com base em soluções salinas), colocados em uma placa de

Petri onde foi feita a contagem e separação dos ovos. Esse processo foi repetido 3 vezes em 3 semanas consecutivas.

5.5. Análise Estatística :

Desenvolvimento dos animais: Para avaliar as diferenças entre os grupos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores (Grupo x Fase).

Reprodução: As diferenças na proporção de ovos viáveis em relação aos não viáveis foram avaliados para todos os grupos, aplicando o teste Chi-quadrado, usando nível de significância 0,05.

Curva de Sobrevivência: Para avaliação da curva de sobrevivência foi utilizado a curva ou gráfico de Kaplan-Meier e para verificar a diferença da curva de sobrevivência , foi realizado o teste de Logrank ,comparando cada um dos grupos aos pares. Este é um teste não-paramétrico usado para comparar curvas de sobrevivência. Para este teste, foi estabelecido o nível de significância 0,05. corrigido para múltiplas comparações pelo método de taxa de descobertas falsas.

6. Resultados

6.1. Formulação da Ração ideal

Após a análise e testes realizados dentro de um modelo de ração que se ajustasse a um perfil de referência que atendesse as necessidades do *zebrafish* , ficou constatado que a ração C se ajustava-se a esse perfil. Desse modo, passamos a dar início ao experimento elaborando a ração que apresentou melhor desempenho (Tabela 4).

Tabela 4 : Tabela comparativa entre a ração C e a composição final

<i>Análise</i>	<i>Ração C</i>	<i>Composição final (Ração Ideal)</i>
<i>Proteína Bruta (%)</i>	48,84	37,71
<i>Extrato Estéreo (%)</i>	10,51	2,0
<i>Cinzas (%)</i>	7,69	3,93
<i>Fibra Bruta (%)</i>	1,22	1,71

Cálcio (%)	0,75	1,04
Fósforo (%)	0,84	0,87
Sódio (%)	0,50	0,1
Ferro (mg/Kg)	607	436

Efetuuou-se assim a montagem final da ração com a mistura dos itens conforme as porcentagens descrita a seguir: Farinha de Peixe 8%, Lecitina de Soja 3,5% Glúten de Trigo 18,7%, Agar Agar 0,8 %, Caseína Láctea 20%, Celulose MC-101 5%, Óleo de Peixe 5%, Fosfato bicálcico 1%, Cloreto de Sódio 0,1%, Vitamina C 0,05% BHT 0,02% , Amido de Milho 37,33% e o Premix Mineral-Vitamínico 0,5% (composição por kg do produto: vitamina A = 4.600.000 UI; vitamina D3 = 560.000 UI; vitamina E = 12.000mg; vitamina K3 = 2.400mg; vitamina B1 = 4.800mg; vitamina B2 = 4.800mg; vitamina B6 = 4.000mg; vitamina B12 = 4.800mg; ácido fólico = 1.200mg; pantotenato de cálcio = 12.000mg; biotina (vit.H) = 48mg; colina = 65.000mg; niacina = 24.000mg; manganês = 4.000mg; zinco = 6.000mg; iodo = 20mg; cobalto = 2mg; ferro = 10.000mg; cobre = 4mg; selênio = 20mg;).

Tabela 5: Necessidades nutricionais do *zebrafish* e composição das rações Gemma Micro® e Ideal

Análise	Necessidades nutricionais (%)#	Gemma Micro® (%)	Ração Ideal (%)
Proteína Bruta (%)	29 a 60	59	37,71
Extrato Estéreo (%)	25	14	2,0
Cinzas (%)	10 a 15	14	3,93
Fibra Bruta (%)	*	0,20	1,71
Cálcio (%)	*	1,5	1,04
Fósforo (%)	1,5-2,0	2,0	0,87
Sódio (%)	*	0,70	0,1
Ferro (mg/Kg)	*	100	436

Informações sobre a Gemma Micro® foram retiradas do rótulo do fabricante; #necessidades nutricionais ⁽⁴⁰⁾. *valores nutricionais não determinados

Tabela 6: Perfil calórico aproximado da ração Gemma Micro® e Ração Ideal

<i>Análise</i>	<i>Gemma Micro (kcal %)</i>	<i>Ração Ideal (kcal %)</i>
PB (Proteína Bruta)	57,39	29,71
CB (Carboidrato)	4,53	66,74
LP (Lipídeos)	38,08	3,55
Ração (kcal/g)	4,02	5,1

Obtida a formulação final da **ração Ideal**, os grupos de animais foram separados, alimentados com suas respectivas dietas e cada parâmetro foi analisado.

6.2.Taxa de Sobrevivência :

Durante todas as fases de desenvolvimento dos animais foi observado uma variação na quantidade de animais mortos como vemos a seguir:

No eixo y (vertical) do gráfico está a probabilidade de sobrevivência calculada pelo estimador de Kaplan-Meier, e no eixo x (longitudinal) o número de dias em que foram feitas avaliações de possíveis mortes.

Fig.8: Representação Gráfica da taxa de sobrevivência da geração 0

Fig.9: Representação Gráfica da taxa de sobrevivência da geração 1

Fig.10: Representação Gráfica da taxa de sobrevivência ambas gerações

Observou-se que, no gráfico da geração 0, os peixes alimentados com ração Ideal e Ideal+Artemia tiveram uma melhor curva de sobrevivência. Na geração 1, parece que as rações Gemma, Gemma+artemia e Ideal+artemia levaram a curvas

de sobrevivência superiores ao grupo que se alimentou apenas com ração Ideal. Para Geração 0, houve evidência de maior sobrevivência para o grupo alimentado com ração ideal+artemia em comparação com os grupos alimentados com ração Gemma (G vs. IA: $\chi^2 = 8.31$, pfd = 0.012) e Gemma+artemia (GA vs. IA: $\chi^2 = 6.44$, pfd = 0.033). Todas as outras comparações não mostraram evidência de diferença significativa (G vs. GA: $\chi^2 = 0.21$, pfd = 1; G vs. I: $\chi^2 = 4.12$, pfd = 0.127; GA vs. I: $\chi^2 = 2.82$, pfd = 0.28; I vs. IA: $\chi^2 = 1.15$, pfd = 0.851)

Para a Geração 1, houve evidência significativa para maior sobrevivência do grupo que recebeu ração Gemma comparado com a ração Ideal (G vs. I: $\chi^2 = 5.96$, pfd = 0.029). Todas as outras comparações não mostraram diferença significativa (G vs. GA: $\chi^2 = 0.39$, pfd = 1; G vs. IA: $\chi^2 = 0.39$, pfd = 1; GA vs. I: $\chi^2 = 3.21$, pfd = 0.146; GA vs. IA: $\chi^2 = 0$, pfd = 1; I vs. IA: $\chi^2 = 4.04$, pfd = 0.089)

6.3. Crescimento dos animais:

Para cada modelo de dieta dada aos animais foram registrados os níveis de mortalidade nos grupos triplicados, em amostras de 75 indivíduos, de maneira que pudéssemos estudar eventuais divergências nestes parâmetros. De um modo geral, em todos os tratamentos foi verificado um pico de mortalidade entre os 7 e os 15 dpf. Durante a transição da fase larval para fase juvenil foram observados que alguns animais dos Grupos alimentados com Ração Ideal e Ração Ideal + Artemias apresentaram um atraso no desenvolvimento/crescimento quando comparados aos animais alimentados com Ração Gemma + Ração Gemma e Artemias somente; porém após a fase juvenil, iniciando a fase adulta, observou-se que esses animais se desenvolveram de tal forma que alcançaram o tamanho dentro do esperado para essa fase .

O resultado mais baixo de taxa de crescimento específico foram respectivamente para o tratamento da ração com Ideal e Ideal + Artemias ,cuja média foi significativamente diferente das médias dos outros tratamentos ($p < 0,05$). E os resultados mais altos foram para os tratamentos com a ração Gemma +Artemias e ração Gemma, não havendo evidência para diferença entre as médias entre si e significativamente diferentes das médias dos tratamentos anteriores.

Fig.11: Representação Grafica da média desenvolvimento dos animais em ambas gerações

Quando comparados os grupos entre si na fase juvenil e adulto, estes demonstraram que quando utilizamos a ração Gemma e a ração Gemma + artemias, não houve diferença significativa no resultado final no desenvolvimento dos animais, o que demonstrou que apenas com o uso da ração Gemma como forma de alimentação para o zebrafish é o suficiente em sua dieta, não havendo a necessidade do uso de artemias. Porém no grupo da Ração Ideal e o ração Ideal + artemias os animais tiveram um resultado abaixo do esperado, quando comparados aos grupos alimentados com a ração Gemma e ração Gemma + artemias. No entanto ao ser comparado o grupo alimentado com a ração Gemma e o grupo alimentado com a ração Ideal + artemias, vemos que também não houve diferença significativa o que demonstra assim que quando utilizado em conjunto com a artemia, a ração Ideal pode ter resultados satisfatórios.

Para avaliar o desenvolvimento dos peixes, o comprimento foi medido em quatro fases: inicial, larval, juvenil e adulto. O boxplot abaixo mostra a distribuição do comprimento dos peixes em cada uma dessas fases para todos os grupos.

Fig.12: Boxplot do desenvolvimento dos animais em ambas gerações

Para a geração 0, esta análise mostrou efeito principal significativo para os fatores Grupo ($F(3,937) = 36.5$, $p < 0.001$) e Fase ($F(3,937) = 3072.04$, $p < 0.001$), assim como interação significativa Grupo x Fase ($F(9,937) = 13.99$, $p < 0.001$). Como a principal variável de interesse é a comparação entre os grupos independente da fase, foi feita apenas a análise de comparações dos pares para o fator principal do grupo. Comparações posteriores usando o método de Tukey, mostraram que o efeito principal grupo foi devido ao maior comprimento dos peixes alimentados com ração Ideal+Artemia e Gemma+Artemia em comparação com os outros dois grupos (GA vs. G: diferença = 1.44 mm, $p < 0.001$; GA vs. I: diferença = 2.16 mm, $p < 0.001$; IA vs. G: diferença = 1.21 mm, $p < 0.001$; IA vs. I: diferença = 1.92 mm, $p < 0.001$). Por sua vez, os grupos que se alimentaram com ração gemma ou ideal com adição de artemias não diferiram entre si (diferença = 0.23 mm, $p =$

0.763). Para os grupos alimentados sem Artemias, o grupo Gemma teve maior comprimento do que o grupo alimentado com ração Ideal (diferença = 0.71 mm, $p = 0.019$).

Para a geração 1, a análise de variância mostrou efeito principal significativo para os fatores Grupo ($F(3,1048) = 111.35$, $p = 0.001$) e Fase ($F(3,937) < 3043.2$, $p < 0.001$), assim como interação significativa Grupo x Fase ($F(9,1048) = 14.73$, $p < 0.001$). Comparações posteriores mostraram que o efeito principal grupo na geração 1 foi devido ao maior comprimento do grupo alimentado com ração Gemma+Artemia em comparação aos outros grupos (GA vs G: diferença = 1.12 mm, $p < 0.001$; GA vs. I: diferença = 4.28 mm, $p < 0.001$; GA vs IA: diferença = 1.75 mm, $p < 0.001$), além do grupo alimentado com ração Gemma ter atingido maior comprimento do que os grupos alimentados com ração Ideal (G vs. I: diferença = 3.16 mm, $p < 0.001$; G vs. IA: diferença = 0.63 mm, $p = 0.039$). Por fim, o grupo alimentado com ração Ideal+Artemia cresceu mais que o grupo alimentado apenas com ração ideal (IA vs. I: diferença = 2.53, $p < 0.001$).

6.4. Maturidade sexual e fertilidade dos animais:

A análise mostrou que os animais alimentados com a ração Gemma e Gemma + Artemias tiveram um número maior de embriões viáveis comparados ao que foram alimentados com a Ração Ideal e Ração Ideal + Artemias.

A capacidade dos animais separados por dieta e induzidos a desova e fertilização de ovos foi testada ao cruzá-los com animais da mesma idade e sexo oposto. A frequência de ovos fertilizados após um período de desova de 24 horas foi de 89% para o grupo controle alimentados com a Gemma ($n = 75$), 82% para o grupo tratados com Gemma + Artemias ($n = 75$) e 58% para Ideal ($n = 16$) e de 70% da ração Ideal +Artemias. Isso representou um sucesso de fertilização significativamente menor nos machos tratados em comparação aos machos controle. Os dados da tabela 4 demonstram que a taxa de fertilização no que se refere à porcentagem da postura de cada grupo

Tabela 7 - Índice e Taxa de fertilização da geração 0 e 1

Tipo de dieta	F0				F1			
	nº total de ovos	Ovos viáveis	Ovos não viáveis	% fertilização	nº total de ovos	Ovos viáveis	Ovos não viáveis	% fertilização
Gemma	529	420	109	79	493	438	55	89
Gemma +Artemias	573	421	152	73	375	328	47	87
Ideal	409	248	161	61	503	412	91	82
Ideal +Artemias	213	143	70	67	209	172	37	82

Analizando a reprodução dos animais através do teste qui-quadrado foi observado diferenças na proporção dos ovos viáveis em relação aos não viáveis para todos os grupos nas 2 gerações. Os resultados demonstraram que houve diferença significativa na proporção de ovos viáveis e não viáveis entre os grupos para ambas as gerações (Geração 0: $\chi^2 = 42.92$, $p = 0.001$; Geração 1: $\chi^2 = 12.53$, $p = 0.006$). Na figura abaixo a proporção de ovos que não são viáveis parece maior para a ração ideal do que gemma em ambas as gerações.

Fig.13: Dado de proporção de viabilidade dos ovos em ambas a gerações

7. Discussão:

O número de estudos voltados ao desenvolvimento da alimentação ideal para o zebrafish tem aumentado gradativamente nos últimos anos, suscitando inúmeras e importantes implicações para o sucesso do zebrafish. Com base nisso, este trabalho buscou elaborar uma ração Ideal a fim de ser disponibilizada comercialmente, o que é um diferencial quando comparado a alguns trabalhos desenvolvidos no meio científico. Para isso, foram comparadas quatro tipos de dietas distintas, levando em consideração os parâmetros de mortalidade e crescimento nas três fases de desenvolvimento dos animais: larval, juvenil e adulta reprodutiva (30, 60 e 90 dpf respectivamente) e o de reprodução apenas na fase adulta reprodutiva (90 dpf). Os resultados aqui discutidos terão como base artigos científicos já existentes⁽³³⁾.

Embora o fator de desenvolvimento dos peixes, não seja um indicativo isolado da saúde do animal, quando analisado em conjunto com outros parâmetros esse fator tem grande importância na determinação da mesma. Neste estudo, observamos que o uso da ração Gemma Micro na dieta do zebrafish tem apresentado um desempenho satisfatório o qual tem contribuído nos níveis de sobrevivência, desenvolvimento, crescimento e reprodução dos animais sem que dessa forma seja necessário complementar com outros suplementos como por exemplo artemias, que é muito comum utilizá-la na alimentação do zebrafish. Os resultados demonstraram que níveis de desenvolvimento dos animais dos Grupos alimentados com Ração Ideal e Ração Ideal + Artemias apresentaram um atraso no desenvolvimento/crescimento quando comparados aos animais alimentados com Ração Gemma + Ração Gemma e Artemias somente, mesmo que na fase adulta tenham alcançado o tamanho padrão, isso demonstra que provavelmente devido a alguma deficiência nutricional presente na ração de maior importância para a transição da fase larval/juvenil. No entanto, se comparada a fase adulta, grupo alimentado com a ração Gemma e o grupo alimentado com a ração Ideal + artemias, não tiveram diferença significativa o que demonstra assim que embora haja a necessidade de ajustes, podemos considerar a possibilidade da elaboração e uso da ração Ideal quando dada em conjunto com a artemia aos animais. Além disso, fatores como a má ingestão do alimento, variação de temperatura externa ou até mesmo fatores genéticos podem implicar nessa variação. Alguns fatores externos

relacionados à manutenção do sistema onde os experimentos foram realizados podem ter contribuído com esses resultados, pois embora a qualidade físico-química da água fossem regularmente analisada e os parâmetros estivessem dentro da normalidade, alguns dos acessórios constituintes do sistema como lâmpada UV e filtros não estavam sendo trocados com a mesma frequência devido à questões contratuais e/ou manutenção de equipamento, o que provavelmente implicou tanto no desenvolvimento, quanto nos parâmetros de sobrevivência e reprodução.

Observado-se que na reprodução houve diferença significativa dos animais alimentados com a ração Gemma e Gemma +Artemia quando comparado com ao grupo da ração Ideal e Ideal +Artemia. Embora estudos futuros devam se concentrar em corrigir os erros cometidos com no preparo das dietas produzidas para o zebrafish para que melhorem as taxas de reprodução comparando com a taxa de sucesso dos cruzamentos, os resultados correspondentes apresentados demonstram claramente à comunidade do zebrafish a importância de alimentação com dietas definidas e a possibilidade de termos uma dieta de origem nacional adaptada às condições dos animais num território tropical. No geral, a maior preocupação por parte do meio científico é que o animal tenha o maior número de postura possível, seguido de ovos viáveis com qualidade que possam trazer bons resultados ao seu experimento. (72) No entanto a boa nutrição, tem sido considerado um dos principais fatores que tem implicado na reprodução dos animais (73,74). Foi observado neste estudo que a quantidade de ovos viáveis comparados aos ovos não viáveis dos grupos alimentados com a ração Gemma e Gemma+Artemias tiveram um número muito maior comparado ao grupo alimentado com as dietas ração Ideal e Ideal +Artemias, isso provavelmente ocorreu devido a deficiência de algum componente da ração, a qual não foi possível uma análise minuciosa a fim de identificar.

Vemos que a quantidade de ovos viáveis que podem ter ocorrido em função da composição da dieta, caracterizando assim, a necessidade de novos ajustes em sua composição a fim de termos resultados mais próximos aos da ração de referência. Mesmo nestas condições, num âmbito geral, os dados apresentados neste trabalho referente ao grupo alimentado com ração Ideal+Artemias quando comparado ao grupo alimentado com a ração de referência, apresentaram

resultados que embora não estivessem dentro do esperado , foi satisfatório e promissor, havendo assim a necessidade de maior investigação para obtenção de um resultado mais efetivo.

7.1. Limitações na Elaboração da Ração

Dentre os obstáculos enfrentados , podemos observar que embora tenhamos a disponibilidade dos ingredientes para compor uma dieta completa, muitas vezes quando misturados podem trazer um resultado inesperado em função da quantidade dos ingredientes, podendo implicar num excesso ou na deficiência de certos nutrientes importantes, causando desequilíbrio nutricional na composição da ração.

Para que uma ração possa ser considerada padrão no consumo dos animais, é importante que haja uma interação entre o animais e sua alimentação. Fatores como peso, distribuição na coluna de água, período que permanece na superfície e o tempo que leva para imergir corroboram essa interação. O extrusamento é o que determina essa característica.

Extrusão é um processo de tratamento térmico do tipo HTST (High Temperature Short Time) que por uma combinação de calor, umidade e trabalho mecânico, modifica profundamente as matérias-primas, proporcionando novos formatos e estruturas com diferentes características funcionais e nutricionais. ⁽⁶⁴⁾

Esse processo de extrusamento e os ajustes com os nutrientes têm um alto custo, isto devido a manutenção deste maquinário e a quantidade de matéria utilizada no extrusamento que por ser de pequena quantidade implicando ainda mais no custo deste processo.

Outro fator, é que quando realizado a mistura de alguns ingredientes, observou-se que a composição final obteve resultados abruptos devido a necessidade de elaboração de um protocolo específico no processamento, e consequentemente na finalização da confecção da ração.

O regime alimentar oferecido tiveram efeitos variáveis e inesperados em relação aos subgrupos 1 e 2 que foram alimentados com a ração Gemma® Micro e Gemma® Micro + Artemias em relação aos grupos 3 e 4. O fato do número de animais mortos nos subgrupos alimentados com esta dieta serem superior em relação ao grupo 3 e 4, não apresentam uma justificativa sustentável neste primeiro momento , porém podemos enumerar algumas possibilidades que podem ter

favorecido tais resultados . Fatores como o acúmulo de resíduos da ração dentro dos tanques possibilitando a baixa nos níveis de oxigênio da água para os animais, alterações físico-química da água, mudanças de temperaturas entre outros, podem ter colaborado nesse processo, caracterizando assim a necessidade de novos testes e reformulação da dieta a fim analisar outros resultados.

No decorrer do experimento foram observados alguns erros relacionadas à ração e o seu desempenho, de forma que foram realizados ajustes para a obtenção de um melhor resultado conforme descrito abaixo.

Durante a alimentação dos animais com a Ração Ideal Rhoster, foi gerado um acúmulo de resíduos e a formação de grumos gelatinosos, fazendo com que os animais ficassem grudados ao se alimentarem, e além disso esses resíduos alteravam as condições físico-químicas da água. Tais fatores contribuíram para o aumento da mortalidade dos animais.

Esse grumos eram formados por alguns ingredientes utilizados naquela composição os quais não dissolviam completamente quando em contato com a água acumulando tanto superficialmente quanto no fundo dos tanques.

Foi necessário realizar algumas alterações na composição da ração, após observado um quadro de desnutrição dos animais. Todos esse fatores contribuíram de forma geral com a demora na finalização da ração e consequentemente com o atraso do desenvolvimento do experimento

Com base nos conhecimentos adquiridos a partir deste estudo, foram identificados vários fatores os quais devem ser levados em consideração nos novos ensaios.

O próximo desafio será aplicar todo o conhecimento já obtido no zebrafish diante dos experimentos realizado de forma a corrigir os erros cometidos. Ajuste dos ingredientes, principalmente dos níveis proteicos, balanceando os nutrientes de forma que tenhamos uma composição adequada e assim, alcancemos os resultado esperados. Estão sendo realizadas novas parcerias que irão colaborar para o melhor ajuste dos ingredientes através do fornecimento de equipamentos e maquinários de forma a contribuírem para a qualidade físico-química da ração . Essas características são importantes, pois torna a ração mais atraente e palatável para o *zebrafish*. A aquisição de matéria prima importantes na elaboração da ração Ideal, de modo que cumpra os requisitos em sua composição de acordo com as

exigências desse trabalho. A elaboração de protocolos para confecção da dieta, de maneira que tenhamos melhores resultados. Os nauplius de *Artemia* parecem constituir dentre as dietas testadas, um alimento bem apropriado ao desenvolvimento do zebrafish, como já verificado em outros trabalhos, sugerindo assim que quando misturada a outros alimentos o resultado tem sido bastante favorável na alimentação do zebrafish.

A plena compreensão das necessidades nutricionais do zebrafish e dos fatores que afetam as necessidades nutricionais requer estudos empíricos de dietas que contêm nutrientes e ingredientes quimicamente definidos. Recomendamos o uso de uma avaliação gradual das necessidades nutricionais alimentares diárias e o valor nutricional dos ingredientes específicos para o desenvolvimento da dieta. Devido a numerosas interações de nutrientes (conhecido ou desconhecido), este processo requer uma reavaliação contínua de nutrientes específicos, como exigências de outros nutrientes são determinadas. O desenvolvimento da dieta permitirá uma avaliação biológica desses nutrientes que afetam o crescimento, reprodução, e outras funções fisiológicas e moleculares.

8. Conclusão:

Com base nos dados aqui apresentados, podemos concluir que :

Quando utilizada a ração Ideal juntamente com *Artemia*, os animais obtiveram um desenvolvimento semelhante aos animais alimentados com a ração Gemma Micro, considerada a ração padrão Ouro na alimentação para o *Zebrafish*.

O grupo alimentado somente com a ração Gemma Micro, obtiveram resultados satisfatórios, demonstrando assim a efetividade da qualidade desta ração, quando oferecida sem a complementação de dietas vivas.

Este estudo conseguiu desenvolver e padronizar uma dieta ideal de alimentação, eficaz, saudável e de baixo custo semelhante ao padrão-ouro utilizado em laboratórios europeus e americanos que, após alguns ajustes em sua formulação poderá ser comercializada e utilizada pelos laboratórios de pesquisa ao redor do país.

9. Referências:

- 01-Grunwald, D., Eisen, J., 2002. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics* 3, 717–724.
- 02- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research International* 15, 394–404.
- 03- Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S., 2008. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* 154, 1400–1413.
- 04- Cañestro, C., Yokoi, H., Postlethwait, J., 2007. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nature Reviews Genetics* 8, 932–942.
- 05- Ulloa, P., Iturra, P., Niera, R., Araneda, C., 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21, 649–666.
- 06- Parng C, Seng WL, Semino C, McGrath P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol* 2002; (1):41–48.
- 07- Costache AD, Pullela PK, Kasha P, Tomasiewicz H. Homology-Modeled Ligand-Binding Domains of Zebrafish Estrogen Receptors , $\beta 1$, and $\beta 2$: From in Silico to in Vivo Studies of Estrogen Interactions in *Danio rerio* as a Model System - *Molecular Endocrinology*, Endocrine Soc. 2005
- 08- Dammski,A.P.,Muller,B.R.,Gaya,C.,Regonato,D.; (2011);Zebrafish Manual de Criação em Biotério-Universidade Federal do Paraná
- 09- Gonzales, J. M. (2012). Preliminary Evaluation on the Effects of Feeds on the Growth and Early Reproductive Performance of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS, 51(4), 412–417.
- 10- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. (1995) Stages of Embryonic-Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203, 253-310.
- 11- Nusslen-Volhard D C. and Dahm R. Zebrafish: A practical approach. New York: Oxford University Press, 2002
- 12-Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): Are view. *ELSEVIER Science Direct - Aquaculture* 269 (2007) 1–20.
- 13- Lamason, R.L., Mohideen, M.A., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C.,Juryneć, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., Sinha, S., Moore,J.L., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, P.M.,O'Donnell, D., Kittles, R., Parra, E.J., Mangini, N.J., Grunwald, D.J.,

Shriver, M.D., Canfield, V.A. & Cheng, K.C. (2005) SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, 310, 1782-6.

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

15- Zuanon, J.A.S., Salaro, A.L., Furuya, W.M., R. Brasileira de Zootecnia, v.40, p.165-174, 2011

16- Adatto, I., Lawrence, C., Thompson, M., Zon, L.I., 2011. A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged zebrafish embryos. *PLoS One* 6, e21715.

17- Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D.P., Best, J., Coscolla, J., Doherty, A., Ramos, J., Hakkesteeg, J., Wang, C., Wilson, C., Malley, J., Weinstein, B.M., 2011. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 8, 141–146

18- Best, J., Adatto, I., Cockington, J., James, A., Lawrence, C., 2010. A novel method for rearing first-feeding larval zebrafish: polyculture with Type L saltwater rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Zebrafish* 7, 289–295

19- Spence, R., Fatema, M.K., Ellis, S., Ahmed, Z.F. & Smith, C. (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 71, 304-309.

20- Siccardi, A. J., Garriss, H. W., Jones, W. T., Moseley, D. B., D'Abramo, L. R., & Watts, S. A. (2009). Growth and Survival of Zebrafish (*Danio rerio*) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. *Zebrafish*, 6(3), 275–280. doi:10.1089/zeb.2008.055

21- Mead MN. The feed factor: estrogenic variability in lab animal diets. *Environmental Health Perspectives*. 2006;114:A640–A642

22- Ng Y. Hanson S. Malison JA. Wentworth B. Barry TP. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. *Aquaculture*. 2006;254:658–665.

23- Thigpen JE. Setchell KDR. Ahlmark KB. Locklear J. Spahr T. Caviness GR, et al. Phytoestrogen content of purified, open-and closed-formula laboratory animal diets. *Lab Anim Sci*. 1999;49:530–536

24- Gaylord, T.G. & Gatlin III, D.M. (2001) Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 194, 337-348.

25- Bolliet, V., Cheewasedtham, C., Houlihan, D.F., Glineau, A. & Boujard, T. (2000) Effect of feeding time on digestibility, growth performance and protein metabolism in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: interactions with dietary fat levels. *Aquat. Living Resour.*, 13, 107-113.

26- Kim, K.-D. & Lee, S.-M. (2004) Requirement of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids for juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 229, 315-323.

- 27- Vagner, M., Robin, J.H., Zambonino-Infante, J.L. & Person-Le Ruyet, J. (2007) Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture*, 266, 179-190.
- 28- Watts, S. A., Powell, M., & D'Abramo, L. R. (2012). Fundamental Approaches to the Study of Zebrafish Nutrition. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 53(2), 144–160. doi:10.1093/ilar.53.2.144
- 29- Van Stappen, G. (1996) *Artemia*. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture - Fisheries Technical Paper 361 (eds P. Lavens & P. Sorgeloos), pp. 79-251. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome.
- 30- Sorgeloos, P., Dhert, P. & Candreva, P. (2001) Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200, 147-159.
- 31- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C.L. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 130, 477-487
- 32-- Kaushik S, Georga I, Koumoundouros D. Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feed onward: Toward implications on nutrient requirements. *Zebrafish*. 2011;8:87–95
- 33- Lawrence, C., Best, J., James, A., & Maloney, K. (2012). The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, 368, 103-108.
- 34- Blanco-Vives B, Sánchez-Vásquez FJ. 2009. Synchronization to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav* 98:268-275.
- 35--Lall, S.P. & Lewis-McCrea, L.M. (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture*, 267, 3-19.
- 36- Avdesh A, Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D.M., Verdile, G., Martins RN. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments* 2012;69:e4196
- 37- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 5, 353–367.
- 38- Dhert, P. (1996) Rotifers. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture - Fisheries Technical Paper 361 (eds P. Lavens & P. Sorgeloos), pp. 49-78. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, FAO, Rome
- 39- Law JM. Mechanistic considerations in small fish carcinogenicity testing. *ILAR J*. 2001;42(4):274-84.
- 40- Lawrence C. and Harper C. The laboratory zebrafish. 1st edition. Florida: CRC Press, (December 17, 2010).

- 41- Carvalho, A.P., Araújo, L. & Santos, M.M. (2006) Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. *Aquaculture Research*, 37, 1107-1111.
- 42- Czopka T, French-Constant C, Lyons DA. Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Dev Cell*. 2013;25:599–609
- 43- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, Appel B. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci*. 2006;9:1506–1511.
- 44- Pogoda HM, Sternheim N, Lyons DA, Diamond B, Hawkins TA, Woods IG, Bhatt DH, Franzini-Armstrong C, Dominguez C, Arana N, Jacobs J, Nix R, Fetcho JR, Talbot WS. A genetic screen identifies genes essential for development of myelinated axons in zebrafish. *Dev Biol*. 2006;298:118–131.
- 45- Lyons DA, Naylor SG, Scholze A, Talbot WS. Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nat Genet*. 2009;41:854–858
- 46- Monk KR, Naylor SG, Glenn TD, Mercurio S, Perlin JR, Dominguez C, Moens CB, Talbot WS. A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science*. 2009;325:1402–1405.
- 47- Monk KR, Talbot WS. Genetic dissection of myelinated axons in zebrafish. *Curr Opin Neurobiol*. 2009;19:486–490.
- 48- Carvalho, A.P., Araújo, L. & Santos, M.M. (2006) Rearing zebrafish (*Danio rerio*) larvae without live food: evaluation of a commercial, a practical and a purified starter diet on larval performance. *Aquaculture Research*, 37, 1107-1111
- 49- Cahu, C., Infante, J.Z. & Takeuchi, T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227, 245-258.
- 50- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. & Sorgeloos, P. (1997) Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155, 149-164.
- 51- Ronnestad, I., Thorsen, A. & Finn, R.N. (1999) Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, 177, 201-216.
- 52- Yanong, R.P.E. (1999) Nutrition of ornamental fish. *Husbandry and Nutrition*, 2, 19-42.
- 53- Zambonino Infante, J. & Cahu, C. (1999) High dietary levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of Nutrition*, 1195-1200.
- 54- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L. & Hernandez-Cruz, C.M. (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22, 97-107.

- 55- Oliva-Teles, A. (2000) Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International*, 8, 477-492
- 56- Roy, P.K. & Lall, S.P. (2003) Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture*, 221, 451-468.
- 57- Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J. & Bell, J.G. (2008) The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280, 2134.
- 58- Opstad, I., Suontama, J., Langmyhr, E. & Olsen, R.E. (2006) Growth, survival, and development of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) weaned onto diets containing various sources of marine protein. *ICES Journal of Marine Science*, 63, 3203-3205.
- 59- Alves Jr., T.T., Cerqueira, V.R. & Brown, J.A. (2006) Early weaning of fat snook (*Centroponus parallelus* Poey 1864) larvae. *Aquaculture*, 253, 334-342.
- 60- Zuanon, J.A.S.; Salaro, A.L.; Balbino, E.M.; Saraiva, A.; Quadros, M.; Fontanari, R.L. Níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de acará-bandeira. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.35, n.5, p. 1893-1896, 2006.
- 61- Briggs, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative*, Bethesda, v. 282, n. 1, p. 3-9, Apr. 2002.
- 62- Long, Q. et al. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development*, Cambridge, v. 124, n. 20, p. 4105-4111, Oct. 1997.
- 63- Gheno, Ediane Maria; Rosemberg, Denis Broock; Souza, Diogo Onofre; Calabro, Luciana. Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. *Zebrafish*, v. 13, n. 3, p. 1-9, 2016.
- 64- Harper, J.M. A comparative analysis of single and twin-screw extruders. In: KOKINI, J. L.; HO, C.-T.; KARWE, M. V. (Ed.). *Food extrusion science and technology*. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 139-148.
- 65- Singleman C, Holtzman NG. Growth and maturation in the zebrafish *Danio rerio*: a staging tool for teaching and research. *Zebrafish*, 2014; v 11, p 1-11.
- 66- Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*. 2009, v 238, p 2975-3015.
- 67- Maack G, Segner H. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*. 2003; v 62, p 895-906.
- 68- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 2008; v 83, p 13-34
- 69- Fonte a : <https://www.youtube.com/watch?v=C-gA5iGv1EI>
- Fonteb: <https://www.gettyimages.pt/detail/foto/brine-shrimp-fotografia-de-stock/128576908>

Fonte c : <https://pt.wikipedia.org/wiki/Rotifera#/media/File:Rotifera.jpg>

71- Näslund J. 2014. A simple non-invasive method for measuring gross brain size in small live fish with semi-transparent heads. PeerJ 2:e586

72- Laale, H. W . (1977). A biologia e uso do peixe-zebra, *Brachydanio rerio* na pesquisa pesqueira. Uma revisão de literatura . *Journal of Fish Biology* 10 , 121 - 173 .

73. Meinelt T. Schultz C. Worth M. Kurzinger H. Steinberg C. A composição dos ácidos graxos da dieta influencia a taxa de fertilização do zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanon) J Appl Ichthyol. 1999; 15 : 19-23.

74. Meinelt T. Schultz C. Worth M. Kurzinger H. Steinberg C. Correlação de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados n6 com alta taxa de crescimento em peixe-zebra (*Danio rerio*) Comp Med. 2000; 50 : 43–45