



Concurso Público Fiocruz 2023

Pesquisador em Saúde Pública

Prova Discursiva

PE59

Criação e desenvolvimento de modelos de peixes para uso científico

Espelho de Resposta

Pontuação de cada Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 3, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

Questão 01

a) Principais características da reprodução na espécie:

A reprodução em peixes é um processo complexo influenciado por vários fatores, comportamentais e abióticos. Os fatores comportamentais, como a escolha do companheiro, são determinados pelo comportamento de corte e estão relacionados à interação e percepção de uma variedade de elementos, incluindo percepção visual, tátil/auditiva (pela linha lateral) e olfativa. Os fatores abióticos do meio ambiente, incluem a qualidade da água, temperatura, fotoperíodo, alimentação, enriquecimento ambiental e tamanho do tanque. O zebrafish, em condições de biotério, comumente atinge a maturidade sexual entre 3-6 meses pós-fertilização. Como isso varia consideravelmente com as condições ambientais, incluindo densidade populacional, temperatura e disponibilidade de alimento, é mais apropriado relacionar a maturidade reprodutiva ao tamanho do que à idade. Um tamanho padrão, de aproximadamente 23 mm, corresponde à maturidade reprodutiva nessa espécie. Em condições favoráveis, o zebrafish se reproduz continuamente durante a maturidade sexual. As fêmeas são capazes de desovar diariamente, embora o intervalo entre posturas dependa da nutrição, qualidade da água e intensidade de produção. Um intervalo de descanso de uma semana entre posturas é geralmente recomendado para uma melhor produção de ovos viáveis. Entre as principais características que tornam o peixe-zebra um organismo modelo se destaca a desova abundante entre 200 e 300 ovócitos.

b) Importância da manutenção da Temperatura e fotoperíodo adequados para reprodução:

Temperatura: Nos peixes a temperatura afeta praticamente todos os aspectos do comportamento e da fisiologia. O zebrafish está classificado como um peixe euritérmico que suporta um amplo gradiente de temperaturas. No ambiente natural ele habita locais com temperatura de ~6 °C no inverno até ~38 °C no verão. Em laboratório a temperatura da sala ou água é normalmente mantida entre 26-28,5 °C. No entanto, a temperatura ótima recomendada tanto para reprodução como para o desenvolvimento embrionário no laboratório é de 28,5 °C. A temperatura apresenta uma forte influência sobre a diferenciação sexual durante o desenvolvimento embrionário.

Fotoperíodo: Embora o zebrafish tenha sido descrito como uma espécie diurna, estudos revelam que a espécie é capaz de exibir ritmos comportamentais diurnos ou noturnos dependendo das condições de criação (como alimentação e ciclos de temperatura). No entanto, o fotoperíodo apresenta uma forte influência sobre o comportamento reprodutivo de zebrafish. Em laboratório, o zebrafish geralmente desova nas primeiras horas de luz do dia e uma das maneiras mais rápidas de garantir que os peixes não realizem oviposição é manter as luzes acesas por tempo integral. Assim, o ciclo circadiano ideal de luz no laboratório para o zebrafish é geralmente definido em 14 horas de luz e 10 horas de escuridão completa. Este ciclo de claro-escuro imita o ambiente natural sendo o ideal para manutenção do relógio circadiano do zebrafish.

c) Descrição da importância e controle dos parâmetros de qualidade da água que afetam diretamente a reprodução

Independentemente do tipo de sistema de criação adotado, os parâmetros de qualidade da água devem seguir um controle rígido conforme descritos a seguir.

1. pH

O pH da água nos sistemas aquáticos exerce um profundo efeito nos processos fisiológicos dos peixes assim como no funcionamento da comunidade microbiana que os suporta. Além disso, a toxicidade de alguns compostos como amônia, nitrito, metais e medicamentos são fortemente influenciados pelo pH da água. Na maioria dos laboratórios o nível do pH é mantido entre 7.0 e 8.0. Tem sido sugerido um nível mais restrito entre 6.8 e 7.5 (nunca abaixo de 6.0 ou maior que 8.0).

2. Alcalinidade

A alcalinidade representa a medida de todas as bases tituláveis presentes na água. Ela descreve a capacidade da água de neutralizar ácidos fortes, o que ajuda a manter a estabilidade do pH. Em geral, é recomendável manter os valores de alcalinidade dentro de uma faixa de 50-150 mg de CaCO_3/L .

3. Dureza

A dureza da água é uma medida da quantidade de íons divalentes principalmente cálcio e magnésio, e em menor grau, ferro e selênio. Os peixes requerem esses íons para as funções fisiológicas, e eles devem ser fornecidos na água e/ou na dieta aos peixes em cativeiro. O zebrafish é considerado um peixe de “água dura” preferindo água com concentrações acima de 100 mg de CaCO_3/L . É recomendável manter os valores de dureza dentro de uma faixa de 75- 200 mg de CaCO_3/L .

4. Compostos nitrogenados

O nitrogênio amoniacal total consiste em dois compostos, a amônia ionizada (NH_4^+), denominada íon amônio, e a não ionizada (NH_3), amplamente conhecida como amônia. A razão relativa à proporção de cada uma das formas de amônia depende do pH, temperatura e salinidade. O principal produto metabólico excretado pelos peixes é a amônia que é eliminada através do epitélio branquial por difusão e em menor quantidade pelas fezes. A produção de amônia também ocorre durante a decomposição da matéria orgânica (principalmente fezes, alimentos não consumidos e peixes mortos) por bactérias. A amônia não ionizada é altamente tóxica para os peixes devendo ser retirada do sistema. Níveis de amônia acima de 0,02 ppm devem ser evitados. Em sistemas de recirculação, esses níveis são atingidos através da oxidação da amônia a nitrito e em seguida a nitrato por ação de bactérias nitrificantes em um processo conhecido por nitrificação. O produto intermediário desta conversão, o nitrito também é tóxico para os peixes e pode ser problemático em concentrações superiores a 0,1 ppm. A toxicidade pelo nitrato ocorre apenas em concentrações muito altas. Dessa forma, recomendam-se trocas parciais de água como rotina de manutenção a fim de manter o nível de nitrato menor que 50 mg/L.

5. Oxigênio

Baixos níveis de oxigênio dissolvido são os maiores responsáveis por mortalidade de peixes em cultivo do que qualquer outro parâmetro. A solubilidade do oxigênio varia de acordo com a pressão atmosférica, sais e temperatura. Temperaturas elevadas reduzem a solubilidade de oxigênio na água. Em cultivo de zebrafish, a temperatura relativamente alta de manutenção, a densidade de animais nos aquários e a alta frequência de alimentação típica de instalações de alta atividade criam a necessidade de níveis de oxigênio dissolvido próximos da saturação (~7,8 mg/L em 28 °C).

6. Salinidade e condutividade

A salinidade é medida em partes por mil ou da capacidade da água em conduzir eletricidade (condutividade) expressa em microSiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Os níveis de salinidade devem ser estáveis e mantidos $< 5 \text{ g/L}$. A maioria dos sistemas de zebrafish usa água do sistema de abastecimento urbano sem cloro; no entanto, alguns sistemas utilizam água deionizada. A condutividade deve ser de $150\text{-}1700 \mu\text{S}/\text{cm}$, embora seja recomendado um intervalo mais estreito de $300\text{-}1.500 \mu\text{S}/\text{cm}$.

d) Escolha dos animais aptos para reprodução:

Nem todo animal adulto em idade reprodutiva está apto para reprodução de qualidade e, dessa forma, devem ser selecionados machos e fêmeas aptos para reprodução. O primeiro passo para a reprodução é a sexagem dos indivíduos. Zebrafish adultos não possuem um dimorfismo sexual bem visível. Em geral, o dimorfismo só pode ser observado em indivíduos no estágio adulto já bem desenvolvido. Nesse estágio pode-se distinguir as seguintes características: machos possuem o corpo mais delgado e curto; nadadeira anal com coloração mais vibrante (amarelo alaranjada); raios da nadadeira peitoral com a coloração amarelada. Já as fêmeas têm o corpo mais roliço e comprido com ventre mais claro e distendido; presença de uma pequena papila genital e nadadeiras peitorais com raios mais tênues; ausência de coloração vibrante na nadadeira anal; raios da nadadeira peitoral de cor pálida. Um método prático de diferenciação sexual é a presença de tubérculos nos raios da nadadeira peitoral dos machos. Em tanques grandes os peixes geralmente formam pares em vez de grupos, demonstrando uma seleção sexual enquanto em aquários convencionais com altas densidades, a desova em grupo é mais comum.

e) Manifestações do comportamento reprodutivo e táticas utilizadas para melhoria da reprodução;

Os animais exibem rituais de acasalamento antes e durante a desova. Os machos competem pelas fêmeas, estabelecendo e defendendo território. Durante a corte, os machos nadam em círculos com as nadadeiras levantadas, próximos ao local de desova, para atrair a atenção das fêmeas. No momento da desova, o macho nada em paralelo à fêmea e envolve seu corpo, estimulando a liberação de oócitos e liberando espermatozoides simultaneamente. Há competição entre os machos pela atenção das fêmeas, o que leva ao estabelecimento e defesa de territórios. Para a reprodução, os peixes preferem áreas com cascalho, vegetação e águas rasas. Em cativeiro, pode-se adicionar plantas artificiais aos tanques de reprodução para simular o ambiente natural ideal para a desova. Outro fator que deve ser levado em consideração é a existência de fêmeas dominantes, o que pode inibir a desova de fêmeas consideradas subordinadas. Uma maneira de contornar este possível problema é evitar manter os mesmos grupos de fêmeas no mesmo aquário por extensos períodos de tempo.

f) Preparo antecipatório e momento do evento reprodutivo

Para o acasalamento, geralmente os peixes são alojados à tarde ou no começo da noite no tanque de desova e mantidos até a manhã seguinte. Se os embriões coletados precisam ser sincronizados com precisão no mesmo estágio de desenvolvimento, um casal pode ser separado por um divisor no tanque. Este divisor é removido na primeira hora de luz para que ocorra a desova e fertilização. A utilização de grupo de peixes exige uma separação previa de machos e fêmeas que serão colocados em contato na primeira hora de luz. Deve-se escolher animais saudáveis que preferencialmente apresentem características sexuais secundárias: ex. machos com coloração viva, fêmeas com abdômen distendido. A desova em grupo (> 1 casal) apresenta maior produção de ovos fertilizados e maior variabilidade genética. As densidades previamente ajustadas e recomendadas para o sucesso na reprodução variam da seguinte forma:

1. Tanques de mais de 10 L: densidade de 2-3 peixes/L
2. Pequeno grupo: 4-10 peixes em 2 L
3. Casal em 1 L

g) Descrição do protocolo e sistema de acasalamento utilizando locais separados dos aquários de manutenção dos reprodutores:

A eficácia do protocolo de acasalamento irá determinar a quantidade de produção de ovos viáveis. Diferentes protocolos podem ser utilizados para a reprodução do zebrafish em biotérios. Um dos principais e mais utilizados em biotérios por se mostrar bastante prático e eficaz é a realização do acasalamento em locais separados dos aquários onde os animais vivem. Estes sistemas,

comercializados por diferentes empresas, possuem fundo gradeado que se encaixa em recipientes preenchidos de água. Quando ocorre o acasalamento, os ovos passam pelo fundo gradeado e se depositam na parte inferior do recipiente, ficando assim protegidos do canibalismo. Estes sistemas também possibilitam que os ovos sejam facilmente retirados. O tamanho do sistema determinará a quantidade de peixes que podem ser colocados para acasalamento e o cuidado com a manipulação dos embriões após a desova determinará o sucesso da criação.

h) Cuidados com os embriões após desova a até a eclosão das larvas

Os embriões devem ser retirados do sistema de acasalamento o mais rápido possível, evitando possíveis contaminações. Em seguida, devem ser de maneira cuidadosa lavados com água limpa e transferidos para placas de Petri preenchidas com água. Um meio de evitar contaminação é utilizar azul de metileno (0,00003%) dissolvido em água. Após 2 horas os embriões não-viáveis são facilmente identificados por sua aparência esbranquiçada e devem ser imediatamente retirados. Os ovos vão permanecer em recipientes de incubação a temperatura de 28°C até que as larvas eclodam e inflem a bexiga natatória. Os ovos do zebrafish eclodem de 2-3 dias pós-fertilização (dpf). Após esses procedimentos, os ovos ficam em repouso, em recipientes de incubação, até que as larvas eclodam e inflem as bexigas natatórias.

Questão 02

a) Descrição e classificação dos principais agentes estressores em peixes mantidos em laboratório.

Os estressores em peixes podem variar de muito breves (agudos) – por exemplo, perseguição com rede ou predador – até prolongados ou permanentes (crônicos) – por exemplo, superlotação ou hierarquia social. No entanto, os conceitos “agudo” e “crônico” referem-se muito mais à duração das consequências sobre a fisiologia do animal. Estressores potenciais para peixes incluem a alteração de temperatura, fotoperíodo (luminosidade), qualidade da água, pH, oxigênio disponível, suprimento alimentar insuficiente, predação e exposição a toxinas e sons, isolamento e perseguição. O estresse agudo pode ser causado agentes estressores como captura, manejo, transporte, hipóxia, mudança brusca de temperatura.

b) As respostas primárias, secundárias e terciárias dos peixes frente a uma situação de estresse

As respostas fisiológicas frente ao evento estressor podem caracterizar respostas primárias, secundárias e terciárias. Na resposta primária, ocorre a percepção do estresse e consequente ativação dos centros cerebrais e eixos neuroendócrinos (hipotálamo-hipófise-interrenal), estimulando a liberação de catecolaminas e corticosteroides. As respostas secundárias incluem alterações a níveis iônicos e metabólitos no plasma e nos tecidos, características hematológicas e proteínas de estresse. Tudo isso está relacionado aos ajustes fisiológicos associados a realocação energética no intuito de restaurar o equilíbrio, tais como respiração, estado acidobásico, equilíbrio hidromineral, função imunológica e respostas celulares. Nessa resposta secundária ocorre canalização das ações dos hormônios e efeitos imediatos em nível sanguíneo e tecidual, associadas ao aumento da atividade muscular e respiratória (aumento dos batimentos cardíacos, da absorção de oxigênio e mobilização de substratos energéticos), além de alterações cardiovasculares – eventos acionados após a liberação de altos níveis de catecolaminas, liberação de cortisol pela glândula inter-renal e aumento dos níveis circulantes de glicose. As respostas terciárias estendem-se ao organismo e se manifestam em nível populacional, traduzindo a inibição do crescimento, da reprodução e da resposta imune, com limitação da capacidade do animal em tolerar estressores subsequentes ou adicionais manifestando alterações na resistência a doenças, atividade locomotora e comportamental.

c) O “teste de campo” aberto para avaliar o comportamento de ansiedade e estresse no Zebrafish

Um dos testes utilizados para avaliar o comportamento de ansiedade e estresse no Zebrafish é o de campo aberto. o campo aberto é um teste frequentemente utilizado em análises de comportamento animal em pesquisa básica. Em estudos com zebrafish, este teste consiste basicamente em colocar o animal em um aquário simples com dimensões de 11,5cm x 34,5cm x 15,5cm e capacidade para 3-L de água, de cor uniforme, sem divisórias ou estímulos e analisar o seu comportamento durante um intervalo de tempo. Neste experimento, o zebrafish pode nadar livremente em um aquário enquanto tem sua atividade natatória registrada em um vídeo, para análise posterior. O vídeo registrado é

analisado através de softwares contendo ferramentas de rastreamento de locomoção, como Any-Maze, ViewPoint, TopScan e Ethovision. O tempo de teste pode variar de poucos minutos a horas, conforme o objetivo do estudo. Em análises de comportamento de zebrafish em campo aberto são considerados diferentes parâmetros: atividade locomotora (distância percorrida em cm), velocidade média (cm/s), percentual de permanência na profundidade do aquário (tempo em segundos), estado de mobilidade com registro dos movimentos erráticos e freezing (corpo completamente imóvel), momento do primeiro deslocamento até a superfície do aquário (tempo em segundos), entre outros. O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante, de maneira a explorar o aquário como um todo. O comportamento tigmotático (exploração do ambiente através das vibrissas) é frequente, despendendo de 60% a 75% do tempo em testes de 10 minutos. No primeiro minuto, os animais costumam permanecer 70% a 85% do tempo no fundo do aquário, preferência que é reduzida com o passar do tempo e não mais identificada ao décimo minuto. Manifestações de freezing, saltos e movimentos erráticos são pouco observadas em condições naturais do zebrafish. Normalmente, observa-se freezing em 3 a 5% do tempo, poucos episódios de movimentos erráticos e nenhum salto.