

REVISTA

ri

AQUACULTURE BRASIL

EDIÇÃO

II

MARÇO/ABRIL
2018

DIETAS PELETIZADAS

Inovação na
aquicultura marinha
para engorda de polvos



A eletrofisiologia na avaliação da anestesia geral em peixes

Luis André Luz Barbas

Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais
Instituto Federal de Educação
Ciência e Tecnologia do Pará,
Castanhal - PA, Brasil
andre.barbas@hotmail.com

Marcelo Ferreira Torres

Laboratório de Aquicultura de Espécies Tropicais
Instituto Federal de Educação
Ciência e Tecnologia do Pará,
Castanhal - PA, Brasil

Moisés Hamoy

Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará,
Belém - PA, Brasil

A utilização de anestésicos em peixes tende a se tornar uma prática cada vez mais necessária, uma vez que facilita o manejo e favorece uma maior aceitação social da piscicultura, tendo em vista a crescente preocupação global com as questões éticas e de bem-estar animal (Readman et al., 2013). Além disso, têm sido indicados também para uso em peixes por seus potenciais efeitos antiestressantes e antioxidantes. Os anestésicos são substâncias que promovem, de forma reversível, a depressão do sistema nervoso central (SNC) resultando em perda da percepção e da resposta aos estímulos ambientais (Summerfelt e Smith, 1990).

O uso de anestésicos visa reduzir o estresse, que é uma condição inerente aos sistemas de produção intensificados. São aplicados em várias situações cujo manejo dos animais requeiram manipulação direta, como o transporte em sistemas fechados e em altas densidades, abate humanizado, além de métodos de contenção de peixes para fins de reprodução artificial, pesquisa científica e eutanásia de forma humanizada.

A despeito de que o mecanismo preciso de ação dos diferentes anestésicos em invertebrados e peixes ainda precisa ser mais amplamente elucidado, atualmente é aceito que o anestésico atua promovendo uma depressão generalizada do SNC por ação sobre os axônios, através da liberação de neurotransmissores ou por modulações na permeabilidade da membrana, ou ainda, uma combinação de ambos os eventos, sem intercorrências durante a recuperação (Ross e Ross, 2008). Em peixes a anestesia pode ser induzida através de banhos, ou por via oral, ou através de injeção com uma variedade de substâncias. A escolha de um anestésico apropriado depende principalmente da sua eficácia de indução e imobilização com rápida recuperação (Gilderhus e Marking, 1987; Burka et al., 1997; Ross e Ross, 2008). Um anestésico ideal deve ser atóxico, de baixo custo, de fácil administração e resultar em rápida indução com recuperação calma (Treves-Brown, 2000).

Entre as substâncias utilizadas, estão as drogas sintéticas e produtos naturais, como extrativos vegetais, por exemplo. Dentre os primeiros, a tricaina meta-

A utilização de anestésicos em peixes tende a se tornar uma prática cada vez mais necessária, uma vez que facilita o manejo e favorece uma maior aceitação social da piscicultura.

nossulfonato ($C_9H_{11}O_2N + CH_3SO_3H$), também conhecida por MS-222 é atualmente o anestésico mais utilizado no mundo (Popovic et al., 2012). É a única droga anestésica aprovada pelo Departamento Americano de Controle de Drogas e Alimentos (US Food and Drug Administration) para uso em peixes destinados ao consumo humano, sendo rotineiramente utilizada para procedimentos não invasivos e cirúrgicos, além de recomendada como o primeiro passo para realização de eutanásia para a maioria dos peixes de laboratório (Readman et al., 2013). Outros anestésicos sintéticos frequentemente utilizados na aquicultura são:

- 2 - fenoxietanol (PE)
- Etanol
- Éter dietílico
- Benzodiazepinas
- Halotano
- Lidocaína
- Cetamina
- Medetomidina
- Propofol
- Dióxido de carbono
- Benzocaína (etil aminobenzoato)

Anestésicos Naturais

Diversos produtos naturais também têm sido propostos para utilização como anestésicos na aquicultura. O óleo de cravo, que tem por principal componente ativo (70% a 90%) o eugenol [2-metoxi-4-(2-propenil) fenol] foi investigado em diversos estudos e indicado como um produto natural, eficiente para indução anestésica a um bom custo benefício (Walsh e Pease, 2002; Barbosa et al., 2007).

Gonçalves et al. (2008) avaliaram o mentol para anestésiar juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) que se mostrou eficiente para promover a indução anestésica nessa espécie. Óleos essenciais das plantas erva cidreira (*Lippia alba*) e a alfavaca (*Ocimum gratissimum*) também foram testados e indicados como anestésicos para o jundiá (*Rhamdia quelen*), sendo que o óleo essencial de *L. alba* amenizou inclusive o estresse oxidativo em experimentos de transporte simulado (Cunha et al., 2010; Azambuja et al., 2011; Silva et al., 2012). O jambu (*Spilanthes acmella*), conhecido como agrião-do-Pará, também apresentou potencial atividade anestésica para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) quando expostos a banho anestésico com extrato ceroso das flores (Barbas et al., 2016; 2017a).

Novas perspectivas para a avaliação anestésica

O nível de depressão neuronal e as extensões das

alterações cardíacas ou do relaxamento muscular que um dado anestésico pode determinar, são parâmetros relativamente difíceis de serem avaliados e raramente investigados. Muitos dos anestésicos atuais já testados e também novos produtos apresentados como alternativos para uso em peixes são considerados anestésicos gerais baseando-se na equivocada premissa de que se ocorrer perda de reação a estímulos externos, visuais ou mecânicos, isso será acompanhado por inconsciência e analgesia (Ross e Ross, 2008). Ainda, o uso de marcadores comportamentais unicamente, como a observação de latências para os diferentes estágios de indução, desde a perda do reflexo de postura até a imobilização completa, não comprova anestesia geral com inconsciência, analgesia ou mesmo perda de tônus muscular. Peixes podem atingir um estágio de sedação, estarem completamente imobilizados, mas conscientes e ainda sensíveis à dor.

Recentemente, Barbas et al. (2017b) ao avaliarem juvenis de tambaqui submetidos à banho anestésico com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) procederam para além da descrição do padrão comportamental, o monitoramento da anestesia com marcadores de eletrofisiologia como eletromiografia (EMG), avaliação cardíaca (ECG), frequência e intensidade de movimentos respiratórios. Além de determinar imobilização corporal completa em todas as concentrações testadas, ficou inequivocamente demonstrado que o óleo essencial da citronela a $600 \mu\text{L.L}^{-1}$ foi um agente miorrelaxante eficaz (Figura 1), que reduziu a frequência cardíaca e causou arritmia leve e transitória (Figura 2)

Em outro estudo também ficou demonstrada, através da avaliação do EMG, depressão significativa do poder de contração muscular em três espécies de peixes ornamentais amazônicos submetidos a banho anestésico com óleo essencial de cravo (Fujimoto et al., 2017). Essa técnica permite, portanto, mensurar a atividade de contração muscular durante a ação de drogas, detectando contrações mínimas, que em avaliações visuais podem passar despercebidas.

Apesar dos estudos acima corresponderem a iniciativas importantes para uma avaliação mais precisa do quadro anestésico e seus efeitos, utilizando-se as ferramentas de eletrofisiologia, o monitoramento eletroencefalográfico (EEG) em peixes é escasso e não há relatos no Brasil de sua utilização para avaliação da anestesia geral nesses animais. Muito pouco se conhece ainda quanto aos padrões de traçados eletrofisiológicos de peixes submetidos aos diferentes anestésicos, sobretudo os derivados de fontes naturais.

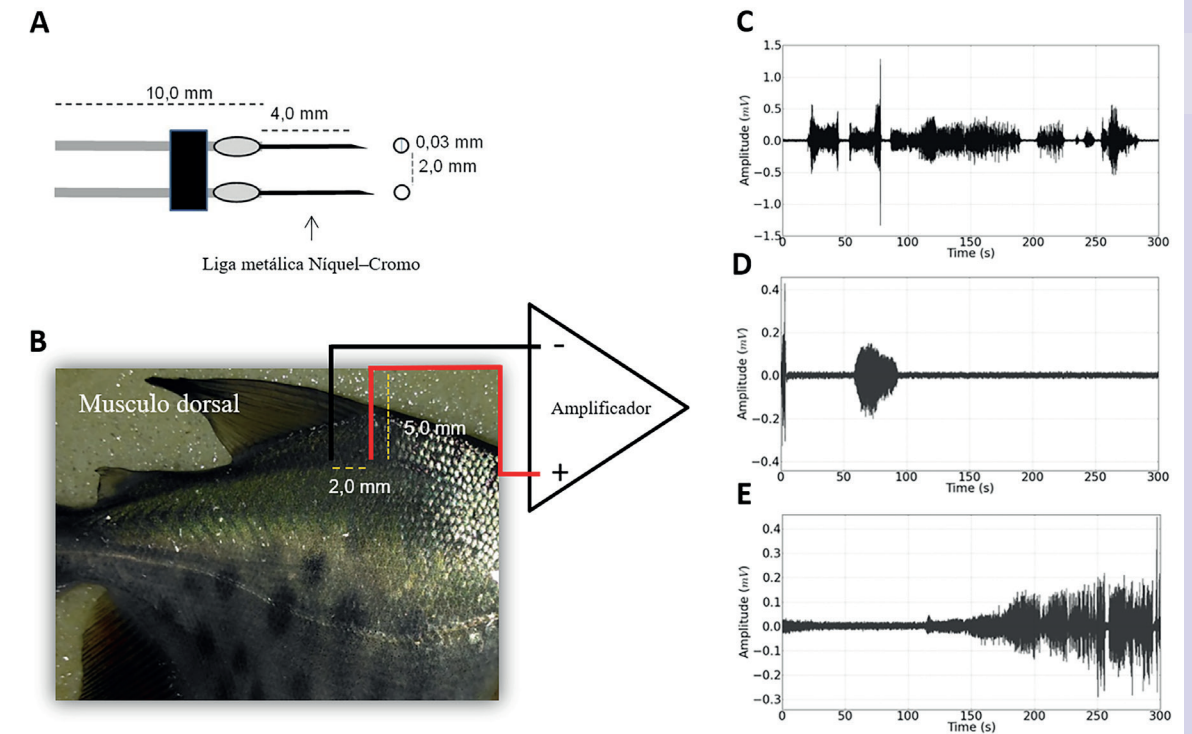


Figura 1. Desenho esquemático do eletrodo conjugado para a aquisição do eletromiograma (EMG) (A), local de implante dos eletrodos e conexão ao amplificador de sinal (B), traçado de EMG normal (C), durante a indução anestésica com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) a $600 \mu\text{L.L}^{-1}$ (D) e durante a recuperação em água livre de anestésico (E).

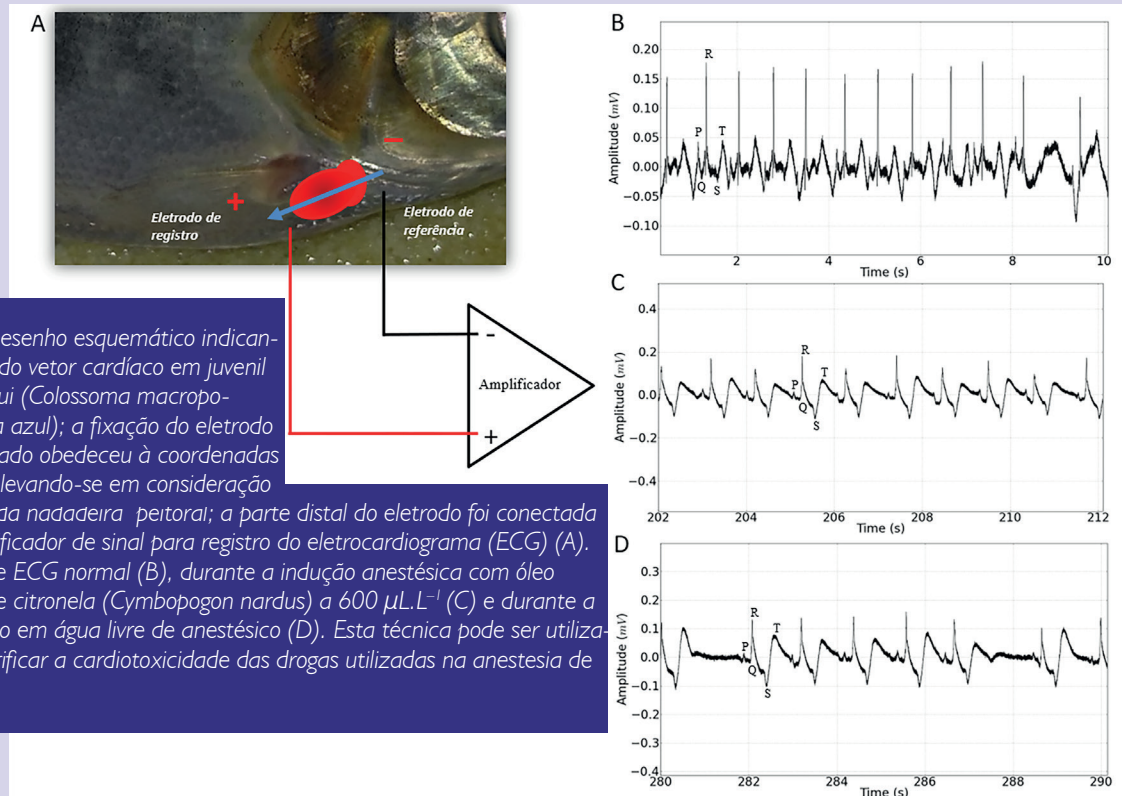


Figura 2. Desenho esquemático indicando direção do vetor cardíaco em juvenil de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (seta azul); a fixação do eletrodo não-conjugado obedeceu à coordenadas específicas levando-se em consideração a inserção da nadadeira peitoral; a parte distal do eletrodo foi conectada a um amplificador de sinal para registro do eletrocardiograma (ECG) (A). Traçados de ECG normal (B), durante a indução anestésica com óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) a $600 \mu\text{L.L}^{-1}$ (C) e durante a recuperação em água livre de anestésico (D). Esta técnica pode ser utilizada para verificar a cardiotoxicidade das drogas utilizadas na anestesia de peixes.

Manutenção anestésica para implante de eletrodo conjugado

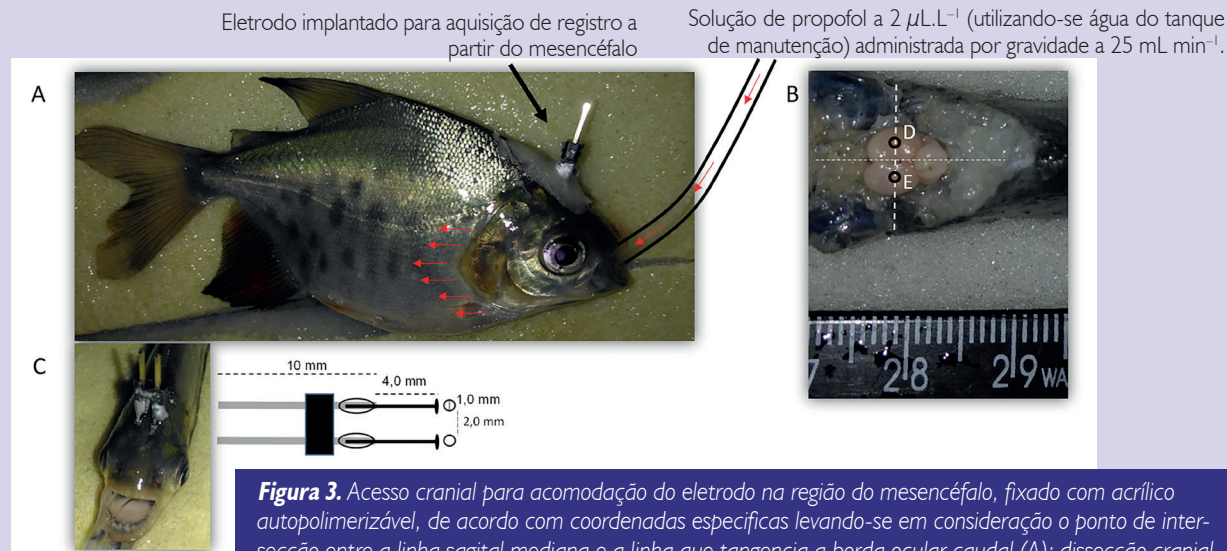


Figura 3. Acesso cranial para acomodação do eletrodo na região do mesencéfalo, fixado com acrílico autopolimerizável, de acordo com coordenadas específicas levando-se em consideração o ponto de intersecção entre a linha sagital mediana e a linha que tangencia a borda ocular caudal (A); dissecação cranial de um indivíduo para a demonstração do local no cérebro de implantação do eletrodo (B). Imagem frontal de um indivíduo, fixado em cama esponjosa, com o aparato posicionado e desenho esquemático do eletrodo conjugado para a aquisição do eletroencefalograma (EEG) (C). Setas vermelhas indicam o fluxo da solução anestésica administrada. Durante este período, fora da água, o peixe recebe irrigação branquial com solução anestésica por gravidade até o momento da fixação do eletrodo. Posteriormente, o peixe é alocado em tanques com água limpa por 48 h para recuperação cirúrgica.

Conhecendo o exame eletroencefalográfico (EEG)

O EEG corresponde a uma metodologia a ser empregada para a avaliação da anestesia em peixes, onde a atividade cerebral pode ser monitorada, permitindo-se assim a clara comprovação da ação anestésica a partir da diminuição da atividade neuronal de potencial de campo (Figura 3). A avaliação comportamental necessita ser corroborada por metodologias que demonstrem o que ocorre do ponto de vista neurológico com o órgão ou região efetora, neste caso, o SNC. Dessa forma, erros de interpretação serão evitados, sem riscos na designação de anestésicos gerais para drogas que determinem apenas ação na placa motora (miorrelaxantes de ação periférica), mas sem ação depressora central.

Em estudo preliminar onde se utilizou o propofol diluído na concentração de 2 ppm em água de aquário, foram observadas alterações na atividade cerebral do tambaqui, com modificações sutis da amplitude do traçado de EEG (Figura 4 A, B, D e E), mas que se tornaram mais evidentes no espectrograma dos animais anestesiados em comparação ao de animais em estado basal (Figura 4 C e F). A coloração vermelha no espectrograma corresponde a maior intensidade de energia gasta, que esteve distribuída de forma mais evidente no espectrograma de animais não anestesiados, sobretudo em frequências abaixo de 10 Hz. Isso

indica que houve diminuição da intensidade de energia captada pelo eletrodo e redução da atividade cerebral em animais submetidos ao propofol (Figura 4 F).

A utilização desta metodologia, em se tratando de anestesia de peixes, gera novas perspectivas para a avaliação da anestesia geral em termos de comprovação de eficácia e potência, permitindo a proposição de concentrações anestésicas efetivas que mais seguramente permitirão atestar o quadro de anestesia geral, em associação a outros marcadores, a exemplo dos comportamentais. Além disso, essa ferramenta pode ser utilizada para avaliação toxicológica, triagem de novas drogas que atuam no SNC ou periférico, farmacologia, dentre outras possibilidades.

Considerações finais

A intensificação da piscicultura impulsionou a busca por produtos anestésicos alternativos, de custo-benefício mais atrativo para auxiliar no manejo de peixes. Extrativos vegetais apresentam-se potencialmente menos onerosos e menos problemáticos quanto à questão residual que comprometa a qualidade da água ou da carne, oferecendo uma vasta fonte de compostos que podem possuir atividade anestésica e/ou sedativa, além de funcionarem como agentes antiestressantes e antioxidantes. As perspectivas de pesquisa na área de

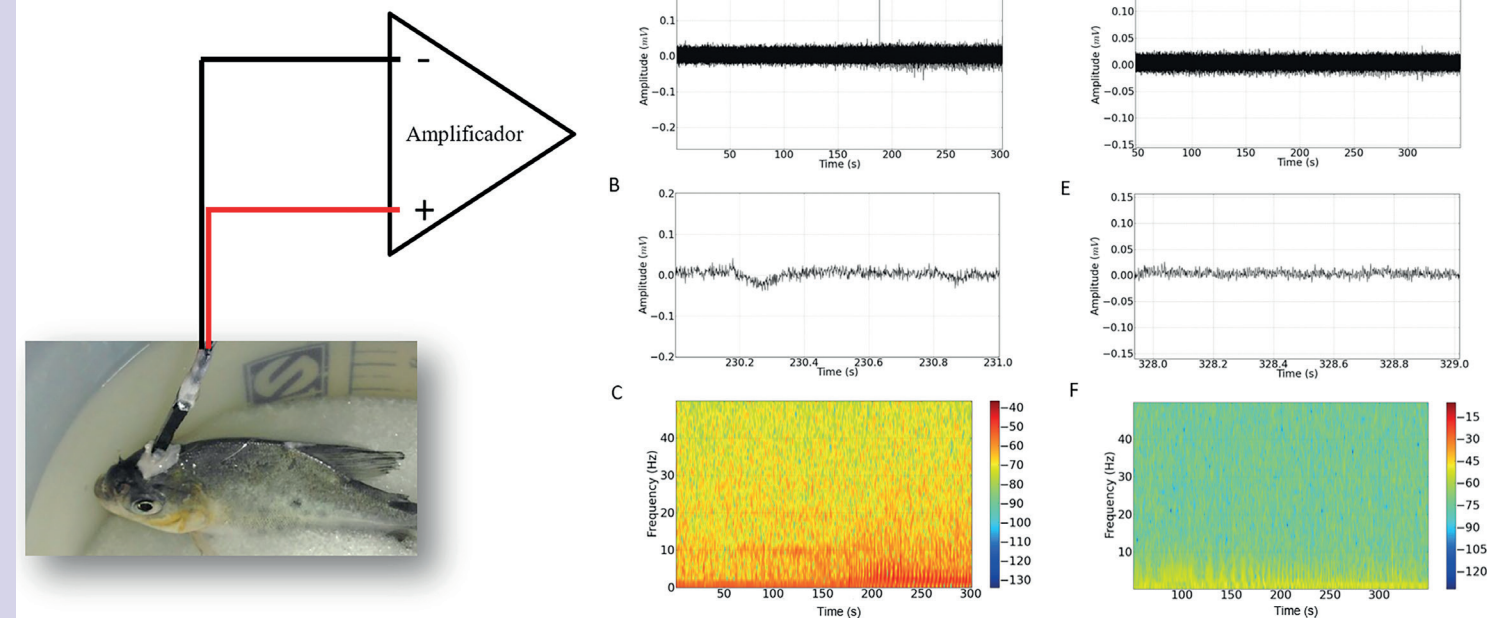


Figura 4. No momento do registro o peixe é retirado do tanque de recuperação e levado a uma câmara experimental (gaiola de Faraday), fixado em uma esponja imersa em um recipiente com água adicionada de solução anestésica e a extremidade distal do eletrodo é conectada a um amplificador de alta impedância, onde o sinal elétrico neuronal é amplificado em 2000x. Demonstrativo do traçado eletroencefalográfico (EEG) na região mesencefálica de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (5 g) no estado basal (A), registro basal amplificado de 1 s (B) e perfil do espectrograma do EEG no estado basal (C). Traçado de EEG da região mesencefálica do tambaqui anestesiado com propofol na concentração de 2 ppm (D), registro amplificado de 1 s demonstrando o efeito do propofol sobre o traçado de EEG (E) e espectrograma de frequência sob efeito do propofol (F). Os espectrogramas demonstram, através de uma escala colorimétrica, a mudança na distribuição de energia no registro de potencial de campo do mesencéfalo sob efeito do anestésico.

extrativos vegetais e seus efeitos anestésicos para peixes são promissoras no Brasil. Não menos importante, a caracterização da resposta eletrofisiológica de peixes submetidos à drogas sintéticas tradicionalmente utilizadas como anestésicos precisa ser feita, para que a eficácia do ponto de vista neurofisiológico seja atestada.

A depressão do SNC com inconsciência, sendo essa uma condição essencial para que a anestesia geral seja assim denominada, aliada a uma resposta cardiorrespiratória segura e compatível com a vida, serão fatores determinantes para a apresentação de produtos elegíveis para uso como anestésicos em peixes. Ademais, desse modo não incorreremos no risco de submeter peixes a sofrimento, dor e à eutanásia sob condições inadequadas e com implicações éticas importantes.

Consulte as referências bibliográficas em www.aquaculturebrasil.com/artigos

