

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Desenvolvimento de ferramentas moleculares  
para elucidação de mecanismos de ajustes  
fisiológicos do pacu submetido a jejum**

**Gustavo Henrique Squassoni**

Jaboticabal, São Paulo

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Desenvolvimento de ferramentas moleculares  
para elucidação de mecanismos de ajustes  
fisiológicos do pacu submetido a jejum**

**Gustavo Henrique Squassoni**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, São Paulo  
2015

S773d Squassoni, Gustavo Henrique  
Desenvolvimento de ferramentas moleculares para elucidação de mecanismos de ajustes fisiológicos do pacu submetido a jejum / Gustavo Henrique Squassoni. -- Jaboticabal, 2015  
v, 111 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015

Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato

Co-orientador: Luiz Roberto Furlan

Banca examinadora: Eduardo Gianini Abimorad, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Jesus Aparecido Ferro, Maria Célia Portella

Bibliografia

1. Privação alimentar. 2. Fisiologia. 3. Peixes. 4. Microbiota. 5. RNAm. 6. qPCR. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

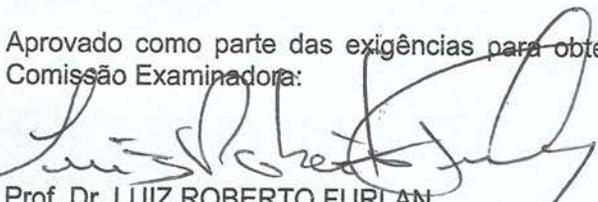
**TÍTULO:** Desenvolvimento de ferramentas moleculares para elucidação de mecanismos de ajustes fisiológicos do pacu submetido a jejum

**AUTOR:** GUSTAVO HENRIQUE SQUASSONI

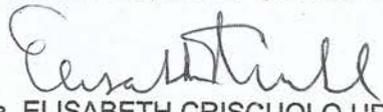
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ EDIVALDO PEZZATO

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIZ ROBERTO FURLAN

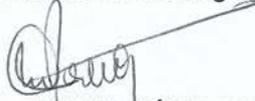
Coordenação de Pesquisa e Fomento / Centro de Aquicultura Da Unesp

  
Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. EDUARDO GIANINI ABIMORAD

/ Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegocios

Data da realização: 14 de julho de 2015.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| Dedicatória.....  | i         |
| Agradecimentos.....   | ii        |
| Apoio financeiro.....   | v         |
| <b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....</b>   | <b>3</b>  |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 3         |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1. Privação alimentar e respostas metabólicas.....  | 4         |
| 2.2. Privação alimentar e crescimento.....  | 6         |
| 2.2.1. Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1).....   | 6         |
| 2.3. Privação alimentar e estresse.....   | 7         |
| 2.3.1. Proteínas de choque térmico (HSPs).....  | 8         |
| 2.4. Privação alimentar e alterações na microbiota intestinal.....  | 10        |
| 2.5. Avaliação de estabilidade de genes de referência em estudos de expressão gênica.....   | 12        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>13</b> |
| 3.1. Objetivo geral.....  | 13        |
| 3.2. Objetivos específicos.....   | 14        |
| <b>4. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR PROLONGADA E REALIMENTAÇÃO SOBRE AS RESPOSTAS METABÓLICAS EM PACUS (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) DE DIFERENTES TAMANHOS .....</b>            | <b>21</b> |
| <b>CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL EM JUVENIS DE PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO.....</b>                              | <b>51</b> |
| <b>CAPÍTULO 4 – CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA NORMALIZAÇÃO EM ESTUDOS DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL EM PACUS (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....</b> | <b>79</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACOX3:** acil-CoA oxidase 3
- ACTB:** Gene codificador da  $\beta$ -actina citoplasmática
- cDNA:** DNA complementar
- Cq:** Ciclo de quantificação
- DEPC:** dietil pirocarbonato
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- DNase:** desoxirribonuclease
- EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético
- EEF1- $\alpha$ :** Fator de alongamento embrionário 1-alfa
- GAPDH:** gene codificador da gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
- GH:** Hormônio do crescimento
- GH-R:** Receptor do hormônio de crescimento
- pb:** Pares de base
- HSE:** Elemento de choque palindrômico
- HSF:** Fator de choque térmico
- HSPs:** Proteínas de choque térmico
- HSP70:** Proteína de choque térmico 70
- HSP90:** Proteína de choque térmico 90
- IGF-1:** Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
- IGVS:** Índice gorduro-viscerossomático
- IHS:** Índice hepatossomático
- K:** Fator de condição de Fulton
- PBS:** Tampão fosfato-salino
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase
- qPCR:** PCR quantitativo em tempo real
- RNA:** ácido ribonucleico
- RNA<sub>m</sub>:** RNA mensageiro
- RNA<sub>r</sub>:** RNA ribossomal
- Rnase:** Ribonuclease
- RNase-free:** Livre de ribonuclease
- RIN:** Índice de integridade do RNA
- T3:** Triiodotironina
- T4:** Tiroxina
- TE:** Solução 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8,0

**TGI:** Trato gastrintestinal

## LISTA DE TABELAS

Página

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental (11 de setembro a 9 de outubro de 2013)..... 26

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água dos aquários experimentais (17 de fevereiro a 17 de março de 2014)..... 27

### CAPÍTULO 3

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR..... 58

Tabela 2. Equações das curvas-padrão e valores de inclinação da reta,  $r^2$  e eficiência dos grupos bacterianos estudados..... 64

Tabela 3. Número de cópias do gene 16S DNAr para *Actinobacteria*, *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus* (n=5) na mucosa intestinal de pacus..... 66

Tabela 4. Número de cópias do gene 16S DNAr de *Actinobacteria*, *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus* (n=5) no conteúdo intestinal de pacus..... 68

### CAPÍTULO 4

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR, descrição e tamanho do amplicon (pb)..... 88

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de qPCR, descrição e tamanho do amplicon (pb)..... 92

Tabela 3. Caracterização dos cDNAs clonados e sequenciados..... 93

Tabela 4. Classificação dos genes candidatos a genes de referência, de acordo com seu valor de estabilidade utilizando *geNorm*, *Normfinder* e o modelo linear misto (Experimento 1)..... 98

Tabela 5. Classificação dos genes candidatos a genes de referência, de acordo com seu valor de estabilidade utilizando *geNorm*, *Normfinder* e o modelo linear misto (Experimento 2)..... 99

## LISTA DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>CAPÍTULO 2</b>  |        |
| Figura 1. Esquema experimental.....  | 28     |
| Figura 2. Peso médio final de pacus (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias, após 21 dias de jejum.....                       | 30     |
| Figura 3. Peso médio final de pacus (peso médio inicial: 346,77±25,82g; comprimento médio inicial: 25,86±0,72cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias, após 21 dias de jejum.....                       | 31     |
| Figura 4. Índices morfométricos de pacus (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....                   | 32     |
| Figura 5. Índices morfométricos de pacus (peso médio inicial: 346,77±25,82g; comprimento médio inicial: 25,86±0,72cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....                   | 33     |
| Figura 6. Composição tecidual de fígado e músculo de pacus (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum..... | 34     |
| Figura 7. Composição tecidual de fígado e músculo de pacus (peso médio inicial:346,77±25,82g; comprimento médio inicial: 25,86±0,72cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....  | 35     |
| Figura 8. Metabólitos sanguíneos de pacus (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....                  | 36     |
| Figura 9. Metabólitos sanguíneos de pacus (peso médio inicial: 346,77±25,82g; comprimento médio inicial: 25,86±0,72cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....                  | 37     |
| Figura 10. Cortisol sérico de pacus (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....                        | 38     |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 11. Cortisol sérico de pacus (peso médio inicial: 346,77±25,82g; comprimento médio inicial: 25,86±0,72 cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum.....                              | 38  |
| Figura 12. Triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) séricos de pacus (peso médio inicial: 346,77±25,82g; comprimento médio inicial: 25,86±0,72 cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum..... | 39  |
| <b>CAPÍTULO 3</b>   |     |
| Figura 1. Valores de <i>fold-change</i> para o número de cópias de 16S DNAr na mucosa intestinal de pacus continuamente alimentados (Controle), em jejum por 21 dias (Jejum) e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum (Realimentado).....       | 67  |
| Figura 2. Valores de <i>fold-change</i> para o número de cópias de 16S DNAr na mucosa intestinal de pacus em jejum por 21 dias (Jejum) e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum (Realimentado).....   | 68  |
| Figura 3. Valores de <i>fold-change</i> para as cópias de 16S DNAr no conteúdo intestinal de pacus continuamente alimentados (Controle), e em jejum por 21 dias e realimentados por 7 dias (Realimentado).....  | 69  |
| <b>CAPÍTULO 4</b>   |     |
| Figura 1. Variação dos valores de ciclo de quantificação (Cq) dos genes candidatos a genes de referência em amostras de RNAm de fígado de pacus, para o experimento 1 (n=10).....   | 94  |
| Figura 2. Variação dos valores de ciclo de quantificação (Cq) dos genes candidatos a genes de referência em amostras de RNAm de fígado de pacus, para o experimento 2 (n=10).....   | 95  |
| Figura 3. Médias das estabilidades de expressão (M) dos candidatos a genes de referência calculados pelo <i>geNorm</i> , para o experimento 1.....  | 96  |
| Figura 4. Médias das estabilidades de expressão (M) dos candidatos a genes de referência calculados pelo <i>geNorm</i> , para o experimento 2.....  | 96  |
| Figura 5. Efeitos da normalização na expressão de RNAm de IGF-1, HSP70 e HSP90 no fígado de pacus (Experimento 1).....  | 101 |
| Figura 6. Efeitos da normalização na expressão de RNAm de IGF-1, HSP70 e HSP90 no fígado de pacus (Experimento 2).....  | 102 |

## **Ofereço**

*À minha família, em especial aos meus irmãos (Guilherme e Gabriela), à minha mãe (Marilena) e meu pai (Angelo), pelo amor, carinho, paciência e apoio incondicional em todos os momentos. Amo vocês.*

## **Dedico**

*A minha avó (Verónica) pelo zelo e orações.*

*Aos meus avôs Izaías e João (In memoriam), que partiram deste plano, mas que continuam zelando e orando por mim, de um lugar melhor.*

## ***Agradecimentos***

*Ao Professor Dr. Luiz Roberto Furlan (Cedral), não somente pela orientação e ensinamentos científicos transmitidos, mas também pelos conselhos pessoais. Agradeço imensamente todo o apoio, dedicação, confiança, amizade e paciência. “Um professor é a personificada consciência do aluno; confirma-o nas suas dúvidas; explica-lhes o motivo de sua insatisfação e lhe estimula a vontade de melhorar.” Thomas Mann.*

*Ao Professor Dr. Luiz Edivaldo Pezzato pela orientação, amizade e colaboração em toda a parte burocrática durante o doutorado.*

*À Professora Dra. Elisabeth Urbinati, pelo auxílio, suporte e sugestões na execução dos estudos fisiológicos/metabólicos deste trabalho. Uma mãe que acabou adotando mais um “filho” na família de fisiologia de peixes.*

*Ao prof. Dr. Dalton José Carneiro por ter me dado à primeira oportunidade acadêmica na área de aquicultura, ainda no início da graduação, pela supervisão durante o estágio da disciplina de piscicultura, e por ter disponibilizado o laboratório de nutrição para realização do ensaio biológico.*

*Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro e Dra. Mônica Serra, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.*

*Aos Profs. Dr. Jesus Aparecido Ferro, Dra. Maria Célia Portella, Dra. Elisabeth Urbinati e Dr. Eduardo Gianini Abimorad pelas críticas e sugestões realizadas no exame de defesa.*

*Aos amigos da equipe de Biologia Molecular: Miguel (Dunga) e Raquel. Uma equipe pequena, mas de eficiência e competência enorme.*

*Aos amigos do Caunesp, em especial a equipe do laboratório de Fisiologia: Rodrigo Gimbo, Gisele, Monica, Soliris, Talisia, Spinha, Luis, Natalia, KotoKo e Leo e do laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos: Juliana (Tomys), Lidiane, Hellen, Lúgia e Thyssia, pela enorme ajuda nas poucas, mas exaustivas coletas.*

*A todos os funcionários do Caunesp: Damares, Veralice, David, Valdecy, Márcio, Perereca, Silvinha, Polachini, Donizeti, Suerli, Fátima, Elisandra e Mayara pela colaboração, amizade e profissionalismo.*

*Aos moradores e amigos da República Amoribunda (recentes e os da “velha guarda”): Passivo, Bago, Mala, Kotoko, Pirangi, Seborréia, Cascão, Hebe, Primo, Marcel, Elfo, Ku-kidá, Akidauânus, Chupeta, Uatarréu, Cookie-KH, Goabinha, K-banha, E-bola, Covi-flor e Félix, pelos 10 anos de ensino de convivência e de respeito às diferenças (e festas).*

*À amiga Tháisa Moreti (Âmis), pelos momentos de descontração (e desabafos), no espaço lounge.*

*A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e que por algum infortúnio tenha me esquecido de citar.*

***Muito Obrigado!***

*“...você precisa desaprender o que aprendeu”*

*Mestre Yoda, Star Wars*

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”*

*Ayrton Senna*

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

*Theodore Roosevelt*

*Apoio financeiro*

*CNPq, Bolsa de doutorado, processo: 153589/2011-6*

## **Desenvolvimento de ferramentas moleculares para elucidação de mecanismos de ajustes fisiológicos do pacu submetido a jejum**

**RESUMO** - A aquicultura brasileira apresenta-se como atividade comercial em franca ascensão e, dentre as espécies nativas, o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, destaca-se como uma das mais cultivadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil. Contudo, à semelhança do que ocorre com as demais espécies de interesse comercial, a produção do pacu enfrenta problemas ao longo do processo produtivo, tais como a alta densidade populacional utilizada, fornecimento incorreto de rações e estresse, que resultam em redução da produtividade e aumento na taxa de mortalidade. Uma das estratégias estudadas para melhorar o manejo alimentar em peixes consiste na utilização da privação alimentar por tempo determinado com a finalidade de promover compensação do crescimento, durante o período de realimentação. Entretanto, informações relacionadas às respostas fisiológicas, de modulação celular e de possíveis alterações na microbiota intestinal provocada por este tipo de manejo ainda são discordantes. A compreensão destas informações é necessária para o desenvolvimento de estratégias que minimizem o estresse ocasionado pela privação alimentar. Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi avaliar o impacto do jejum prolongado, seguido de curto período de realimentação, sobre os parâmetros fisiológicos, expressão de genes relacionados ao processo de crescimento e estresse, prevalência de determinados grupos bacterianos na mucosa e conteúdo intestinal, além da clonagem, identificação e validação de genes de referência para normalização de dados de expressão gênica em estudos com pacus. Os resultados obtidos demonstraram que o pacu apresenta grande capacidade de mobilização das reservas endógenas, porém a recuperação das mesmas é mais rápida em peixes de menor tamanho. O presente estudo apresenta as primeiras comparações experimentais para validação de genes de referência para o pacu. Os genes clonados, sequenciados e validados serão utilizados em futuros estudos de expressão gênica com esta espécie. Além disso, este trabalho fornece as primeiras informações a respeito das alterações da microbiota intestinal em pacus. A utilização da qPCR para detecção e quantificação de grupos bacterianos específicos demonstrou ser uma importante ferramenta para avaliação das alterações nas comunidades bacterianas na mucosa e conteúdo intestinal dos peixes.

**Palavras-chave:** privação alimentar, fisiologia, peixes, microbiota, RNAm, qPCR

## **Development of molecular tools to elucidate physiological adjustments in fasted pacu**

**ABSTRACT** - The Brazilian aquaculture is as a commercial activity on the rise. Among the native species, pacu, *Piaractus mesopotamicus*, stands out as one of the most reared in the southern, central and northeastern Brazil. However, similar to what occurs with other commercial species, the production of pacu experience problems during the production process, such as high population density used, incorrect food supply and stress, resulting in reduced productivity and increased mortality. One of the strategies investigated to improve the management of fish feeding is the use of dietary restrictions for a certain time to promote growth compensation during the refeeding period. However, information related to physiological responses and cell modulations caused by this type of management are still unknown. Understanding this information is necessary for the development of strategies to minimize the stress caused by food restriction. The purpose of this study was to evaluate the impact of prolonged fasting, followed by short refeeding on the physiological parameters, gene expression related to growth and stress, the prevalence of certain bacterial groups in the mucosa and intestinal content and cloning, identification and validation of reference genes for normalization of gene expression data in studies with pacu. The results showed that the pacu has great capacity for mobilization of endogenous reserves, but their recovery is faster in smaller fish. This study presents the first experimental comparisons for validation of reference genes for pacu. Cloned, sequenced and validated genes will be used in future studies of gene expression with this species. In addition, this study provides the first information about the changes in intestinal microbiota in pacu. The use of qPCR for the detection and quantification of specific bacterial groups proved to be an important tool for assessing changes in bacterial communities in the mucosa and intestinal contents of fish.

**Keywords:** food deprivation, physiology, fish, microbiota, mRNA, qPCR

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **1. INTRODUÇÃO**

A aquicultura brasileira apresenta-se como atividade comercial em franca ascensão, visto que o país apresenta um grande número de fatores favoráveis como: clima, variedade e disponibilidade de alimentos, abundância de recursos hídricos e existência de espécies de grande interesse comercial. Segundo dados do Ministério da Aquicultura e Pesca (MPA), a produção total de peixes oriundos da aquicultura continental atingiu o valor de 544.490 toneladas em 2011.

Dentre as espécies nativas, o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), destaca-se como uma das mais cultivadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil (MPA, 2011), apresentando alto valor comercial, visto que apresenta rápido crescimento, fácil adaptação à alimentação artificial, carne de excelente sabor e ser bastante apreciado para a pesca esportiva (Jomori *et al.*, 2005; Abimorad e Carneiro, 2007).

Os estudos na área de nutrição do pacu têm demonstrado que essa espécie não exige níveis elevados de proteína, a qual pode ser tanto de origem animal quanto vegetal, e aproveitam com eficiência os carboidratos não estruturais, tolerando a inclusão de fibra em níveis relativamente altos na dieta (Abimorad e Carneiro, 2007; Bicudo *et al.*, 2012, Urbinati *et al.*, 2013 ). No entanto, as técnicas de produção desta espécie necessitam ser mais fundamentadas, principalmente no que se refere à fase de engorda destes animais. É importante salientar que, em relação aos custos de produção em aquicultura, a alimentação possui posição de destaque, podendo representar de 50% até 70% dos custos totais de produção (Kubitza e Ono, 2003).

Dentre as práticas preconizadas para melhorar o manejo alimentar em peixes, destaca-se a utilização da privação da alimentação por tempo determinado, com a finalidade de promover compensação do crescimento, durante o período de realimentação. Somado a isto, a redução na oferta de alimento pode proporcionar diversos benefícios, tais como manutenção da qualidade da água e redução dos custos associados com ração e mão-de-obra.

Entretanto, informações a respeito das respostas fisiológicas e da modulação celular provocada por este tipo de manejo ainda não estão completamente

elucidadas. A compreensão destas informações é necessária para o desenvolvimento de estratégias que minimizem o estresse causado pela privação alimentar.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Privação alimentar e respostas metabólicas

Tanto na natureza quanto na aquicultura, o pacu pode passar por períodos de privação alimentar ou jejum. Nos habitats naturais, a redução da ingestão de alimento pode ser uma ocorrência comum durante o ciclo de vida de algumas espécies de peixes, principalmente aqueles que realizam migração para desova (Mackenzie *et al.*, 1998). Na aquicultura, o pacu pode estar em jejum durante processos inerentes ao processo produtivo, como manipulação e transporte, e também em alguns regimes de alimentação que utilizam a restrição alimentar, com a finalidade de promover o ganho compensatório (Souza *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2011).

Dependendo da espécie, os peixes apresentam estratégias distintas para lidar com os períodos de privação alimentar e jejum, variando a utilização de carboidratos, lipídeos e proteínas de diferentes compartimentos corporais (Bandeem e Leatherland, 1997). Como revisado por Czesny *et al.* (2003), durante o jejum, algumas espécies de peixes (*Anguilla anguilla*, *Carassius auratus*, e *Pleuronectes platessa*) utilizam a proteína muscular como fonte secundária de combustível, enquanto outras (*Esox lucius*, *Rutilus rutilus*, e *Macquaria ambigua*) utilizam os lipídeos. Em ambas as situações, os carboidratos armazenados sob a forma de glicogênio no fígado aparentam ser a fonte primária de energia (Navarro e Gutierrez, 1995). A extensão na qual essas reservas são utilizadas depende de diversas variáveis, incluindo o tamanho do peixe, o histórico reprodutivo, da temperatura do ambiente e da disponibilidade e tipo de alimentação (Metcalf e Thorpe, 1992; Hutchings *et al.*, 1999).

Especificamente para o pacu, Souza *et al.* (2000) demonstraram que juvenis submetidos a longos períodos de privação alimentar (60 dias) apresentaram redução do glicogênio hepático ao início da restrição, sugerindo

que esta é uma reserva prontamente disponível para a manutenção da homeostase glicêmica, sendo mantida ou restabelecida por meio da mobilização de outras fontes de energia, como proteínas e lipídeos. Os autores também constataram que, em períodos de privação longos, a concentração de lipídeos no fígado, vísceras e músculo diminuíram, os ácidos graxos livres plasmáticos aumentaram e a glicose sanguínea permaneceu inalterada. Esta elevação de ácidos graxos livres pode inibir competitivamente a utilização de glicose pelos tecidos e conseqüentemente a liberação de glicose pelo fígado (Takahashi, 2007).

Em estudo posterior com a mesma espécie, Souza *et al.* (2002) observaram que juvenis submetidos a ciclos de quatro e seis semanas de restrição alimentar, seguidas de nove e sete semanas de realimentação, respectivamente, apresentaram a mesma dinâmica de mobilização de reservas energéticas durante o período de privação alimentar. Somado a isto, os depósitos energéticos hepáticos foram rapidamente recuperados quando o fornecimento de alimento foi restabelecido, evidenciando desta maneira que a capacidade de uma espécie de sobreviver a períodos de restrição alimentar depende da eficiência na utilização e posterior reposição de suas reservas endógenas.

A mobilização das reservas energéticas em condições de estresse causado pela privação de alimento está intimamente ligada ao controle endócrino. Como observado nos demais vertebrados, a regulação hormonal do metabolismo em peixes é um processo complexo, envolvendo diversos fatores, dentre eles o cortisol (Mommensen *et al.*, 1999) e os hormônios tireoidianos (Power *et al.*, 2001).

Estudos prévios já demonstraram que os níveis dos hormônios tireoidianos diminuem significativamente durante o período de privação de alimento em peixes (Farbridge e Leatherland, 1992), porém estes níveis são restabelecidos em diferentes taxas durante a realimentação. Adicionalmente, é relatado que estes hormônios estão associados a um mecanismo de sobrevivência, por promoverem a redução de mobilização metabólica das reservas de energia (Navarro e Gutiérrez, 1995; Mackenzie *et al.*, 1998; Blanton e Specker, 2007). Takahashi *et al.* (2011) observaram redução dos níveis de triiodotironina (T3) circulantes em juvenis de pacu submetidos a ciclos curtos de privação alimentar e realimentação, no entanto, o comportamento dos hormônios tireoidianos em longos períodos de jejum para esta espécie ainda é desconhecido.

Em estudos com mamíferos, os níveis plasmáticos de cortisol são frequentemente caracterizados por uma elevação em resposta ao jejum (Ortiz *et al.*, 2002; Viscarra e Ortiz, 2013). Entretanto seu papel específico em peixes ainda não está completamente compreendido (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999; Aluru e Vijayan, 2009), e as respostas encontradas são contraditórias. Existem resultados na literatura que relataram aumento nos níveis de cortisol plasmáticos (Peterson e Small, 2004; Barcellos *et al.*, 2010; Caruso *et al.*, 2012). Outros autores observaram redução nos níveis de cortisol (Small, 2005) ou ainda nenhum efeito da privação alimentar sobre estes níveis em peixes (Jørgensen *et al.*, 1999).

Em estudo recente, Gimbo *et al.* (2015) avaliaram os efeitos da privação alimentar prolongada (30 dias) sobre os níveis de cortisol plasmático em juvenis de pacu, verificando níveis mais elevados em peixes sob jejum, indicando um possível envolvimento deste hormônio em processos catabólicos, sendo acionado para produção de energia durante o período de privação alimentar.

Os efeitos da privação de alimento nos níveis de cortisol plasmático estão relacionados diretamente ao período de duração do jejum (Peterson e Small, 2004). Além disso, a idade dos peixes parece ser outro fator determinante nas respostas do cortisol. De acordo com estudo de Koakoski *et al.* (2012), embora os peixes em diferentes estágios de desenvolvimento tenham apresentado um padrão semelhante de elevação do cortisol plasmático em resposta a um agente estressor agudo (manipulação), os tempos de resposta apresentaram-se de maneira distinta, sendo mais rápidos em alevinos e juvenis quando comparados aos peixes adultos.

## **2.2. Privação alimentar e crescimento**

### **2.2.1. Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)**

Os peixes são capazes de se adaptar a longos períodos de restrição de nutrientes, em parte, devido à modulação da expressão de uma variedade de genes associados com o sistema GH/IGF-1 (Mackenzie *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2005; Gabillard *et al.*, 2006). Quando o aporte de alimento é restrito, a energia

destinada ao crescimento e armazenamento é desviada para suportar os processos fisiológicos essenciais (Fox *et al.*, 2010). Em muitos animais vertebrados, o jejum aumenta os níveis do hormônio do crescimento (GH) no plasma, deslocando o metabolismo de mobilização de substratos energéticos (lipólise) para manutenção do metabolismo basal (Fox *et al.*, 2010). Simultaneamente, ocorre à diminuição de IGF-1 plasmático, e a expressão gênica de IGF-1 e GH-R hepáticos são reduzidas em um estado catabólico, inibindo as ações do GH e IGF-1 (Fukada *et al.*, 2004).

O IGF-1 é produzido principalmente no fígado, e estudos de privação alimentar em peixes demonstram que este é um dos primeiros órgãos a serem afetados (Power *et al.*, 2000). O IGF-1 é frequentemente relatado como um promotor de crescimento em peixes, com estudos indicando uma correlação positiva entre as taxas de crescimento e os seus níveis circulantes (Pérez-Sánchez e Le Bail, 1999; Pierce *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2006). Em várias espécies de peixes o jejum prolongado promove uma redução de IGF-1 no plasma e da expressão hepática de RNAm de IGF-1 (Pierce *et al.*, 2005; Small e Peterson, 2005), com subsequente ativação da gliconeogênese no fígado e redução das taxas de utilização de glicose (Navarro e Gutiérrez, 1995).

Este tipo de resposta, no entanto, pode variar de acordo com a espécie e a duração do período de jejum. Em juvenis de *stripped bass* híbridos (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*), Picha *et al.* (2006) relataram um aumento na expressão gênica de IGF-1 hepático e redução dos níveis de IGF-1 plasmáticos em animais privados de alimentação. De maneira semelhante Ayson *et al.* (2007) e Pedroso *et al.* (2009) relataram um aumento significativo dos níveis RNAm hepáticos de IGF-1 a partir do 3º dia de jejum em *rabbitfish* (*Siganus guttatus*) e *Seriola quinqueradiata*, respectivamente. Em tilápias (*Oreochromis mossambicus*), não foram verificados efeitos consistentes do jejum sobre a expressão relativa de RNAm de IGF-1 no fígado, entretanto, a expressão de RNAm de IGF-1 muscular foi extremamente reduzida, tendo os níveis restabelecidos após duas semanas de realimentação (Fox *et al.*, 2010). Os mecanismos subjacentes desta regulação inversa de RNAm de IGF-1 em condições de jejum ainda são desconhecidos.

### 2.3. Privação alimentar e estresse

### 2.3.1. Proteínas de choque térmico (HSPs)

As informações a respeito do estresse causado devido à restrição da ingestão de alimento ainda são escassas, e a compreensão da modulação celular em peixes é necessária para o desenvolvimento de estratégias que visem minimizar o estresse ocasionado pela privação alimentar. Neste contexto, a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs - *Heat Shock Proteins*) como indicadores de estresse e estado de saúde dos animais parece ser bastante promissora (Iwama *et al.*, 2004).

Quando um organismo encontra-se em condições de estresse, a resposta é caracterizada pela rápida liberação de hormônios, incluindo cortisol e catecolaminas, resultando na mobilização das reservas de energia, em uma tentativa de restabelecer a homeostase (Wendelaar Bonga, 1997; Fabbri *et al.*, 1998; Mommsen *et al.*, 1999). Além disso, existe um sistema de resposta generalizado de estresse a nível celular, que inclui a ação de diversas proteínas de choque térmico (Iwama *et al.*, 1999; Goligorsky, 2001). Além das variáveis mencionadas, a resposta ao estresse celular pode variar de acordo com o tecido e a família de HSPs.

As HSPs são um grupo de proteínas intracelulares que possuem elevado nível de identidade ao nível de aminoácidos, entre os diversos organismos. Como esta família de proteínas é induzida por outros fatores de estresse, além da temperatura, elas também são referidas como “proteínas de estresse” (Iwama *et al.*, 1998). As HSPs são induzidas por uma grande diversidade de fatores estressores, incluindo hipertermia, estresse osmótico, exposição a metais pesados (Feder e Hoffman, 1999), anóxia, hipóxia (Currie e Tufts, 1997), densidade (Gornati *et al.*, 2004) e privação de alimento (Cara *et al.*, 2005; Antonopoulou *et al.*, 2012). Diversos estudos têm tentado estabelecer uma relação entre as respostas fisiológicas e celulares, mas os resultados são inconsistentes entre esses dois tipos de resposta. Desta maneira, os peixes podem apresentar uma resposta fisiológica a um estressor e não revelar qualquer alteração celular no perfil das HSPs (Basu *et al.*, 2002). Em um animal não estressado, as HSPs possuem funções celulares constitutivas que são importantes em vários aspectos do metabolismo de proteína (Basu *et al.*, 2002).

Os grupos mais abundantes e amplamente estudados de proteínas de estresse são aqueles que pertencem à família das proteínas HSP70 (70 kDa), englobando a forma constitutiva, assim como as isoformas indutíveis. Também é a proteína de estresse mais comumente induzida em resposta às condições fisiológicas sub-ótimas (Hutchison *et al.*, 1994).

A HSP70 é conhecida por auxiliar na dobragem da cadeia de polipeptídeos nascentes, agindo como um “chaperone” molecular e participar dos processos de reparação e degradação de proteínas alteradas ou desnaturadas (Kiang e Tsokos, 1998). Por sua vez, a HSP90, pertencente à outra família de proteínas de choque térmico, é ativa no suporte/apoio a vários componentes do citoesqueleto, enzimas e receptores de hormônios esteróides (Young *et al.*, 2001). Outras HSPs de baixo peso molecular possuem diversas funções e tem sido proposto que atuam como “chaperones” moleculares, prevenindo a agregação irreversível de proteína (Iwama *et al.*, 2004).

A compreensão completa dos mecanismos subjacentes à detecção de um estressor e a regulação das HSPs ainda não está clara. Estudos com HSP70 têm demonstrado que a regulação da expressão deste gene ocorre principalmente a nível transcricional (Mayer e Bukau, 2005). A análise dos genes HSPs e uma comparação com suas sequências promotoras em diversos organismos levaram à identificação de um elemento de choque palindrômico (HSE): CNGAANNTTCNNG (Bienz e Pelham, 1987). Tem sido demonstrado que a indução das proteínas de choque térmico é resultado principalmente da ligação de um fator de transcrição – HSF (*Heat Shock Factor*). O mecanismo de ação do HSF compreende a ativação (trimerização) de monômeros, a translocação dos trímeros para o núcleo e a indução da transcrição por meio da ligação do HSF ao HSE, dentro da região promotora das HSPs (Westwood *et al.*, 1991, Morimoto *et al.*, 1992).

Estudos relacionando a expressão de HSPs em resposta à privação alimentar em peixes são escassos, e os resultados obtidos têm sido controversos. Existem relatos que a expressão das proteínas de choque térmico, especificamente a HSP70 e a HSP90, possui o potencial de ser utilizada como indicador de estresse nutricional em larvas de *gilthead sea bream* e trutas arco-íris (Cara *et al.*, 2005) e em juvenis de *sea bass* europeu (Antonopoulou *et al.*, 2012). Entretanto, não se observou nenhuma alteração específica na expressão

de RNAm de HSP70 em larvas de salmão (Zarate e Bradley, 2003) ou em juvenis de *catfish* (Weber e Bosworth, 2005), submetidos a restrição alimentar. Portanto, verifica-se a necessidade de um maior número de estudos com diferentes espécies de peixes, com a finalidade de elucidar a validade da utilização destas proteínas como indicadores de estresse.

#### **2.4. Privação alimentar e alterações na microbiota intestinal**

A distribuição da microbiota gastrointestinal tem sido estudada extensivamente em diversas espécies de animais para diferentes fins. De acordo com Rastall (2004), a microbiota gastrointestinal refere-se normalmente a um ecossistema extremamente complexo e dinâmico que coloniza o trato gastrointestinal (TGI) de um animal. Além disso, com a evolução das ferramentas moleculares e biotecnológicas, este complexo ecossistema está começando a ser desvendado em diversas espécies, incluindo os peixes.

A microbiota gastrointestinal apresenta uma grande variedade de funções e sua importância está associada diretamente à nutrição e saúde do hospedeiro, promovendo o fornecimento de nutrientes, evitando a colonização de agentes infecciosos, participando da homeostase energética e manutenção da imunidade da mucosa intestinal, sendo bem documentada em mamíferos (O'Mahony *et al.*, 2009; Tremaroli e Backhed, 2012; Okada *et al.*, 2013). Embora a presença da microbiota gastrointestinal em peixes tenha sido reconhecida, pouco se sabe sobre as comunidades bacterianas, sua diversidade e, sobretudo, o seu papel na nutrição e saúde dos peixes (Nayak, 2010).

A privação alimentar não afeta somente o estado nutricional e saúde dos peixes, mas também o perfil de microrganismos no intestino (Xia *et al.*, 2014). As alterações fisiológicas que ocorrem durante este período resultam em uma rápida resposta de adaptação do hospedeiro e de seus microrganismos intestinais frente a esta situação (Okada *et al.*, 2013). O equilíbrio da microbiota intestinal pode sofrer alterações devido a uma série de fatores, dentre eles o estresse (O'Mahony *et al.*, 2009), antibióticos (Tanaka *et al.*, 2009), idade (Hopkins *et al.*, 2002), infecções bacterianas (Dethlefsen *et al.*, 2006) e o estado nutricional (Turnbaugh *et al.*, 2009).

A dieta possui papel determinante na formação da microbiota intestinal, promovendo alterações no tamanho das populações de espécies simbiotes, e

consequentemente, alterações biológicas no hospedeiro (Brown *et al.*, 2012). Estas modificações no perfil de microrganismos do TGI podem ocasionar alterações na resposta imune do hospedeiro, favorecendo a ocorrência de doenças (Morgan *et al.*, 2012).

Dois grupos distintos de microrganismos são normalmente encontrados no TGI dos peixes, os autóctones (aderentes) e os alóctones (transitórios). O primeiro grupo de bactérias, em virtude da sua capacidade de tolerar o baixo pH em sucos gástricos e resistência à ação dos ácidos biliares, conseguem colonizar a superfície epitelial do estômago, do intestino delgado e grosso, e se fixam firmemente à mucosa intestinal para formar a microbiota autóctone do hospedeiro (Savage, 1977). O segundo grupo de bactérias está presente transitoriamente no trato gastrointestinal, e é hipotetizado que não são capazes de colonizar a camada de muco e/ou a superfície epitelial (Ringø e Birkbeck, 1999), ou são tão inefetivas que não conseguem competir com outras bactérias presentes no muco/epitélio (Nayak, 2010).

As tradicionais técnicas de isolamento e cultivo de bactérias intestinais realizadas em meios de cultura específicos apresentam diversas limitações. A principal delas deve-se ao fato de que a maioria das bactérias intestinais não pode ser cultivada em condições laboratoriais, porque as exigências ambientais para o seu cultivo em condições *in vitro* ainda são desconhecidas, e também porque dependem da presença de outras bactérias para o seu desenvolvimento (Abbot, 2004). Diante destas limitações, novas técnicas moleculares utilizando a análise filogenética dos ácidos nucleicos têm sido utilizadas com a finalidade de caracterização das comunidades microbianas, do estabelecimento das funções dentro do ecossistema e suas relações com o hospedeiro (Oviedo-Rondón, 2009).

Um importante avanço na área de ecologia microbiana foi a utilização da subunidade 16S do DNA ribossomal (16S DNAr), que pode ser utilizada em diferentes técnicas moleculares para identificar e quantificar microrganismos (Amann *et al.*, 1995). O 16S DNAr está entre as moléculas mais conservadas em todos os sistemas vivos, já que não possui transferência entre espécies (Abbot, 2004), e também possui regiões variáveis e tamanho apropriados (cerca de 1500 pares de base) para análises de filogenia (Amann *et al.*, 1995). Atualmente existe um grande banco de dados de sequências do gene 16S DNAr, sendo o marcador

mais utilizado em estudos de metagenômica (Heilig *et al.*, 2002; Bartosch *et al.*, 2004; Rintillä *et al.*, 2004).

Embora as técnicas de sequenciamento em larga escala sejam consideradas atualmente as melhores ferramentas para avaliação da diversidade de comunidades bacterianas complexas, especialmente no que concerne a táxons raros, elas não são ideais para a quantificação (Kwon e Ricke, 2011). Dentre as diversas técnicas utilizadas, a quantificação absoluta por meio da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) apresenta-se como uma ferramenta interessante, pois fornece valores absolutos, específicos, rápidos e altamente sensíveis do número de cópias do alvo desejado (Yu *et al.*, 2005; Ritalahti *et al.*, 2006). Além disso, atualmente existem nucleotídeos iniciadores universais para o gene 16S DNAr, validados biologicamente para amplificar o DNA de diversos grupos e espécies de bactérias (Heilig *et al.*, 2002; Bartosch *et al.*, 2004; Rintillä *et al.*, 2004).

## **2.5. Avaliação de estabilidade de genes de referência em estudos de expressão gênica**

Em pesquisas biológicas, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é a técnica de maior sensibilidade, exatidão e especificidade para a análise de expressão gênica, e têm sido amplamente utilizada para medir e comparar níveis de transcrição dos genes (Bustin, 2002; Bustin *et al.*, 2009; Derveaux *et al.*, 2010). Embora a técnica de qPCR seja extremamente precisa, a qualidade dos resultados pode ser influenciada por diversas variáveis, como a estabilidade, quantidade e pureza do RNA, e da eficiência da reação de PCR (Bustin e Nolan, 2004; Mahoney *et al.*, 2004). Para evitar erros neste tipo de análise, foram propostas diversas estratégias para a normalização dos dados obtidos, entre elas a amostragem de peso de tecido semelhante para as amostras (Hugget *et al.*, 2005), utilização de DNA genômico (Talaat *et al.*, 2002) e de moléculas de RNA artificial (Bustin e Nolan, 2004). Entretanto todas estas técnicas apresentam limitações e permanecem como um ideal teórico não validado. Neste sentido, o método mais adequado para a quantificação de RNAm consiste na inclusão de padrões internos, denominados genes de referência ou endógenos.

Os níveis de transcrição dos genes de referência frequentemente avaliados em estudos de expressão relativa incluem o 18S RNA ribossomal (18S rRNA), a  $\beta$ -actina (ACTB), fator de alongamento 1-alfa (EF1- $\alpha$ ) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Radonic *et al.*, 2004), e por muito tempo assumiu-se que seus níveis de expressão não eram afetados pelas condições ambientais, pois estes genes são necessários nos processos celulares fundamentais (Thellin *et al.*, 1999). No entanto, a expressão de alguns genes de referência pode apresentar grande variação e instabilidade em diferentes condições experimentais (Bas *et al.*, 2004; Small *et al.*, 2008). Além disso, os níveis de transcritos de RNAm podem diferir da expressão real em até 20 vezes, caso o gene de normalização seja regulado pelas condições experimentais (Kosir *et al.*, 2010). Portanto, é um ponto chave assegurar que a expressão dos genes de referência internos ocorra em um nível constante. Além disso, os genes endógenos devem ser validados para cada organismo e experimento específico (Yang *et al.*, 2014).

Atualmente, a utilização de múltiplos genes de controle interno é considerada como essencial para uma normalização precisa dos dados (Vandesompele *et al.*, 2002). Neste sentido, algoritmos estatísticos, como o *Genorm* (Vandesompele *et al.*, 2002), o *Normfinder* (Andersen *et al.*, 2004) e o método utilizando modelos lineares mistos (Steibel *et al.*, 2009), foram desenvolvidos com o intuito de facilitar a avaliação do potencial de expressão e estabilidade dos genes de referência em diferentes condições experimentais.

Recentemente, o pacu tem sido utilizado em número considerável de estudos de expressão gênica (Almeida *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010, Leitão *et al.*, 2011, Paula *et al.*, 2014). Entretanto, apenas duas sequências de oligonucleotídeos iniciadores (18S rRNA e ACTB) foram descritas até o presente momento para a normalização dos dados de quantificação relativa de RNAm para esta espécie.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do jejum prolongado, seguido de curto período de realimentação sobre as respostas de crescimento, metabólicas e hormonais em animais de pesos corporais diferentes, quantificar a prevalência de grupos bacterianos específicos na mucosa e conteúdo intestinal, bem como identificar e validar genes de referência apropriados para a quantificação relativa de RNAm hepático em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as respostas metabólicas ao jejum sobre os índices morfométricos (fator de condição, índice hepatossomático e índice gorduro-víscerosomático), sanguíneos (glicemia, triglicerídeos, colesterol e proteínas totais) e nos tecidos muscular e hepático (lipídeos, proteínas e glicogênio);
- Avaliar as respostas hormonais (cortisol, T3 e T4), durante a restrição alimentar e após a realimentação;
- Avaliar a prevalência de grupos bacterianos específicos na mucosa e conteúdo intestinal (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Actinobacteria* e *Lactobacillus*) de pacus;
- Clonar, sequenciar e validar potenciais genes de referência ( $\beta$ -actina, GAPDH, ACOX-3 e EEF1-A), para utilização em estudos quantitativos de expressão gênica em pacus;
- Clonar, sequenciar e caracterizar genes envolvidos no processo de crescimento e estresse de pacu (IGF-1, HSP70, e HSP90), cujos padrões de expressão serão quantificados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) no presente estudo.

## 4. REFERÊNCIAS

ABBOT, A. Gut reaction. **Nature**, v.427, 284-286, 2004.

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles – fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 1-9, 2007.

ALMEIDA, F.L.A., CARVALHO, R.F., PINHAL, D., PADOVANI, C.R., MARTINS, C., DAL PAI-SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, v.39, p.1306–1311, 2008.

- ALMEIDA, F.L.A., PESSOTI, N.S., PINHAL, D., PADOVANI, C.R., LEITÃO, N.J., CARVALHO, R.F., MARTINS, C., PORTELLA, M.C., DAL PAI-SILVA, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, v.41, p.997–1004, 2010.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. **General and Comparative Endocrinology**, v.164, p.142–150, 2009.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v.64, p.5245–5250, 2004.
- ANTONOPOULOU, E.; KENTEPOZIDOU, E.; FEIDANTISIS, K.; ROUFIDOU, C.; DESPOTI, S.; CHATZIFOTIS, S. Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 165, p. 79-88, 2013.
- AYSON, F.G.; JESUS-AYSON, E.G.T.; TAKEMURA, A. mRNA expression patterns for GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II during altered feeding status in rabbitfish, *Siganus guttatus*. **General and Comparative Endocrinology**, v.150, p.196-204, 2007.
- BANDEEN, J.; LEATHERLAND, J. F. Changes in the proximate composition of juvenile white suckers following re-feeding after a prolonged fast. **Aquaculture International**, v. 5, p. 327–337, 1997.
- BARCELLOS, L. J. G.; MARQUEZE, A.; TRAPP, M.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA, D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 300, p. 231-236, 2010.
- BARTOSCH, S. *et al.* Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3575-3581, 2004.
- BAS, A.; FORSBERG, G.; HAMMARSTROM, S.; HAMMARSTROM, M. L. Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. **Scandinavian journal of immunology**, v.59, p.566–573, 2004.
- BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M.R.; NAKANO K.; SCHULTE, P.M.; IWAMA G. K. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene**, v. 295, p. 173-183, 2002.
- BICUDO, A.J.A.; ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Exigências nutricionais e alimentação do pacu. In: D.M. Fracalossi e J.E.P. Cyrino. (Org.). **NUTRIAQUA Nutrição e Alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 1ed. Florianópolis: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012, v. 1, p. 217-229.
- BIENZ, M.; PELHAM, H. R. Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. **Advances in genetics**, v. 24, p. 31–72, 1987.
- BLANTON, M. L.; SPECKER, J. L. The Hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p.97–115, 2007.
- BROWN, K., DECOFFE, D.; MOLCAN, E.; GIBSON, D. L. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. **Nutrients**, v. 4(11), p.1552–1553, 2012.
- BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of molecular endocrinology**, v.29, p.23–39, 2002.
- BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of biomolecular techniques**, v.15, p.155–166, 2004.

- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J., et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, p.611–622, 2009.
- CARA, J.B.; ALURU, N.; MOYANO, F.J.; VIJAYAN, M.M. Food deprivation induces hsp70 and hsp90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.142, p. 426–431, 2005.
- CARUSO, G.; DENARO, M. G.; CARUSO, R.; GENOVESE L.; MANCARI, F.; MARICCHIOLO, G. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. **Marine Environmental Research**, v.81, p. 18-25, 2012.
- CURRIE, S.; TUFTS, B. L. Synthesis of stress protein 70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 607–614, 1997.
- CZESNY, S.; RINCHARD, J.; GARCIA ABIADO, M.A.; DABROWSKI, K. The effect of fasting, prolonged swimming, and predator presence on energy utilization and stress in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). **Physiology Behavior**, v. 79, p. 597–603, 2003.
- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v.50, p.227–230, 2010.
- DETHLEFSEN L, ECKBURG PB, BIK EM, RELMAN DA. Assembly of the human intestinal microbiota. **Trends Ecol Evol**, v.21(9), p.517–523, 2006.
- FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T.W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 120, p. 177–192, 1998.
- FARBRIDGE, K.J., LEATHERLAND, J.F. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.10, p.67–73. 1992.
- FEDER, M.E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999.
- FOX, B. K.; RILEY, L.G.; HIRANO, T.; GRAU, E. G. Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v.148, p. 340–347, 2006.
- FOX, B. K.; BREVES, J. P.; DAVIS, L. K.; PIERCE, A. L.; HIRANO, T.; GRAU, E.G. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. **General and comparative endocrinology**, v. 166, p. 573-580, 2010.
- FUKADA, H., OZAKI, Y., PIERCE, A.L., ADACHI, S., YAMAUCHI, K., HARA, A., SWANSON, P., DICKHOFF, W. W. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 67–71, 2004.
- GABILLARD, J.C.; KAMANGAR, B.B.; MONTSERRAT, N. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Endocrinology**, v. 191, p. 15–24, 2006.
- GIMBO, R. Y.; FÁVERO, G. C.; LUZ, N. F. M.; URBINATI, E. C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish and Shellfish Immunology**, doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.005, 2015.
- GOLIGORSKY, M. S. The concept of cellular 'fight-or-flight' reaction to stress. **American journal of physiology - Renal physiology**, v. 280, p. 551–561, 2001.
- GORNATI, R.; PAPIS, E.; RIMOLDI, S.; TEROVA, G.; SAROGLIA, M.; BERNARDINI, G. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Gene**, v. 341, p. 111–118, 2004.
- HEILIG, H. G. *et al.* Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 1, p. 114-123, 2002.

- HOPKINS MJ, SHARP R, MACFARLANE GT. Variation in human intestinal microbiota with age. **Digest Liver Dis**, v.34, S12–S18, 2002.
- HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. **Genes and immunity**, v.6, p.279–284, 2005.
- HUTCHINGS, J.A.; PICKLE, A.; MCGREGOR-SHAW, C.R.; POIRIER, L. Influence of sex, body size, and reproduction on overwinter lipid depletion in brook trout. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 1020–1028, 1999.
- HUTCHISON, K.A.; DITTMAR, K.D.; CZAR, M.J.; PRATT, W.B. Proof that hsp70 is required for assembly of the glucocorticoid receptor into a heterocomplex with hsp90. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.5043-5049, 1994.
- IWAMA, G. K.; THOMAS, P. T.; FORSYTH, R. B.; VIJAYAN, M. M. Heat shock protein in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 8, p. 35-56, 1998.
- IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, V. 39, 901–909, 1999.
- IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsp suitable for indicating stressed states in fish? **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 15-19, 2004.
- JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v.243, p.175-183, 2005.
- JØRGENSEN, E.H.; BYE, B.E.; JOBLING, M. Influence of nutritional status on biomarker responses to PCB in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Aquatic Toxicology**, v. 44, p.233–244, 1999.
- KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & therapeutics**, v.80, p.183–201, 1998.
- KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; da ROSA, J. G. S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. **Physiology and Behavior**, v. 106, p. 129-132, 2012.
- KOSIR, R.; ACIMOVIC, J.; GOLICNIK, M.; PERSE, M.; MAJDIC, G., et al. Determination of reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains. **BMC molecular biology**, v.11, p.60, 2010.
- KWON, Y. M.; RICKE, S. C. **High-throughput Next Generation Sequencing**. Springer, 2011.
- KUBITZA, F.; E. A. ONO. **Projetos aquícolas: planejamento e avaliação econômica**. 1. ed. Jundiá: F. Kubitza. 88 p., 2003.
- LEITÃO, N. J.; PAI-SILVA, M. D.; ALMEIDA, F. L. A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v.315, p.78–85, 2011.
- MACKENZIE, D.S.; VANPUTTE, C.M.; LEINER, K.A. Nutrient regulation of endocrine function in fish. **Aquaculture**, v. 161, p. 3–25, 1998.
- MADRID, J. A.; BOUJARD, T.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F.J. 2001. **Feeding rhythms**. In: Houlihan, D.; Boujard, T.; Jobling, M. (Eds.), Food intake in fish. Blackwell Science, UK, p. 189–215.
- MAHONEY, D.J.; CAREY, K.; FU, M.H.; SNOW, R.; CAMERON-SMITH, D., et al. Realtime RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. **Physiological genomics**, v.18, p.226–231, 2004.
- MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.62, p.670-684, 2005.
- METCALFE, N.B., THORPE, J.E. Anorexia and defended energy levels in overwintering juvenile salmon. **Journal of Animal Ecology**, v.61, p.175–181, 1992.

- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211–268, 1999.
- MORGAN, X.C., TICKLE, T.L., SOKOL, H., GEVERS, D., DEVANEY, K.L., WARD, D.V., REYES, J.A., SHAH, S.A., LELEIKO, N., SNAPPER, S.B., BOUSVAROS, A., KORZENIK, J., SANDS, B.E., XAVIER, R.J., HUTTENHOWER, C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome Biol.**, v. 13(9), R79, 2012.
- MORIMOTO, R.I.; SARGE, K.D.; ABRAVAYA, K. Transcriptional regulation of heat shock genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 21987–21990, 1992.
- MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, 2011, 60p. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf) > Acesso em: 12 janeiro 2014.
- NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Fasting and starvation. In: Hochachka, P. W., Mommsen, T. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Elsevier Science B.V, p. 393–434, 1995.
- NAYAK, S. K. Role of microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p.1553-1573, 2010.
- OKADA, T.; FUKUDA, S.; HASE, K.; NISHIUMI, S.; IZUMI, Y.; YOSHIDA, M.; HAGIWARA, T.; KAWASHIMA, R.; YAMAZAKI, M.; OSHIO, T.; OTSUBO, T.; INAGAKI-OHARA, K.; KAKIMOTO, K.; HIGUCHI, K.; KAWAMURA, Y.I.; OHNO, H.; DOHI, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. **Nat Commun** 2013, 4:1654.
- O'MAHONY, S.M.; MARCHESI, J.R.; SCULLY, P.; CODLING, C.; CEOLHO A.M.; QUIGLEY, E.M.; CRYAN, J.F.; DINAN, T.G. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. **Biol Psychiatry**, v.65, n3, p.263–267, 2009.
- ORTIZ, R. M.; WADE, C. E.; ORTIZ, C. L. Effects of prolonged fasting on plasma cortisol and TH in postweaned northern elephant seal pups. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, R790–R795, 2001.
- OVIDO-RONDÓN, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 209-225, 2009.
- PAULA, T.G.; ALMEIDA, F.L.A.; CARANI, F.R.; VECHETTI-JÚNIOR, I.J.; PADOVANI, C.R.; SALOMÃO, R.A.S.; MARECO, E. A.; SANTOS, V.B.; DAL-PAI-SILVA, M. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.169, p.31–37, 2014.
- PEDROSO, F.L.; FUKADA, H.; MASUMOTO, T. Molecular characterization, tissue distribution patterns and nutritional regulation of IGFBP-1, -2, -3 and -5 in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. **General and Comparative Endocrinology**, v.161, p.344-353, 2009.
- PÉREZ-SANCHEZ, J.; LE BAIL, P. Y. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. **Aquaculture**, v. 177, p. 117–128, 1999.
- PETERSON, B. C.; SMALL, B. C. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology**, v. 26, p. 231–240, 2004.
- PICHA, M. E.; SILVERSTEIN, J. T.; BORSKI, R. J. Discordant regulation of hepatic IGF-I mRNA and circulating IGF-I during compensatory growth in a teleost, the hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, p. 196–205, 2006.
- PIERCE, A.L.; BECKMAN, B.R.; SHEARER, K.D.; LARSEN, D.A.; DICKHOFF, W.W. Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.128, p.255– 264, 2001.
- PIERCE, A.L.; SHIMIZU, M.; BECKMAN, B.R.; BAKER, D.M.; DICKHOFF, W.W. Time course of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 140, p. 192–202, 2005.

- POWER, D.M.; MELO, J.; SANTOS, C.R.A. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. **Journal of Fish Biology**, v.56, p.374-387, 2000.
- POWER, D.M.; LLEWELLYN, L.; FAUSTINO, M.; NOWELL, M.A.; BJORNSSON, B.T.; EINARSDOTTIR, I.E.; CANARIO, A.V.M.; SWEENEY, G.E. Thyroid hormones in growth and development of fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.130, p.447-459, 2001.
- RADONIC', A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W., et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical research communications**, v.313, p.856–862, 2004.
- RASTALL, R. A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 2022-2026, 2004.
- RINGØ, E.; BIRKBECK T.H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, p73-93, 1999.
- RINTTILÄ, T. *et al.* Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1166-1177, 2004.
- RITALAHTI, K. M. *et al.* Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2765-2774, 2006.
- SAVAGE D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v.31,p.107-133, 1977.
- SMALL, B. C. Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 142, 217–223, 2005.
- SMALL, B. C.; PETERSON, B. C. Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p.202–215, 2005.
- SMALL, B. C.; MURDOCK, C. A.; BILODEAU-BOURGEOIS, A. L.; PETERSON, B. C.; WALDBIESER, G. C. Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tissues under varying physiological conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.151, p.296–304, 2008.
- SOUZA, V.L.; OLIVEIRA, E.G.; URBINATI, E.C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **J. Aquac. Trop.**, v.15, n.4, p.371-379, 2000.
- SOUZA, V.L.; URBINATI, E.C.; GONÇALVES, D.C.; SILVA, P.C. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p.533-540, 2002.
- SOUZA, V.L.; URBINATI, E.C.; MARTINS, M.I.; SILVA, P.C. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.19-28, 2003.
- STEIBEL, J.P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P.M.; ROSA, G.J.M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v.94, p.146–152, 2009.
- TANAKA S, KOBAYASHI T, SONGJINDA P, TATEYAMA A, TSUBOUCHI M, KIYOHARA C, SHIRAKAWA T, SONOMOTO K, NAKAYAMA J. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. **Fems Immunol Med Mic**, v.56(1), p. 80–87, 2009.

- TAKAHASHI, L. S. **Estratégia alimentar, teores de carboidratos dietéticos, desempenho e respostas fisiológicas do pacu *Piaractus mesopotamicus***. 2007. 89f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- TAKAHASHI, L.S.; BILLER, J.D.; CRISCUOLO-URBINATI, E.; URBINATI, E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, p. 259-266, 2011.
- TALAAT, A. M.; HOWARD, S.T.; HALE, I.V.W.; LYONS, R.; GARNER, H., et al. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nucleic acids research**, v.30, e104–e104, 2002.
- THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B., et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of biotechnology**, v.75, p.291–295, 1999.
- TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242–249, 2012.
- TURNBAUGH P.J., HAMADY M, YATSUNENKO T, CANTAREL BL, DUNCAN A, LEY RE, SOGIN ML, JONES WJ, ROE BA, AFFOURTIT JP, EGHOLM M, HENRISSAT B, HEATH AC, KNIGHT R, GORDON JI: A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457(7228), p.480–484, 2009.
- URBINATI, E. C.; GONCALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, capítulo 8, p.1-606.
- UCHIDA, K.; KAJIMURA, S.; RILEY, L.G.; HIRANO, T.; AIDA, K.; GRAU, E.G. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 134, p. 429–439, 2003.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v.3, research0034, 2002.
- VISCARRA, J.A.; ORTIZ, R.M. Cellular mechanisms regulating fuel metabolism in mammals: Role of adipose tissue and lipids during prolonged food deprivation. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.62, p.889-897, 2013.
- WEBER, T. E.; BOSWORTH, B. G. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. **Aquaculture**, v. 246, p. 483–492, 2005.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. v.77, p. 591-625, 1997.
- WESTWOOD, J.T.; CLOS J.; WU, C. Stress induced oligomerization and chromosomal localization of heat shock factor. **Nature**, v. 353, p.822–827, 1991.
- WOOD, A.W.; DUAN, C.; BERN, H. A. Insulin-like growth factor signaling in fish. **International Review of Cytology**, v. 243, p. 215–285, 2005.
- XIA, J. H.; LIN, G.; FU, G.H.; WAN, Z.Y.; LEE, M.; WANG, L.; LIU, X.J.; YUE, G. H. The intestinal microbiome of fish under starvation. **BMC Genomics**, v.15, 266, 2014.
- YANG, Q.; LI, Z.; CAO, J.; ZHANG, S.; ZHANG, H.; WU, X.; ZHANG, Q.; LIU, X. Selection and Assessment of Reference Genes for Quantitative PCR Normalization in Migratory Locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). **PLOS ONE**, v.9., n.6, e98164, 2014.
- YOUNG, J.C.; MOAREFI, I.; HARTL, F.U. Hsp90: A specialized but essential protein-folding tool. **Journal of Cell Biology**, v.154, p.267–273, 2001.
- YU, Y. *et al.* Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 670-679, 2005.
- ZARATE, J.; BRADLEY, T.M. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. **Aquaculture**, v. 223, p. 175–187, 2003.

## **CAPÍTULO 2 – EFEITOS DA PRIVAÇÃO ALIMENTAR PROLONGADA E REALIMENTAÇÃO SOBRE AS RESPOSTAS METABÓLICAS EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) DE DIFERENTES TAMANHOS**

**RESUMO** – Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do tamanho corporal sobre a dinâmica metabólica de juvenis de pacu durante o jejum prolongado (21 dias) seguido de realimentação (7 dias). Para isso, peixes de duas categorias de peso distintas (peixes com aproximadamente 150g e 350g) foram amostrados para avaliação dos parâmetros morfométricos (índice hepatossomático, índice gorduro-víscerosomático e fator de condição), metabólitos sanguíneos (glicose, triglicérides, colesterol, proteína total), reserva tecidual (glicogênio hepático, lipídeos e proteínas do fígado e músculo) e respostas hormonais (cortisol, T3 e T4). De maneira geral, os peixes mantidos em jejum apresentaram redução do peso corporal, IHS, IGVS, glicose e triglicérides sanguíneas, e nos teores de lipídeos no músculo e fígado, e aumento nos níveis de colesterol plasmáticos. As respostas de cortisol frente ao jejum foram diferentes nos dois ensaios: em peixes menores verificou-se redução dos níveis séricos de cortisol, e peixes maiores apresentaram aumento dos níveis desse hormônio. O jejum promoveu redução dos níveis de T3, porém nenhum efeito foi verificado nos níveis de T4. Nenhum efeito do jejum ou realimentação foi observado para K, glicogênio hepático ou proteína muscular. Entretanto, a recuperação das reservas mostrou comportamento distinto nos dois experimentos. Os resultados obtidos sugerem que o pacu possui grande capacidade de mobilização de suas reservas endógenas, independente do tamanho corporal. Porém, ao final do período de realimentação, as taxas de recuperação destes estoques foram mais eficientes em peixes menores, sugerindo que a utilização de jejum para obtenção de ganho compensatório é mais efetiva nas fases iniciais de engorda. Além disso, a restrição de alimento parece ser uma prática interessante, no sentido de reduzir os teores lipídicos da carne de pacu.

**Palavras-chave:** jejum, metabolismo, lipídeos, glicogênio, cortisol, triiodotironina, tiroxina

## **CHAPTER 2 – EFFECTS OF LONG FOOD DEPRIVATION AND REFEEDING ON THE METABOLIC RESPONSES IN PACU (*Piaractus mesopotamicus*) WITH DIFFERENT SIZES**

**ABSTRACT** - This study aimed to evaluate the influence of body size on the metabolic dynamics of pacu juveniles during prolonged fasting (21 days) followed by refeeding (7 days). For this, fish in two different weight classes (fish with approximately 150g and 350g) were sampled for evaluation of morphometric parameters (hepatosomatic index, mesenteric fat index and condition factor), blood metabolites (glucose, triglycerides, cholesterol, total protein), tissue reserves (glycogen liver, lipids and liver and muscle protein), and hormones (cortisol, T3 and T4). In general, fasted fish decreased body weight, IHS, IGVS, blood glucose and triglycerides, and lipid concentrations in muscle and liver, and increased plasma cholesterol levels were observed. The cortisol responses in fasting were different in the two experiments: in smaller fish there was a reduction of serum levels, and larger fish showed an increase in cortisol levels. Prolonged fasting promoted reduction of T3 levels, but no effect was observed in T4 levels. No effect of fasting and refeeding was observed for condition factor, hepatic glycogen and muscle protein. However, the recovery of reserves showed different responses in both experiments. The results suggest that the pacu has great capacity to mobilize their endogenous reserves, regardless of body size. However, in the refeeding period, the recovery rates of these stocks were more effective in smaller fish, suggesting that the use of fasting for obtaining a compensatory gain is more effective in the early stages of growout phase. Moreover, the food restriction seems to be an interesting practice to reduce the lipid content of pacu meat.

**Keywords:** fasting, starvation, metabolism, lipid, glycogen, cortisol, triiodotironine, tiroxine

## 1. Introdução

A produção de peixes de água doce no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos (MPA, 2011). Dentre as espécies onívoras nativas de interesse comercial, o pacu *Piaractus mesopotamicus* figura entre as de maior importância para sistemas de produção intensivos, por apresentar rápido crescimento e facilidade de adaptação a dietas formuladas.

Tanto em condições naturais quanto na aquicultura, o pacu pode passar por longos períodos de restrição alimentar ou jejum. Na natureza, a redução na ingestão de alimento é uma ocorrência comum nesta espécie, caracterizada por realizar migração para desova. Na aquicultura, o pacu pode estar sujeito ao jejum em alguns regimes de alimentação, com o objetivo de indução do ganho compensatório (Takahashi *et al.*, 2011).

O período de jejum envolve uma série de adaptações fisiológicas com a finalidade de promover o ajuste biológico do animal a esta condição e suas consequências finais são altamente dependentes da espécie considerada, das condições experimentais (Love, 1980; Weatherley e Gill, 1987), dieta e duração do jejum (Machado *et al.* 1988) e também da idade/tamanho dos peixes (Love, 1980; Blasco *et al.*, 1991). Desta maneira, é muito difícil encontrar uma resposta metabólica geral ou comum em peixes (Blasco *et al.*, 1992). A estratégia de jejum seguida de realimentação consiste em uma ferramenta para manipulação destas alterações bioquímicas e metabólicas (Baldan, 2008).

As macromoléculas desempenham duplo papel em sistemas vivos: durante períodos de balanço energético positivo, apresentam funções estruturais e funcionais; e sofrem degradação em condições de balanço energético negativo (Guderley *et al.*, 2003). Em situações de privação de alimento, os peixes redirecionam suas reservas energéticas para manutenção dos processos vitais, em detrimento ao crescimento (Sumpter *et al.*, 1991). A dinâmica de utilização destas reservas de energia no fígado e músculo esquelético permite que os peixes possam lidar com o aumento de demanda energética durante períodos de estresse (Menezes *et al.*, 2015). A tolerância dos peixes ao jejum está diretamente relacionada com as taxas de consumo destas reservas (Barcellos *et*

*al.*, 2010; Liew *et al.*, 2012), e quando estas são insuficientes, a biomassa estrutural pode ser consumida até determinado ponto (Rios *et al.*, 2011).

Na maioria das espécies de peixes, a primeira reserva energética a ser mobilizada durante o jejum é o glicogênio (Navarro e Gutiérrez, 1995). As fases subsequentes são definidas principalmente pelo tipo de combustível metabólico catabolizado e podem ser descritas pelas seguintes características: a) uma fase transitória de curta duração, onde tanto as reservas de proteínas quanto de lipídeos são mobilizadas; b) um estágio mais longo e estável, com mobilização de gordura como principal fonte de energia, até que os estoques lipídicos atinjam um limiar crítico e c) um estágio em que a mobilização de proteínas nos tecidos é mais acentuada, tornando-se a principal fonte energética (Bar e Volkoff, 2012).

Os níveis de cortisol plasmático são frequentemente caracterizados por uma elevação em resposta à privação alimentar em mamíferos (Viscarra e Ortiz, 2013). No entanto, o tipo de resposta observado em peixes é muitas vezes contraditório. Existem relatos frequentes na literatura de aumento nos níveis plasmáticos de cortisol (Peterson e Small, 2004; Barcellos *et al.*, 2010; Caruso *et al.*, 2012, Gimbo *et al.*, 2015). Outros autores verificaram redução nos níveis de cortisol (Small, 2005) ou ainda nenhum efeito da privação alimentar sobre os níveis de cortisol em peixes (Vijayan *et al.*, 1993; Reddy *et al.*, 1995; Jørgensen *et al.*, 1999). Além disso, a idade dos peixes também parece ser um fator determinante na resposta hormonal frente ao jejum. Recentemente, Koakoski *et al.* (2012) demonstraram que embora os peixes em diferentes estágios de desenvolvimento tenham apresentado um padrão semelhante de elevação do cortisol plasmático em resposta a diferentes agentes estressores, os tempos de resposta do hormônio apresentaram-se de maneira distinta.

Os hormônios tireoidianos (triiodotironina-T3 e tiroxina-T4) desempenham um importante papel metabólico, por promoverem redução da mobilização de reservas energéticas, atuando como um mecanismo de sobrevivência (Navarro e Gutiérrez, 1995; Mackenzie *et al.*, 1998, Blanton e Specker, 2007). Estudos prévios em peixes já demonstraram que os níveis dos hormônios tireoidianos diminuem significativamente durante o período de privação de alimento (Farbridge e Leatherland, 1992), entretanto estes níveis são restabelecidos em diferentes taxas durante o período de realimentação (Takahashi *et al.*, 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar se a restrição alimentar prolongada (21 dias), seguida de curto período de realimentação (7 dias), promove respostas de crescimento, metabólicas (índice hepatossomático, índice gorduro-viscerossomático e fator de condição; glicose, colesterol, triglicérides, proteínas totais sanguíneas; glicogênio hepático, proteínas e lipídeos totais de músculo e fígado) e hormonais (cortisol, T3 e T4) diferenciadas em pacus de pesos corporais diferentes.

## **2. Material e métodos**

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética Animal (CEUA) e realizados conforme as orientações dos princípios éticos em experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA).

### **2.1. Peixes e condições experimentais**

#### *Experimento 1*

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Laboratório de Tilapicultura, Jaboticabal, São Paulo, durante o período de 11 de setembro a 9 de outubro de 2013.

Foram utilizados 120 juvenis de pacu, com peso médio inicial de  $143,04 \pm 49,23$  g e  $18,47 \pm 2,20$  cm, provenientes do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP). Os juvenis foram estocados em 12 aquários experimentais com volume útil de 150 L, dotados de sistema de recirculação de água e aeração constante, na densidade de 10 peixes/aquário e então foram submetidos a um período de aclimação de três semanas às condições experimentais antes do início dos tratamentos. Durante o período de aclimação, os peixes foram alimentados com dieta comercial para espécies onívoras, em uma frequência de duas vezes ao dia.

Semanalmente, foram determinadas as variáveis de qualidade de água: temperatura, oxigênio dissolvido (YSI- *Yellow Springs Instruments* 550A) e pH

(YSI – *Yellow Springs Instruments/Ecosense* pH 100A). Durante esta mesma ocasião foi coletada amostras de água para determinação de amônia (Koroleff, 1976), nitrato e nitrito (Mackereth *et al.*, 1978). Os parâmetros físico-químicos da água são apresentados na Tabela 1. O fotoperíodo foi de 12 h de luz: 12h de escuro.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental (11 de setembro a 9 de outubro de 2013).

| Tratamento   | Semana | pH        | Oxigênio<br>dissolvido | Temperatura | Amônia             | Nitrato            | Nitrito            |
|--------------|--------|-----------|------------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|              |        |           | mg.L <sup>-1</sup>     | °C          | µg.L <sup>-1</sup> | µg.L <sup>-1</sup> | µg.L <sup>-1</sup> |
| Controle     | 1      | 7,57±0,02 | 6,45±0,13              | 24,63±0,10  | 136,50±28,00       | 348,00±2,97        | 5,00±0,71          |
|              | 2      | 7,57±0,05 | 4,88±0,46              | 26,60±0,08  | 245,10±34,79       | 381,30±20,36       | 11,35±1,63         |
|              | 3      | 7,45±0,05 | 4,38±0,52              | 26,25±0,19  | 491,85±52,26       | 541,20±29,84       | 10,40±0,01         |
| Jejum        | 1      | 7,61±0,02 | 6,53±0,05              | 24,63±0,05  | 54,65±8,27         | 364,50±43,70       | 3,70±1,70          |
|              | 2      | 7,61±0,02 | 5,23±0,24              | 26,65±0,06  | 107,85±36,70       | 359,35±41,37       | 3,80±1,98          |
|              | 3      | 7,78±0,04 | 6,10±0,29              | 26,38±0,05  | 117,00±19,23       | 490,05±19,16       | 3,55±0,35          |
| Realimentado | 1      | 7,58±0,03 | 6,75±0,20              | 24,42±0,10  | 57,5±18,24         | 352,55±43,63       | 3,60±0,56          |
|              | 2      | 7,59±0,02 | 6,23±0,10              | 24,50±0,08  | 67,30±35,50        | 375,15±32,60       | 3,30±0,85          |
|              | 3      | 7,70±0,02 | 5,63±0,34              | 26,58±0,10  | 70,90±48,65        | 356,1±17,54        | 3,10±0,57          |
|              | 4      | 7,80±0,03 | 6,15±0,25              | 26,45±0,06  | 291,10±124,88      | 507,95±10,11       | 7,50±0,14          |

### *Experimento 2*

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), Jaboticabal, São Paulo, durante o período de 17 de fevereiro a 17 de março de 2014. O fotoperíodo foi de 13 h de luz: 11 h de escuro.

Foram utilizados 30 juvenis de pacu, com peso médio inicial de 346,77 ± 25,82 g, e comprimento 25,86 ± 0,72 cm, provenientes do Centro de Aquicultura da

Unesp (CAUNESP). Os juvenis foram estocados em três aquários experimentais de fibrocimento com volume útil de 500 L, dotados de fluxo contínuo de água e aeração constante, na densidade de 10 peixes/aquário e então foram submetidos a um período de aclimação de 3 semanas às condições experimentais antes do início dos tratamentos. Durante o período de aclimação, os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com dieta comercial formulada para espécies onívoras.

De maneira similar ao primeiro experimento, semanalmente foram aferidos os parâmetros físicos e químicos da água: temperatura, oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito e nitrato. Os parâmetros físico-químicos monitorados durante o período experimental são apresentados na Tabela 2. Em ambos os experimentos, os parâmetros físico-químicos da água mantiveram-se dentro dos níveis aceitáveis para espécies de peixes neotropicais (Boyd, 1981).

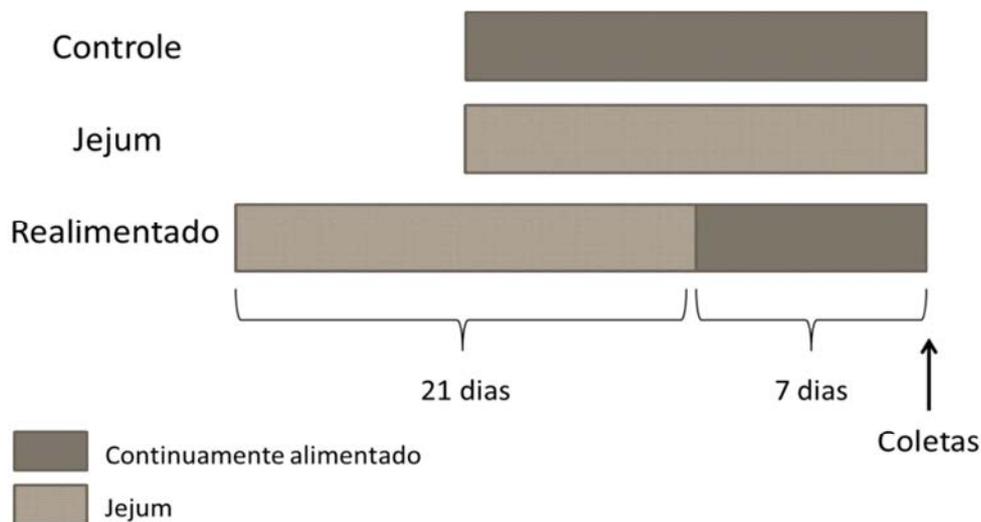
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água dos aquários experimentais (17 de fevereiro a 17 de março de 2014).

| Tratamento   | Semana | pH   | Oxigênio<br>dissolvido | Temperatura | Amônia             | Nitrato            | Nitrito            |
|--------------|--------|------|------------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|              |        |      | mg.L <sup>-1</sup>     | °C          | µg.L <sup>-1</sup> | µg.L <sup>-1</sup> | µg.L <sup>-1</sup> |
| Controle     | 1      | 7,74 | 5,7                    | 31,2        | 270,31             | 152,54             | 14,19              |
|              | 2      | 7,67 | 4,8                    | 30,8        | 263,13             | 126,26             | 9,86               |
|              | 3      | 7,40 | 3,0                    | 30,7        | 540,69             | 158,63             | 21,23              |
| Jejum        | 1      | 8,02 | 6,4                    | 31,5        | 44,49              | 113,12             | 0,93               |
|              | 2      | 8,05 | 6,1                    | 31,0        | 61,79              | 101,70             | 0,66               |
|              | 3      | 8,03 | 6,1                    | 30,7        | 64,39              | 131,78             | 1,06               |
| Realimentado | 1      | 8,00 | 6,3                    | 31,0        | 45,68              | 110,82             | 0,78               |
|              | 2      | 8,08 | 6,5                    | 31,2        | 38,43              | 102,46             | 0,93               |
|              | 3      | 8,10 | 6,2                    | 30,6        | 26,32              | 95,42              | 0,62               |
|              | 4      | 7,57 | 4,2                    | 30,5        | 196,33             | 116,93             | 3,77               |

## 2.2. Delineamento experimental e amostragem

Os peixes foram distribuídos em três grupos: (1) Alimentados continuamente por um período de 21 dias (Controle); (2) Privação alimentar por um período de 21

dias (Jejum); e (3) Privação alimentar de 21 dias seguida de realimentação por um período de 7 dias (Realimentado), conforme esquema representado na Figura 1. Os peixes dos tratamentos controle e submetidos à realimentação foram alimentados com dieta comercial formulada, contendo 32% de proteína bruta (Fri-Aqua Onívoros®, Crescimento Inicial, 4-6mm no experimento 1; 6-8mm no experimento 2), em uma frequência de duas vezes ao dia (9:00 e 17:00), até a saciedade aparente. Ao início do período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína, na proporção de 0,1 g. L<sup>-1</sup> de água, para realização das medidas individuais de peso e comprimento total.



**Figura 1.** Esquema experimental.

Ao final do período experimental, 10 peixes de cada tratamento, mantidos previamente em jejum por 16 horas antes do período de coleta, foram anestesiados (benzocaína 0,1 g. L<sup>-1</sup>), para retirada de sangue e mensurações de peso e comprimento, para determinação do fator de condição (K)  $[(\text{peso}/\text{comprimento}^3) \times 100]$ . O sangue, extraído a partir de vasos caudais, foi dispensado em microtubos contendo anticoagulante (plasma) e microtubos sem anticoagulante (soro). O plasma foi separado por centrifugação imediata do sangue (3000 g, durante 10 minutos a 4 °C), e o soro foi obtido após o sangue ser mantido a temperatura ambiente durante 3 horas para coagular, e então em seguida centrifugado (3000 g, durante 10 minutos a 4 °C) e armazenado a -20 °C.

Após a amostragem de sangue, os peixes foram sacrificados (benzocaína 0,4 g. L<sup>-1</sup>) e a gordura mesentérica, o fígado e músculo branco da porção dorsal foram retirados. A gordura mesentérica e o fígado foram pesados para

determinação do índice gorduro-viscerossomático (IGVS) e índice hepatossomático (IHS)  $[(\text{peso do tecido})/(\text{peso corporal}) \times 100]$ . O músculo branco foi processado para determinar a concentração de lipídeos e proteínas, enquanto o fígado foi dividido em duas porções, uma utilizada para determinação de lipídeos, proteínas e glicogênio, e outra porção foi armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de extração do RNA (Capítulo 4).

### **2.3. Procedimentos específicos**

#### *Metabólitos sanguíneos e teciduais*

O plasma foi utilizado para a determinação das concentrações de glicose e triglicérides sanguíneas (Labtest Kit®, códigos 84 e 87, respectivamente) e o soro para determinação das concentrações de colesterol e proteínas totais do sangue (Labtest Kit®, códigos 76 e 99, respectivamente). As concentrações foram determinadas pelo método enzimático, de acordo com recomendações fornecidas pelo fabricante. O glicogênio hepático foi determinado por lise em amiloglicosidase após extração com ácido perclórico a 7% (Moon *et al.*, 1989). Os níveis de lipídeos de fígado e músculo foram determinados após extração em solução clorofórmio/metanol (Bligh e Dyer, 1959) e as concentrações de proteínas no fígado e músculo foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

#### *Hormônios*

As concentrações de cortisol, T3 e T4 séricos foram determinadas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando-se kits comerciais para uso em humanos e validados para peixes (DRG International, Inc.®, código EIA – 1887; DS-EIA-Thyroid-T3-Total, código TH-152; e DS-EIA-Thyroid-T4-Total, código TH-252, respectivamente), seguindo os protocolos fornecidos pelos fabricantes. As concentrações de hormônios tireoidianos não foram determinadas no Experimento 1, devido a quantidade insuficiente de sangue obtido.

## 2.4. Análise estatística

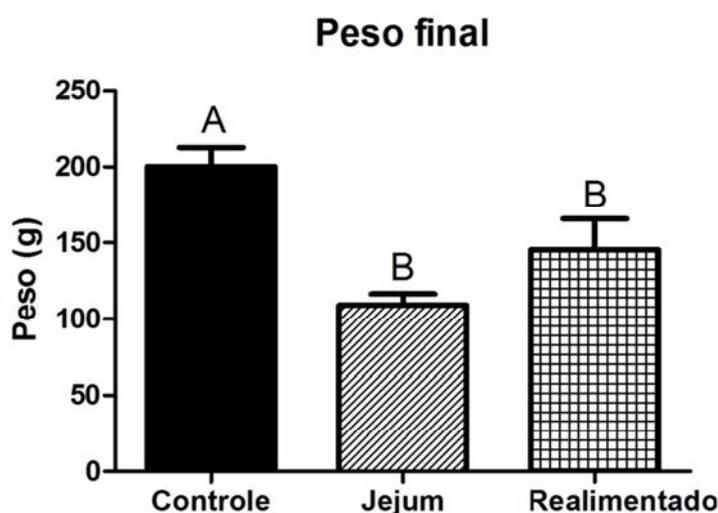
O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado composto por três tratamentos com dez réplicas cada ( $n=10$ ), e os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA. As médias, quando significativamente diferentes, foram comparadas pelo teste de Tukey. A normalidade dos erros e homoscedasticidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Cramer Von-Mises e Brown-Forsythe, respectivamente.  $P < 0,05$  foi utilizado como o nível de significância estatística. Os valores nas figuras correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m).

## 3. Resultados

### 3.1. Peso médio final

#### *Experimento 1*

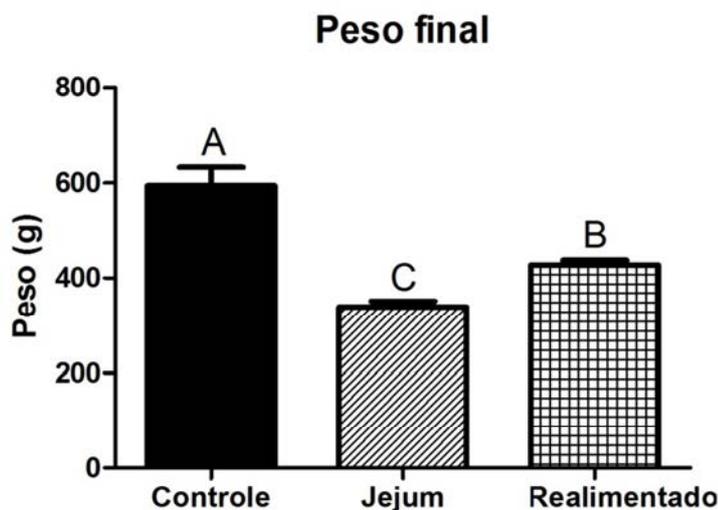
Os valores de peso médio final dos peixes referentes ao primeiro ensaio são apresentados na Figura 2. Verificou-se redução significativa do peso corporal (aproximadamente 45%) nos animais em jejum ( $P < 0,05$ ). Não foi verificada recuperação do peso ao final de 7 dias de realimentação, sendo que as médias foram semelhantes ao peixes em jejum ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Peso médio final de pacus (peso médio inicial:  $143,04 \pm 49,23$ g; comprimento médio inicial:  $18,47 \pm 2,20$ cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias, após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### Experimento 2

Os valores de peso médio final dos peixes referentes ao segundo ensaio são apresentados na Figura 3. Verificou-se redução significativa do peso corporal (aproximadamente 45%) nos animais em jejum ( $P < 0,05$ ). Ao final do período de realimentação, os peixes apresentaram maior peso ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo em jejum, entretanto não foi observada recuperação total do peso corporal.

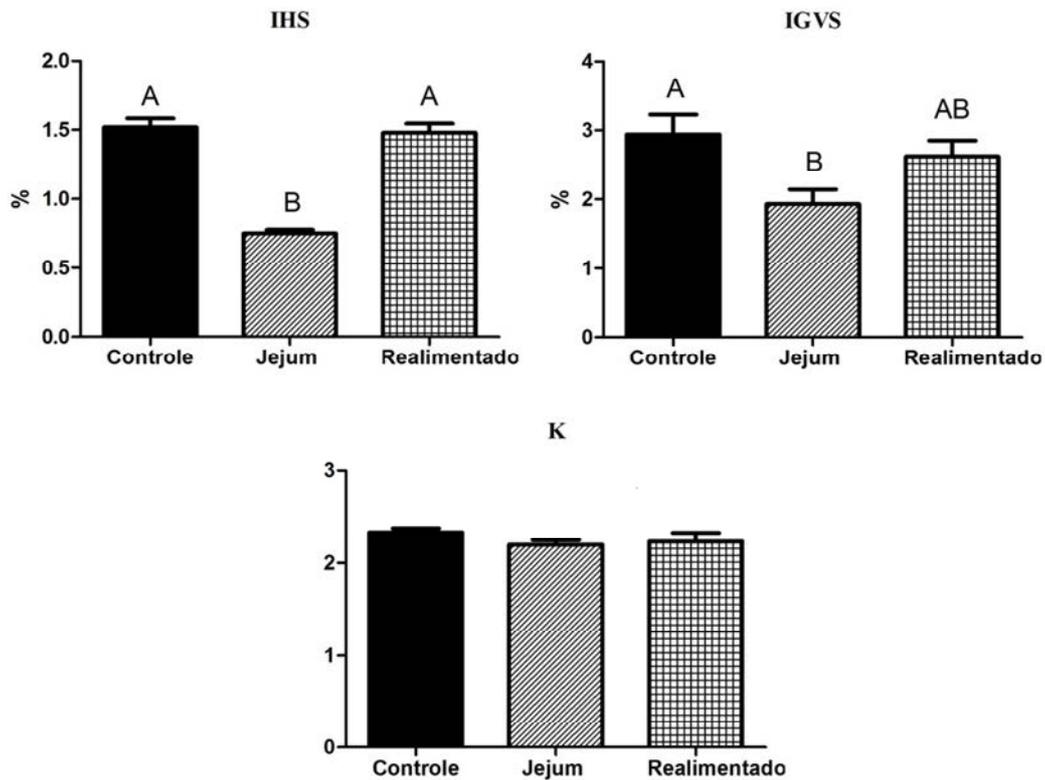


**Figura 3.** Peso médio final de pacus (peso médio inicial:  $346,77 \pm 25,82$ g; comprimento médio inicial:  $25,86 \pm 0,72$ cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias, após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### 3.2. Índices morfométricos

#### Experimento 1

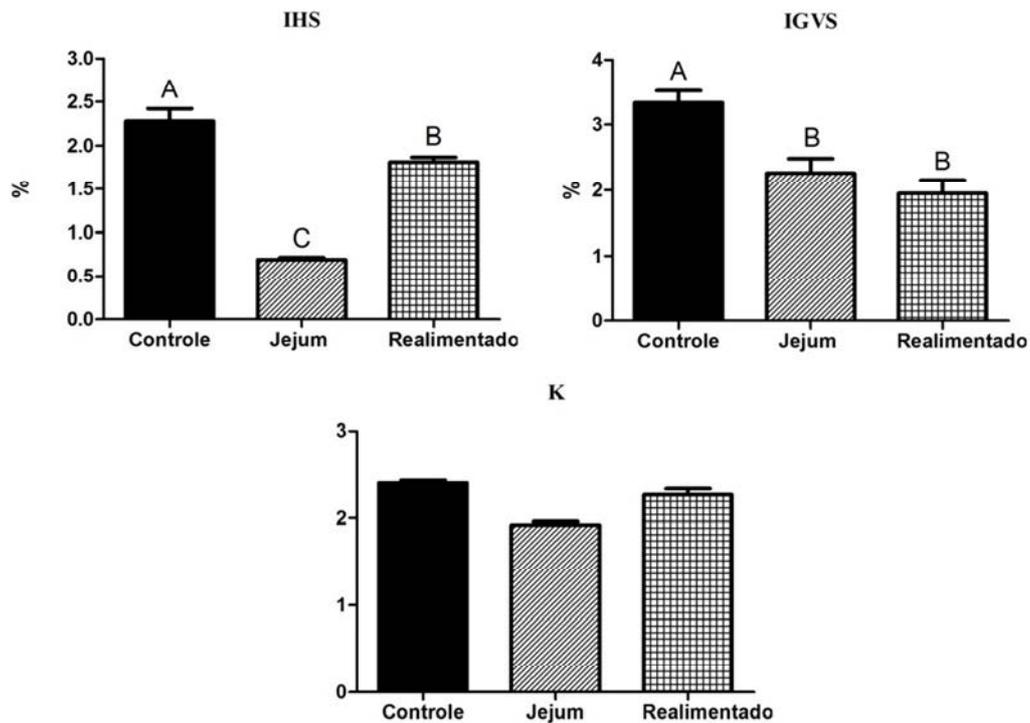
Os valores dos índices morfométricos referentes ao primeiro ensaio são apresentados na Figura 4. Ao final do período experimental, verificou-se redução significativa do IHS (aproximadamente 49%) ( $p < 0,05$ ), tendo os valores restabelecidos após 7 dias de realimentação. O IGVS apresentou redução no grupo submetido ao jejum (aproximadamente 35%), porém os valores foram restabelecidos ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças para o fator de condição (K) entre os tratamentos.



**Figura 3.** Índices morfométricos de pacus (peso médio inicial:  $143,04 \pm 49,23$ g; comprimento médio inicial:  $18,47 \pm 2,20$ cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### Experimento 2

Os valores dos índices morfométricos referentes ao segundo ensaio são apresentados na Figura 5. Ao final do período de 21 dias de jejum, verificou-se redução de aproximadamente 70% do IHS ( $p < 0,05$ ), e os níveis não foram restabelecidos ao final do período de realimentação. O IGVS apresentou redução no grupo submetido ao jejum (aproximadamente 32%), não diferindo significativamente do grupo realimentado ( $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças para o fator de condição (K) entre os tratamentos.

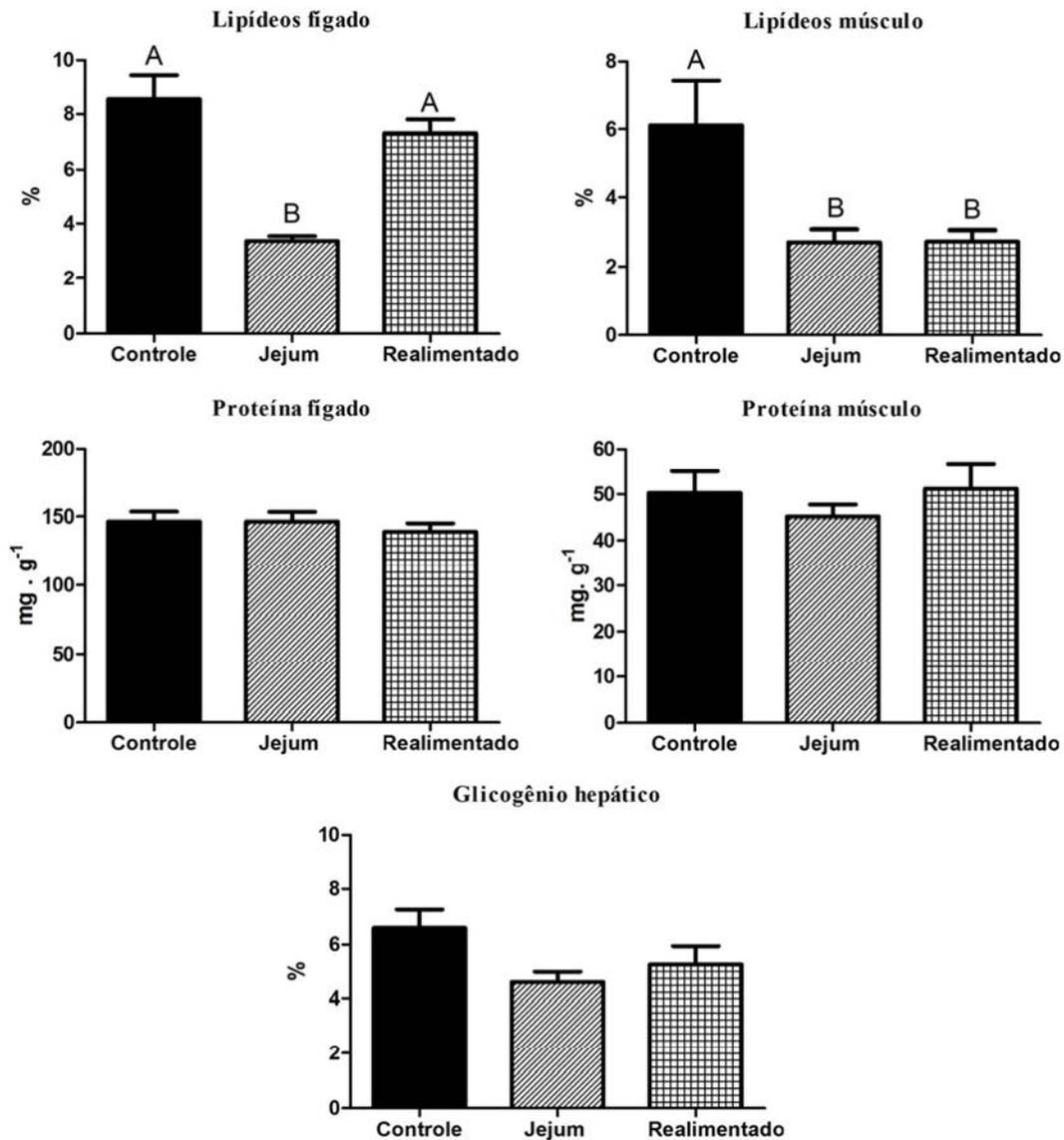


**Figura 5.** Índices morfométricos de pacus (peso médio inicial:  $346,77 \pm 25,82g$ ; comprimento médio inicial:  $25,86 \pm 0,72cm$ ) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### 3.3. Composição tecidual

#### *Experimento 1*

Os teores de proteína e lipídeos no músculo e fígado e glicogênio hepático referente ao primeiro ensaio são apresentados na Figura 6. Verificou-se redução nos teores de lipídeos no fígado dos animais em jejum (aproximadamente 60%), mas os valores foram restabelecidos após 7 dias de realimentação ( $p < 0,05$ ). Diminuição nos teores de lipídeos também foi observada no músculo dos peixes em jejum (aproximadamente 55%), entretanto não se observou o restabelecimento dos níveis basais após o período de realimentação. Não foram verificados efeitos do jejum ou realimentação nos teores de glicogênio hepático ou nos níveis de proteína no fígado e músculo ( $p < 0,05$ ).

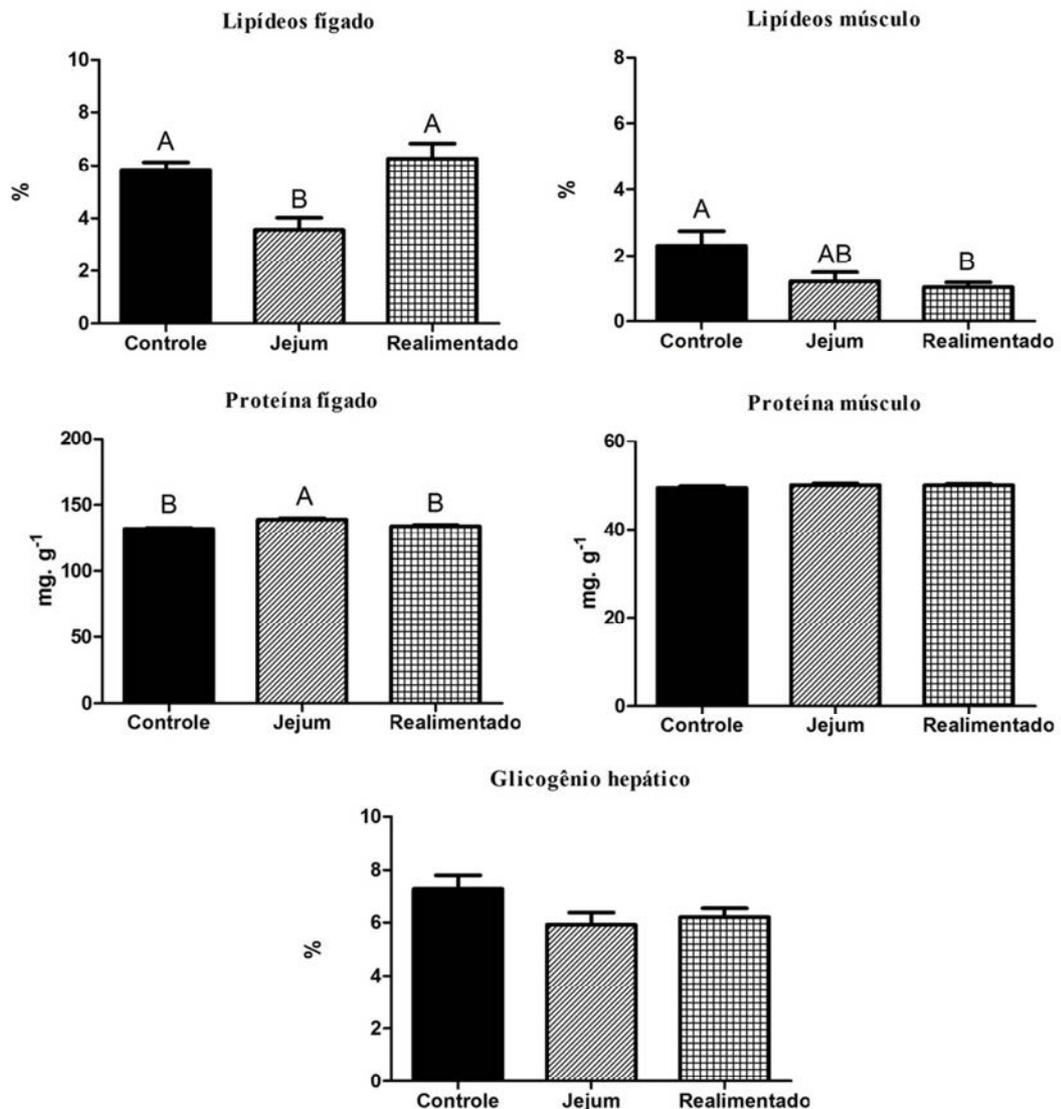


**Figura 6.** Composição tecidual de fígado e músculo de pacu (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias ± erro padrão da média ( $n=10$ ).

### Experimento 2

Os teores de proteína e lipídeos no músculo e fígado e glicogênio referente ao segundo ensaio são apresentados na Figura 7. Verificou-se redução nos teores de lipídeos (39%) no fígado dos animais em jejum, sendo que os valores foram restabelecidos após 7 dias de realimentação. Os teores de lipídeos musculares, apesar de numericamente menores (37%) nos peixes em jejum, não diferiram estatisticamente em relação ao grupo controle e realimentado ( $p < 0,05$ ). Foi verificada uma ligeira elevação nos níveis de proteína no fígado dos peixes em

jejum, e reduzidos aos níveis basais após o período de realimentação. Não foram observados efeitos do jejum e realimentação nos teores de proteína muscular e glicogênio hepático entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Composição tecidual de fígado e músculo de pacu (peso médio inicial:  $346,77 \pm 25,82$ g; comprimento médio inicial:  $25,86 \pm 0,72$ cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

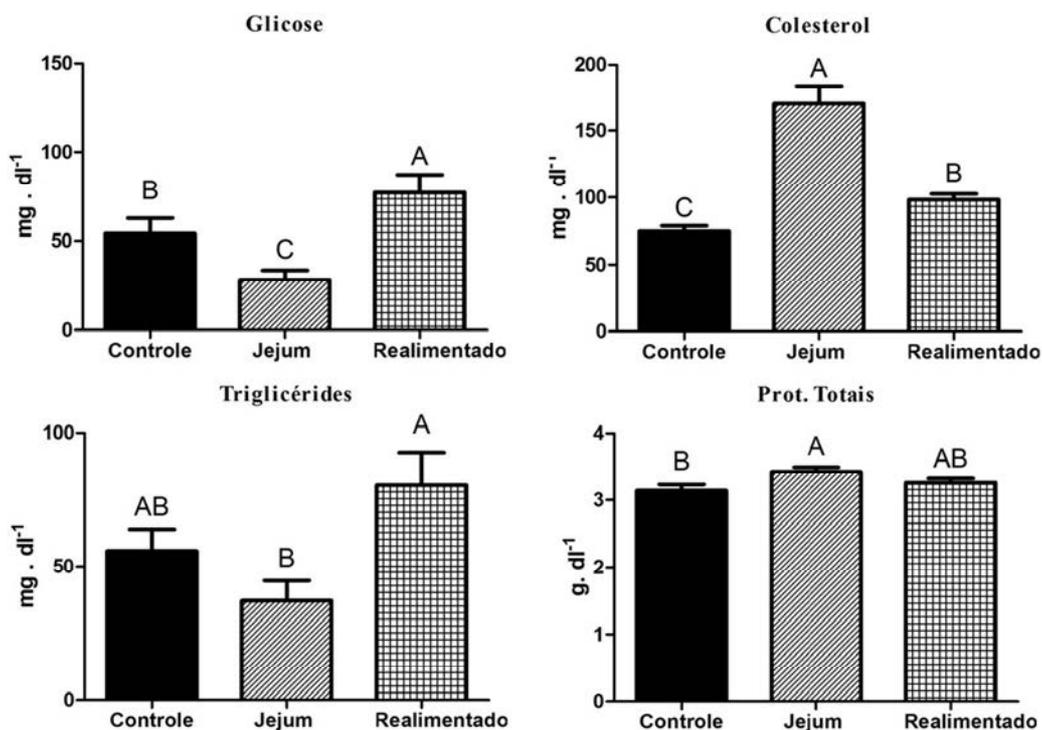
### 3.4. Metabólitos sanguíneos

#### Experimento 1

Os valores das concentrações de metabólitos no sangue referentes ao primeiro ensaio são apresentados na Figura 8. Os valores de glicose plasmática foram significativamente reduzidos durante o período de jejum, e ao final do

período de realimentação, estes níveis foram superiores aos níveis basais ( $p < 0,05$ ). Observou-se uma tendência de redução nos níveis de triglicérides de pacus em jejum, embora não significativa ( $p < 0,05$ ), e ao final de 7 dias de realimentação estes níveis foram superiores em relação aos peixes privados de alimentação ( $p < 0,05$ ).

Verificou-se um aumento nos níveis plasmáticos de colesterol durante o período de privação alimentar, e redução após a realimentação, mas com valores ainda significativamente maiores em relação aos níveis basais ( $p < 0,05$ ). Um aumento nos níveis de proteínas totais sanguíneas também foi observado em peixes em jejum, no entanto estes níveis foram restabelecidos ao final do período de realimentação.



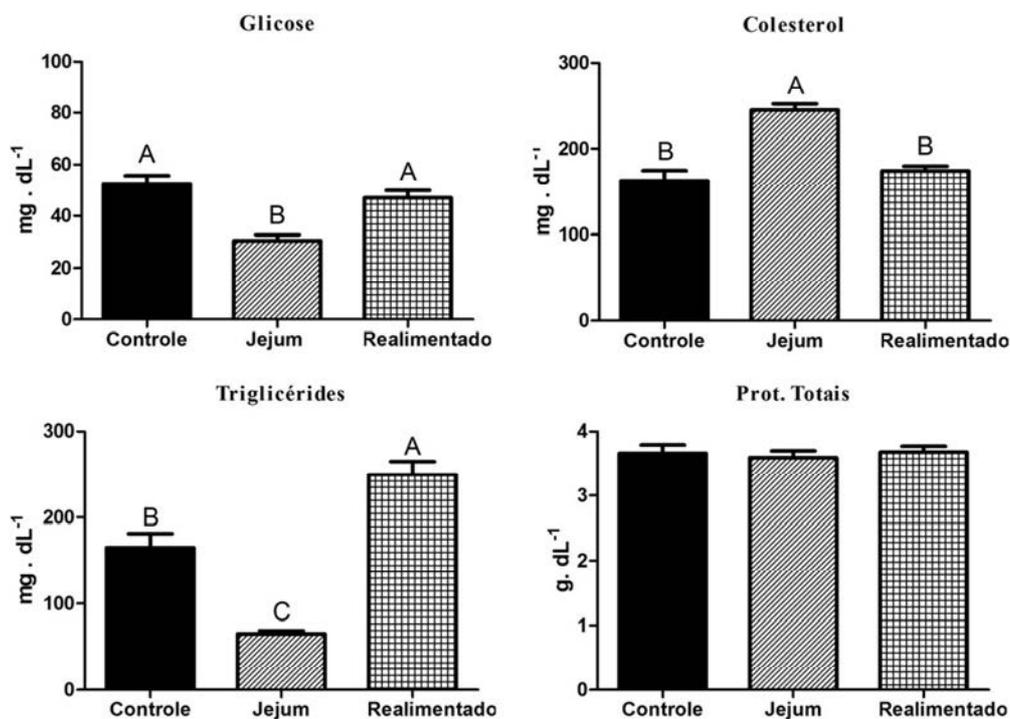
**Figura 8.** Metabólitos sanguíneos de pacus (peso médio inicial: 143,04±49,23g; comprimento médio inicial: 18,47±2,20cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias ± erro padrão da média (n=10).

### Experimento 2

Os valores das concentrações de metabólitos no sangue referentes ao segundo ensaio são apresentados na Figura 9. Os valores de glicose plasmática

foram significativamente reduzidos durante o período de jejum, e ao final do período de realimentação, estes níveis foram restabelecidos ( $p < 0,05$ ). Os níveis de triglicérides sanguíneos também foram significativamente reduzidos durante o jejum, no entanto, após o período de realimentação estes valores foram superiores aos níveis basais ( $p < 0,05$ ).

Verificaram-se elevações nos níveis plasmáticos de colesterol durante o período de privação alimentar ( $p < 0,05$ ), e estes valores foram restabelecidos ao final do período de realimentação. Não foram verificados efeitos do jejum ou realimentação nos níveis de proteínas totais sanguíneas.



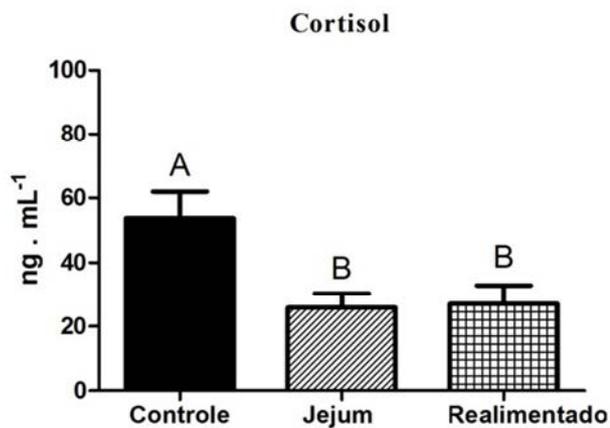
**Figura 9.** Metabólitos sanguíneos de pacus (peso médio inicial:  $346,77 \pm 25,82$ g; comprimento médio inicial:  $25,86 \pm 0,72$ cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### 3.5. Cortisol

#### *Experimento 1*

Os valores de cortisol sérico referentes ao primeiro ensaio são apresentados na Figura 10. Os níveis de cortisol foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo continuamente alimentado (controle), sendo que não foram verificadas

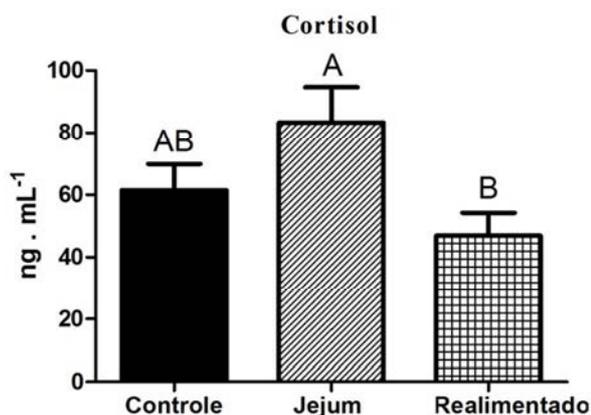
diferenças nos níveis de cortisol entre os grupos de peixes em jejum e realimentados ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Cortisol sérico de pacus (peso médio inicial:  $143,04 \pm 49,23$ g; comprimento médio inicial:  $18,47 \pm 2,20$ cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### Experimento 2

Os valores de cortisol sérico referentes ao segundo ensaio são apresentados na Figura 11. Não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de cortisol nos peixes mantidos em jejum e ao final do período de realimentação, quando comparados ao grupo continuamente alimentado ( $p < 0,05$ ).

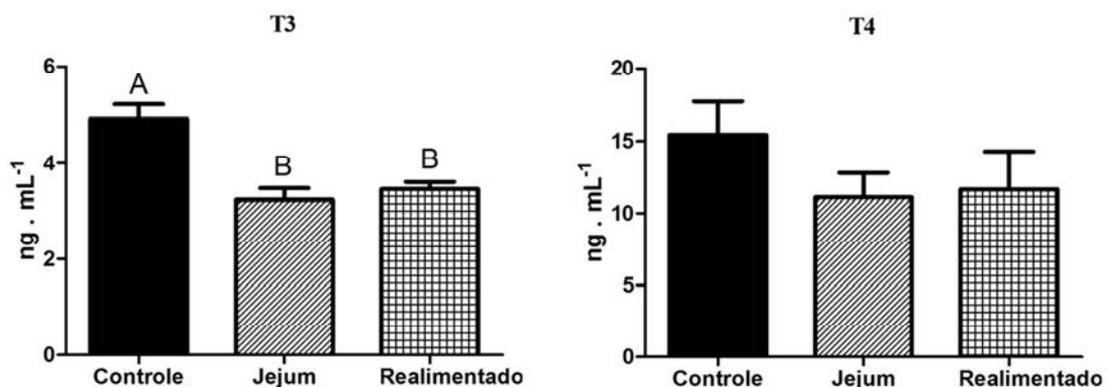


**Figura 11.** Cortisol sérico de pacus (peso médio inicial:  $346,77 \pm 25,82$ g; comprimento médio inicial:  $25,86 \pm 0,72$  cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

### 3.6. Triiodotironina e tiroxina

#### Experimento 2

Os valores de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) séricos referentes ao segundo ensaio são apresentados na figura 12. Verificou-se redução dos níveis de T3 em peixes submetidos ao jejum, e estes níveis não foram restabelecidos ao término do período de realimentação ( $p < 0,05$ ). Não foram verificados efeitos da privação alimentar ou realimentação nos níveis de T4 séricos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12.** Triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) séricos de pacus (peso médio inicial:  $346,77 \pm 25,82$ g; comprimento médio inicial:  $25,86 \pm 0,72$  cm) continuamente alimentados ou em jejum por 21 dias, e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum. Letras diferentes indicam diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os valores correspondem às médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=10$ ).

## 4. Discussão

No presente estudo investigou-se o efeito do tamanho corporal dos peixes nas respostas relacionadas ao crescimento, metabolismo e hormonais durante o período de privação alimentar prolongada e realimentação. De maneira geral, observou-se uma redução de peso corporal e mobilização intensa de nutrientes, principalmente lipídeos, dos diferentes compartimentos corporais do pacu, durante o período de jejum. Ao final do período de realimentação, verificaram-se respostas diferentes em relação às taxas de reposição dos estoques energéticos, dependendo do tamanho dos animais.

Em peixes, assim como em outras espécies de animais, a privação de alimento promove redução do armazenamento de energia, que é redirecionada para a manutenção da homeostase metabólica (Pujante *et al.*, 2015). Isto implica em uma grande variedade de respostas fisiológicas, como a redução nas taxas de

crescimento, e alterações no peso de diferentes órgãos e do tecido adiposo, bem como o aumento da mobilização de metabólitos/nutrientes (Navarro e Gutiérrez, 1995).

A dinâmica do processo de utilização de energia durante os períodos de jejum e realimentação em peixes pode ser monitorada por meio da determinação dos índices biométricos e da quantificação dos nutrientes presentes nos tecidos e de metabólitos sanguíneos. De maneira geral, as determinações destes parâmetros permitem a avaliação do estado nutricional e saúde dos peixes (Gaylord e Gatlin, 2000).

As necessidades energéticas dos peixes para manutenção dos processos vitais durante o período de jejum são atendidas por meio da mobilização das reservas energéticas corporais, que eventualmente ocasionam a perda de peso corporal (Navarro e Gutiérrez, 1995; Vigliano *et al.*, 2002). De fato, o jejum prolongado promoveu redução de peso em pacus, independente do tamanho/idade, e esta redução foi similar e da ordem de 1,8 vezes. Em ambos os ensaios não foi observada mortalidade dos peixes durante o período experimental.

De maneira geral, no presente estudo, verificaram-se as mesmas tendências de mobilização das reservas energéticas durante o período de jejum, independente do tamanho/idade dos peixes, embora as magnitudes destas diferenças tenham sido diferentes.

Observou-se que as reservas de lipídeo no fígado foram prontamente mobilizadas no período de jejum, em ambos os experimentos. Entretanto, em peixes menores a redução no teor de lipídeos foi mais acentuada (2,5 vezes menor), quando comparada a peixes maiores (1,6 vezes menor). Os teores de lipídeos musculares também foram reduzidos no período de privação de alimento, porém esta mobilização se apresentou de maneira constante, aproximadamente duas vezes menor em relação ao grupo alimentado, em ambos os experimentos. Não foi verificado efeito do jejum prolongado sobre os níveis de proteínas no fígado ou músculo de juvenis de pacu. Reduções similares nos teores de lipídeos hepáticos foram previamente relatadas em *sea bream* (*Sparus aurata*), submetidos a jejum de 21 dias (Power *et al.*, 2000) e de lipídeos hepático e muscular em juvenis de pacu mantidos em jejum por 30 dias (Gimbo *et al.*, 2015).

Quanto à mobilização do estoque de gordura mesentérica dos peixes em jejum, verificou-se uma diminuição do IGVS em ambos os experimentos, e este índice não foi afetado pelo tamanho/idade dos animais, uma vez que a redução se apresentou em uma taxa constante (aproximadamente 1,5 vezes menor em relação ao grupo controle). Estes resultados evidenciam o importante papel da mobilização das reservas lipídicas mesentéricas em pacus durante o período de jejum prolongado. Não foram verificados efeitos significativos do jejum sobre o fator de condição de Fulton (K), independente da categoria de peso, indicando, como proposto por Love (1980), que este é um parâmetro insuficiente de avaliação durante o jejum fisiológico.

Em ambos os experimentos, verificou-se diminuição do IHS após 21 dias de jejum, de aproximadamente duas vezes para peixes menores e de 3,2 vezes para peixes maiores, em relação aos peixes continuamente alimentados. Esta redução no peso do órgão está diretamente relacionada à mobilização e utilização das reservas de nutrientes no tecido hepático. Em condições de privação de alimento, o fígado é um dos primeiros órgãos a serem afetados, pois é o local onde ocorre o armazenamento e distribuição das reservas energéticas (Navarro e Gutiérrez, 1995). A redução do volume do fígado, e conseqüentemente do IHS, está diretamente relacionada à diminuição do volume celular dos hepatócitos, com perdas de material armazenado do citoplasma e redução da atividade nuclear (Power *et al.*, 2000), sendo que a intensidade destes eventos é altamente dependente da espécie (Segner, 1985; Segner e Braunbeck, 1988; Strüssmann e Takashima, 1990), da idade e do tamanho dos peixes (Storch e Juario, 1983). A diminuição do IHS provocado pelo jejum já foi previamente relatada em diversas espécies de teleósteos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2007; Barcellos *et al.*, 2010; Costas *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2015).

Quando o suprimento de glicose dietética é insuficiente o glicogênio é quebrado enzimaticamente e transportado para tecidos extra-hepáticos na forma de glicose. A depleção de glicogênio hepático é frequentemente relatada em peixes mantidos em jejum, como previamente observado em trutas arco-íris (Pottinger *et al.*, 2003), *sunshine bass* (Davis e Gaylord, 2011) e jundiás (Barcellos *et al.*, 2010). Entretanto, no presente estudo não foi observada redução significativa dos estoques de glicogênio no fígado de pacus durante o período de

jejum, embora tenha sido verificada uma tendência de depleção de 1,13 vezes para peixes menores e 1,05 vezes para peixes maiores. Gimbo *et al.* (2015) observaram comportamento semelhante para esta espécie, sugerindo que o pacu utiliza preferencialmente os lipídeos como fonte de energia, atuando como um mecanismo poupador de glicogênio hepático durante os períodos de inanição.

O jejum prolongado provocou diminuição (duas vezes) dos níveis glicêmicos sanguíneos de pacus, independente do tamanho corporal. A redução dos níveis de glicose plasmática induzida pela privação alimentar está de acordo com a maioria dos estudos em peixes (Soengas *et al.*, 2006; Furné *et al.*, 2012; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2015; Gimbo *et al.*, 2015). Power *et al.* (2000) sugeriram que o processo de gliconeogênese, responsável pela manutenção dos estoques de glicogênio e dos níveis de glicose circulantes podem estar inoperantes ou ocorrendo em um nível reduzido. Em situação de jejum prolongado, os juvenis de pacu utilizaram prontamente as reservas energéticas disponíveis, principalmente a partir do fígado metabolicamente ativo.

No caso das concentrações de triglicerídeos sanguíneos, observou-se uma diminuição mais intensa em peixes de maior tamanho (2,5 vezes), quando comparados a peixes menores (1,6 vezes). Em condições de jejum prolongado, verifica-se uma intensa hidrólise de triglicerídeos, notadamente no fígado, para a produção de glicerol durante o processo de gliconeogênese, e de ácidos graxos que são oxidados para a produção de energia (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012).

Verificou-se aumento dos níveis circulantes de colesterol durante o jejum, em ambos os ensaios, da ordem de 2,2 vezes maiores em peixes de menor tamanho, e de 1,5 vezes em peixes de maior tamanho. Estes dados corroboram com relatos de Gimbo *et al.* (2015), para esta mesma espécie, e podem ser explicados pelo acúmulo de grandes quantidades de acetil Co-A produzida durante a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Maita *et al.*, 2006) que servem como substrato para a síntese de colesterol, sugerindo que a produção de corpos cetônicos não é uma via preferencial em pacu, como também relatado para outros teleósteos (Segner *et al.*, 1997).

No presente estudo observou-se que o jejum promoveu pequena elevação dos níveis de proteínas totais séricas em peixes de menor tamanho/idade, e nenhuma

alteração destes níveis em peixes maiores, apesar do catabolismo proteico evidente, demonstrado principalmente pela redução dos valores de IHS. Os dados deste estudo são discordantes com os relatados para algumas espécies de peixes, como *Cyprinus carpio* (Shimeno *et al.*, 1997) e *Dentex dentex* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2012), onde a restrição alimentar provocou depressão dos níveis de proteínas totais plasmáticas. Gimbo *et al.* (2015) sugeriram que este fenômeno pode estar associado a um possível mecanismo de proteção de proteínas em pacus.

Quanto ao efeito do jejum sobre os níveis de cortisol séricos, o tamanho dos peixes promoveu um comportamento distinto. Em peixes menores verificou-se diminuição de duas vezes nos níveis circulantes em relação aos pacus continuamente alimentados. Em peixes maiores, apesar da elevação dos níveis circulantes (aproximadamente 1,35 vezes), não foram observadas diferenças significativas quando comparados com os animais do grupo controle (alimentado). Em espécies homeotérmicas, os níveis de cortisol plasmático são frequentemente relatados por uma elevação em resposta ao jejum ou desnutrição (Chang *et al.*, 2002). Entretanto, em peixes esta resposta é variável, e apresenta diferentes fases dependendo da duração do agente estressor (Mommssen *et al.* 1999; Barton 2002). Resultados semelhantes de diminuição dos níveis cortisol circulantes também foram observados em tainhas (*Chelon labrosus*) (Pujante *et al.*, 2015) e em *gilthead sea bream* (*Sparus aurata*) (Martos-Sitcha *et al.*, 2014), submetidos a um período de 14 dias de jejum. Os resultados obtidos sugerem que após 21 dias de jejum os pacus ainda se encontravam em uma fase de resistência ao cortisol, e possivelmente um tempo maior seja necessário para que os peixes entrassem na fase seguinte, caracterizada por elevações destes níveis plasmáticos.

Os efeitos da redução da ingestão de alimento e jejum no metabolismo de hormônios da tireoide já são bem conhecidos e diversos estudos tem demonstrado que a privação alimentar provoca uma regulação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-glândula tireoide em peixes (Farbridge *et al.*, 1992; Leatherland e Farbridge, 1992; Holloway *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 2011), e estas alterações promovem uma redução geral nos níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos. Adicionalmente verifica-se uma redução da sensibilidade do tecido tireoidiano ao hormônio estimulador da tireóide (TSH) e baixa atividade

de desidase hepática (Le-Bail e Boeuf, 1997). No presente estudo somente os níveis de T3 e T4 circulantes foram mensurados e o efeito do jejum sobre os níveis de T3 foram semelhantes aos observados previamente em estudos com *Oncorhynchus mykiss* (Leatherland, 1994), *sea bream* (Power *et al.*, 2000) e também em pacus submetidos a ciclos curtos de restrição alimentar e realimentação (Takahashi *et al.*, 2011). Apesar de não ser estatisticamente significativo, verificou-se tendência semelhante de redução dos níveis circulantes de T4 nos peixes em jejum. Após 7 dias de realimentação não foi verificada recuperação dos níveis circulantes de T3, sugerindo que o sistema endócrino necessita de um tempo maior de adaptação às alterações no estado nutricional em pacus.

Ao final do período de realimentação (7 dias), verificou-se comportamento distinto entre os experimentos para o peso final dos pacus. Em peixes menores, não se observou aumento de peso corporal em relação aos animais em jejum, porém em peixes de maior tamanho este aumento foi da ordem 1,3 vezes. No entanto, não se verificou recuperação total do peso corporal, não sendo atingido o peso dos animais continuamente alimentados. Estes resultados corroboram com os obtidos por Pujante *et al.* (2015), que não observaram compensação total do crescimento em *Chelon labrossus* submetidos a 14 dias de jejum e posteriormente a 7 dias de realimentação. Os resultados sugerem que para o pacu é necessário um maior período de realimentação para recuperação das taxas de crescimento.

Verificou-se uma elevação dos teores de lipídeos hepáticos ao final do período de realimentação (duas vezes), independente do tamanho dos peixes, e estes estoques foram restabelecidos, sendo similares ao grupo controle (alimentado continuamente). Porém não foi verificada a recuperação dos estoques lipídicos musculares, após a realimentação. Neste sentido verifica-se uma importante aplicação zootécnica na cadeia produtiva de pacus. Esta espécie, apesar de possuir uma série de características favoráveis na aquicultura, quando produzida em condições de cativeiro, apresenta alto teor lipídico na carne, atingindo em média 12% de gordura em sua composição, o que a classifica como um pescado gordo (Fujimoto *et al.*, 2007; Tanamati *et al.*, 2009). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a aplicação do jejum em um período que precede o

abate poderia ser uma ferramenta interessante, no sentido de reduzir os teores de gordura no produto final.

Não foi verificada recuperação dos estoques de gordura mesentérica ao final do período de realimentação, independentemente do tamanho/idade dos pacus, e os valores de IGVS foram estatisticamente similares aos peixes mantidos em jejum. De acordo com Collins e Anderson (1995), a recuperação deste depósito energético não é tão rápida quando comparada com o fígado, sugerindo que este órgão é utilizado como fonte inicial de energia endógena, e os depósitos mesentéricos são utilizados posteriormente. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a mobilização dos estoques lipídicos mesentéricos apresenta uma menor plasticidade, tanto em termos de valores críticos de mobilização, quanto em termos de restabelecimento destas reservas após a realimentação.

O retorno de oferecimento de alimento promoveu um aumento de duas vezes nos valores de IHS nos peixes, em ambos os experimentos. No entanto, verificou-se que em pacus de menor tamanho, estes valores foram completamente recuperados, sendo similares ao grupo controle. Nos peixes de maior tamanho, não foi verificada a recuperação completa do IHS, apresentando valores inferiores aos animais continuamente alimentados. De fato, esses resultados são consistentes, visto que as exigências energéticas para manutenção (diferença entre a energia absorvida e a depositada nos tecidos) aumentam de acordo com o maior tamanho ou idade dos peixes.

Os níveis circulantes de glicose e triglicérides apresentaram elevação ao final do período de 7 dias de realimentação e, em alguns casos, estes valores foram superiores aos níveis observados nos animais continuamente alimentados. As concentrações de colesterol plasmático foram reduzidas (aproximadamente 1,5 vezes) em ambos os experimentos. Não foi verificado efeito da realimentação sobre os níveis circulantes de proteínas totais, independente do tamanho/idade avaliado, e estes dados são semelhantes aos relatados por Souza (1998), em juvenis de pacu realimentados por 30 dias, após 60 dias de jejum.

Para os níveis séricos de cortisol, as respostas observadas após a realimentação foram diferentes dependendo do tamanho corporal. Em peixes menores não foi observada diferenças ao final da realimentação, porém em peixes maiores verificou-se uma queda dos níveis séricos de cortisol (1,7 vezes),

em relação aos peixes mantidos em jejum, e estes níveis não diferiram do grupo continuamente alimentado. Neste mesmo sentido, Pottinger *et al.* (2003) também não verificaram diferenças entre os níveis de cortisol plasmáticos de trutas arco-íris em jejum ou realimentadas, e estes autores sugeriram que a mobilização de energia durante o jejum possa ocorrer sem o envolvimento do cortisol.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que durante o período de jejum, a mobilização de lipídeos de diferentes compartimentos corporais apresentou-se como a principal fonte energética para os pacus, independente do tamanho corporal. Entretanto, em períodos de realimentação de curta duração, não foi verificada recuperação total do peso corporal, e as taxas de reposição dos estoques energéticos foram mais eficientes em peixes de menor tamanho. Estas informações são de fundamental importância do ponto de vista zootécnico, sugerindo que a privação de alimento pode ser uma ferramenta interessante para redução dos teores de gordura na carne de pacu. Além disso, de acordo com os resultados observados, a utilização de protocolos alimentares que utilizam o jejum para obtenção de ganho compensatório parece ser mais efetiva nas fases iniciais de engorda do pacu.

## 5. Referências

- Baldan, A. P. 2008. **Avaliação da tolerância do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a carboidratos**. 119p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 2008.
- Bar, N.; Volkoff, H. (2012). Adaptation of the physiological, endocrine, and digestive system functions to prolonged food deprivation in fish. In: **Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation** (ed. M. D. McCue), pp. 69-89. Berlin: Springer.
- Barcellos, L.J.G., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R.M., Ferreira, D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 2010; 300:231-6.
- Barton, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology** 2002, 42:517–525.
- Blanton, M. L.; Specker, J. L. The Hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. **Critical Reviews in Toxicology**, 2007, 37:97–115.
- Blasco, J., Fernández, J., Gutiérrez, J. The effects of starvation and refeeding on plasma amino acid levels in carp, *Cyprinus carpio* L. (1758). **Journal of Fish Biology**, 1991, 38:587-598.
- Blasco, J., Fernández, J., Gutiérrez, J. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. **Journal of Comparative Physiology B**, 1992; 162:539-546.

- Bligh, E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 1959; 37:911-917.
- Boyd, C. E. **Water quality in warmwater fish culture**. Auburn: Auburn University, 1981; 359 p.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976; 72:248-254.
- Caruso, G.; Denaro, M.G.; Caruso, R.; Genovese L.; Mancari, F.; Maricchiolo, G. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. **Marine Environmental Research**, 2012, 81:18-25.
- Chang, L. L., Kau, M. M., Wun, W. S., Ho, L. T., Wang, P.S., 2002. Effects of fasting on corticosterone production by zona fasciculata-reticularis cells in ovariectomized rats. **Journal of Investigative Medicine** 2002, 50(2):86–94.
- Collins, A. L., Anderson, T. A. The regulation of endogeneous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. **Journal of Fish Biology** 1995, 47:1004-1015.
- Costas, B., Aragão, C., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arjona, F., Dinis, M.T., Mancera, J.M., Conceição, L. Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. **Fish Physiology and Biochemistry** 2011, 37:495–504.
- Davis, K.B., Gaylord, T.G. Effect of fasting on body composition and responses to stress in sunshine bass. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 2011, 158A:30–36.
- Farbridge, K.J., Leatherland, J.F. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, 1992, 10, 67–73.
- Fujimoto, R.Y.; Castro, M.P.; Honorato, C.A.; Moraes, F.R. Composição corporal e eficiência de utilização de nutrientes por pacus alimentados com ração suplementada com cromo trivalente. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 2007, 42(12):1763-1768.
- Furné, M., Morales, A.E., Trenzado, C.E., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Sanz, A. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. **Journal of Comparative Physiology** 2012, 182B:63–76.
- Gaylord, T. G.; Gatlin, D. M. III. Assessment of compensatory growth in channel catfish *Ictalurus punctatus* R. and associated changes in body condition indices. **Journal of the World Aquaculture Society** 2000, 31:326–336.
- Gimbo, R.Y.; Fávero, G.C.; Franco Montoya, N.; Urbinati, E.C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish and Shellfish Immunology** 2015, doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.005.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., Dutil, J.D. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology** 2003, 136:347–356.

Holloway, A., Reddy, P. K., Sheridan, M. A. & Leatherland, J. F. Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormones, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. **Biological Rhythms Research** 1994, 25:415–432.

Jørgensen, E.H., Bye, B.E., Jobling, M., Influence of nutritional status on biomarker responses to PCB in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Aquatic Toxicology** 1999, 44:233–244.

Kelley, K.M., Haigwood, J.T., Perez, M., Galima, M.M. Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as markers for anabolic/catabolic condition in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology** 2001, 129:229–236.

Koakoski, G., Oliveira, T. A.; da Rosa, J. G. S.; Fagundes, M.; Kreutz, L. C.; Barcellos, L. J. G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. **Physiology and Behavior**, 2012, 106:129-132.

Koroleff, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFFK (ed). Methods of seawater Analysis. **Verlag Chemie Weinheim**, 117-181. 1976.

Leatherland, J. F. Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind. **Guelph Ichthyology Reviews** 1994, 2:1–67.

Leatherland, J. F., Farbridge, K. J. Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH and alters the growth hormone related changes in hepatic 5-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology** 1992, 87:342–353.

Le Bail, P.Y., Boeuf, G. What hormones may regulate food intake in fish? **Aquatic Living Resources** 1997, 10:371-379.

Liew, H., Sinha, A., Mauro, N., Diricx, M., Blust, R., De Boeck, G. Fasting goldfish, *Carassius auratus*, and common carp, *Cyprinus carpio*, use different metabolic strategies when swimming. **Comp. Biochem. Physiol. A** 2012, 163:327–335.

Love, R.M. **The chemical biology of fishes**. Vol. 2. London: Academic Press, 1980. 133-229.

Mackenzie, D.S., Vanputte, C.M., Leiner, K.A. Nutrient regulation of endocrine function in fish. **Aquaculture**, 1998, 161:3–25.

Mackereth, F.J.H., Heron, J., Talling, J.F. **Water Analyses**. London: Freshwater Biological Association. 1978, 120p.

Maita, M.; Maekawa, J.; Satoh, K.; Futami, K.; Satoh, S. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. **Fisheries Science**, 2006, 72:513-519.

Martos-Sitcha, J.A., Wunderink, Y.S., Straatjes, J., Skrzynska, A.K., Mancera, J.M., Martínez-Rodríguez, G. Different stressors induce differential responses of the CRH stress system in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** 2014, 177:49–61.

Menezes, C., Ruiz-Jarabo, I., Martos-Sitcha, J., Toni, C., Salbego, J., et al. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): a metabolic and endocrine approach. **Aquaculture** 2015, 435:257–264.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 1999, 9:211–268.

Moon T. W., Foster, G.D., Plisetskaya, E. M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. **Canadian Journal of Zoology**, 1989; 67:2189-2193.

MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasília, 2011, 60p. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)> Acesso em: 9 março 2015.

Navarro, I.; Gutiérrez, J., 1995: Fasting and starvation. In: P. W. Hochachka, T. P. Mommsen (eds), **Metabolic Biochemistry**, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 393–434.

Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. **Aquaculture** 2007, 265:325–335.

Pérez-Jiménez, A.; Cardenete, G.; Hidalgo, M.C.; Gracia-Alcázar, A.; Abellán, E.; Morales, A.E. Metabolic adjustments of *Dentex dentex* to prolonged starvation and refeeding. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2012, 38:1145-1157.

Peterson, B.C., Small, B.C. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology** 2004, 26:231-240.

Pottinger, T.G.; Rand-Weaver, M.; Sumpter, J. P. Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. **Comparative Biochemistry and Physiology B** 2003, 136:403–417.

Power, D.M.; Melo, J.; Santos, C. R. A. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. **Journal of Fish Biology**, 2000, 56:374-387.

Pujante, I. M.; Martos-Sitcha, J.A; Moyano, F.J., Ruiz-Jarabo, I.; Martínez-Rodríguez, Mancera, J. M. Starving/re-feeding processes induce metabolic modifications in thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** 2015, 180:57–67.

Reddy, P.K., Vijayan, M.M., Leatherland, J.F., Moon, T.W. Does RU486 modify hormonal responses to handling stressor and cortisol treatment in fed and fasted rainbow trout? **Journal of Fish Biology**. 1995, 46:341–359.

Rios, F.S., Carvalho, C., Pinheiro, G., Donatti, L., Fernandes, M., Rantin, F. Utilization of endogenous reserves and effects of starvation on the health of *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). **Environmental Biology of Fishes** 2011, 91:87L 94.

Rossi, A., Cazenave, J., Bacchetta, C., Campana, M., Parma, M.J. Physiological and metabolic adjustments of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) during starvation. **Ecological Indicators** 2015, 56:161-170.

Segner, H. Influence of starvation and refeeding with different diets on the hepatocyte ultrastructure of juvenile *Siganus guttatus* Bloch (Teleostei: Siganidae). **Zoology Anz** 1985, 214:81–90.

Segner, H., Braunbeck, T. Hepatocellular adaption to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. **Fish Physiology and Biochemistry** 1988, 5:79–97.

- Segner, H., Dölle, A., Böhm, R. Ketone body metabolism in the carp *Cyprinus carpio*: Biochemical and <sup>1</sup>H NMR spectroscopical analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology** 1997, 116B: 257–262.
- Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T., Kheyyali, D. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**. 1997, 151:371-377.
- Small, B.C. Effect of fasting on nycthemeral concentrations of plasma growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I), and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology** 2005, 142:217-23.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. **American Journal of Physiology** 2006, 291:R810–R821.
- Souza, V. L. 1998. **Efeitos da restrição alimentar e da realimentação no crescimento e metabolismo energético de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)**. 114p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 1998.
- Souza, V. L.; Oliveira, E. G.; Urbinati, E. C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Journal of Aquaculture in the Tropics** 2000, 15, 371–379.
- Strussmann, C. A.; Takashima, F. Hepatocyte nuclear size and nutritional conditions of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). **Journal of Fish Biology** 1990, 36:59–65.
- Sumpter, J.P., Le Bail, P.Y., Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J.F. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology** 1991, 83:94–102.
- Takahashi, L.S., Biller, J.D., Criscuolo-Urbinati, E., Urbinati, E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. 2011, 95:259-66.
- Tanamati, A.; Stevanato, F. B.; Visentainer, J. E.L.; Matsushita, M.; Souza, N. E.; Visentainer, J. V. Fatty acid composition in wild and cultivated pacu and pintado fish. **European Journal of Lipid Science and Technology** 2009, 111:183-187.
- Vigliano, F., Quiroga, M., Nieto, J. Metabolic adaptation to food deprivation and refeeding in fish. **Revista de Ictiología** 2002, 10:79–108.
- Vijayan, M.M., Maule, A.G., Schreck, C.B., Moon, T.W. Hormonal control of hepatic glycogen metabolism in food-deprived, continuously swimming coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 1993, 50:1676–1682.
- Viscarra, J.A., Ortiz, R.M. Cellular mechanisms regulating fuel metabolism in mammals: Role of adipose tissue and lipids during prolonged food deprivation. **Metabolism Clinical and Experimental**. 2013, 62:889-897.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. **The biology of fish growth**. London: Academic Press. 1987. 443p.

### **CAPÍTULO 3 – ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL EM JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO**

**Resumo-** O jejum é uma ocorrência comum em peixes, e este processo não afeta somente o estado nutricional e a saúde dos animais, mas também a microbiota intestinal do hospedeiro. Atualmente, diversos estudos de caracterização da microbiota intestinal por meio de sequenciamento *next-generation* têm sido realizados, entretanto este método não é o mais indicado para a quantificação de microrganismos. Diante disso, a proposta do presente estudo foi de avaliar os efeitos da privação alimentar e realimentação no perfil de grupos bacterianos específicos (*Lactobacillus*, *Actinobacteria*, *Enterococcus* e Família *Enterobacteriaceae*) presentes na mucosa e conteúdo intestinal de pacus. As contagens do número de cópias do grupo *Lactobacillus* e *Actinobacteria* e da família *Enterobacteriaceae* presentes na mucosa intestinal foram reduzidas no grupo em jejum, e ao final do período de realimentação, observou-se um maior número de cópias para o grupo *Lactobacillus* em relação ao grupo continuamente alimentado. As contagens do número de cópias de 16S do grupo *Lactobacillus* no conteúdo intestinal foram maiores no grupo realimentado, quando comparados ao grupo controle. Não foram verificados efeitos da realimentação no número de cópias do gene 16S DNAr para o grupo *Actinobacteria* e família *Enterobacteriaceae* no conteúdo intestinal de pacus. O presente trabalho fornece as primeiras informações a respeito das alterações da microbiota intestinal em pacus, em condições de jejum e após a realimentação. A utilização da técnica de qPCR para detecção e quantificação de grupos bacterianos específicos demonstrou ser uma ferramenta importante em estudos de microbiota.

**Palavras-chave:** jejum, 16S, DNAr, *Lactobacillus*, *Actinobacteria*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*

### **CHAPTER 3 - CHANGES IN THE GUT MICROBIOTA OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*) IN RESPONSE TO FOOD DEPRIVATION AND REFEEDING**

**Abstract-** Fasting is a common occurrence in fish, and this process affects not only the nutritional status and animal health, but also the intestinal microbiota of the host. Currently, many studies for the characterization of intestinal microbiota by next-generation sequencing have been applied, but this method is not the most suitable for the microorganism's quantification. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effects of food deprivation and refeeding on specific bacterial groups (*Lactobacillus*, *Actinobacteria*, *Enterococcus* and *Enterobacteriaceae*) in the mucosa and intestinal content pacu. Counts of the number of copies of the *Lactobacillus*, *Actinobacteria* and *Enterobacteriaceae* in the intestinal mucosa were reduced in the fasting group. At the end of refeeding, there were a higher number of copies to the *Lactobacillus* compared to fish fed continuously. The number of copies 16S *Lactobacillus* in the intestinal content was higher in the refeeding animals when compared to the control group. No effect of the refeeding in the number of copies of the 16S rDNA gene was observed for *Actinobacteria* and *Enterobacteriaceae* in the intestinal content of pacus. The present work provides the first information of changes in the intestinal microbiota in pacu. qPCR is an important tool for detection and quantification of specific groups of bacteria in the microbiota.

**Key-words:** starvation, 16S, DNAr, *Lactobacillus*, *Actinobacteria*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*

## INTRODUÇÃO

Espécies de peixes nativas como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) podem estar muitas vezes expostas a condições de estresse nutricional devido a alterações nos fatores ambientais (como temperatura da água e concentração de oxigênio) ou em atividades relacionadas ao processo de produção, como a utilização de ciclos alternados de privação alimentar e realimentação para promover o ganho compensatório. O jejum afeta não somente o estado nutricional e saúde dos peixes, mas também o perfil de microrganismos intestinais (Xia *et al.*, 2014). As alterações fisiológicas que ocorrem durante o período de privação alimentar resultam em uma rápida resposta de adaptação do hospedeiro e de seus microrganismos intestinais frente a esta situação (Okada *et al.*, 2013).

A composição e interações da microbiota intestinal podem afetar diretamente a quantidade e o aproveitamento de energia proveniente da dieta (Tremaroli e Backhed, 2012), desempenhando papel importante no metabolismo dos substratos dietéticos (Kelly, 2010). O equilíbrio da microbiota intestinal pode sofrer alterações devido a uma série de fatores, como o estresse (O'Mahony *et al.*, 2009), antibióticos (Tanaka *et al.*, 2009), idade (Hopkins *et al.*, 2002), infecções bacterianas (Dethlefsen *et al.*, 2006) e o estado nutricional (Turnbaugh *et al.*, 2009). A dieta possui papel determinante na formação da microbiota intestinal, promovendo alterações no tamanho das populações de espécies simbiotes, resultando em alterações biológicas no hospedeiro (Brown *et al.*, 2012). Estas modificações no perfil de microrganismos no trato gastrointestinal (TGI) podem ocasionar alterações na resposta imune do hospedeiro, favorecendo a ocorrência de doenças (Morgan *et al.*, 2012).

Dois grupos distintos de microrganismos são normalmente encontrados no TGI dos peixes, os autóctones (aderentes) e os alóctones (transitórios). O primeiro grupo de bactérias, em virtude da sua capacidade de tolerar o baixo pH em sucos gástricos e resistência à ação dos ácidos biliares, conseguem colonizar a superfície epitelial do estômago, do intestino delgado e grosso, podendo se fixar firmemente à mucosa intestinal para formar a microbiota autóctone do hospedeiro (Savage, 1989). O segundo grupo de bactérias está presente transitoriamente no trato gastrointestinal, e hipotetiza-se que é incapaz de colonizar a camada de

muco ou a superfície epitelial, ou são tão inefetivas que não conseguem competir com outras bactérias presentes no muco/epitélio (Ringø & Birkbeck, 1999).

Tradicionalmente, a análise de microbiota intestinal é realizada através de cultura de microrganismos *in vitro* em meios específicos. Estes métodos, apesar de terem contribuído para uma visão considerável da microbiota intestinal, apresentam diversas limitações. A principal delas deve-se ao fato de que a maioria das bactérias intestinais não pode ser cultivada em condições laboratoriais, porque as exigências ambientais para o seu cultivo em condições *in vitro* ainda são desconhecidas. Diante destas limitações, novas técnicas moleculares utilizando a análise filogenética dos ácidos nucléicos têm sido utilizadas com a finalidade de caracterização das comunidades microbianas, do estabelecimento das funções dentro do ecossistema e suas relações com o hospedeiro (Oviedo-Rondón, 2009).

Para a maioria destas técnicas moleculares empregadas, a região mais amplamente utilizada é a 16S da subunidade ribossomal do DNA (16S DNAr), devido ao fato de ser uma das macromoléculas mais conservadas em todos os sistemas vivos, e por não apresentar transferência lateral entre espécies, além de conter tamanho suficiente (cerca de 1500 pares de bases) para a realização de análises filogenéticas (Amann *et al.*, 1995).

As aplicações destas técnicas não se limitam somente ao sequenciamento da comunidade bacteriana total, que consiste em um processo demorado, complexo e de custo elevado. São passíveis de utilização em processos mais simples, como identificação e quantificação de alterações na comunidade por meio da utilização de *primers* específicos para as cepas de interesse (Amit-Romach *et al.*, 2004). Dentre as diversas técnicas utilizadas, a quantificação absoluta por meio da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) parece ser uma ferramenta interessante, pois torna possível a avaliação do número de cópias do transcrito de interesse baseado numa curva padrão construída a partir de uma amostra com número de cópias conhecido. Este método pode ser utilizado em casos onde o interesse seja o valor real de número de cópias, seja de um patógeno viral ou bacteriano, ou para avaliação de gêneros microbianos existentes em determinada comunidade (Huijsdens *et al.*, 2002; Stubner *et al.*, 2002; Dumonceaux *et al.*, 2006; Lunedo *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos relacionados ao microbioma intestinal tem se concentrado em espécies terrestres e seres humanos, e informações a respeito das alterações da microbiota em situações de privação alimentar em organismos aquáticos é relativamente escassa, e restrita a um pequeno número de espécies (Ringø *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2014; Kohl *et al.*, 2014). Diante do apresentado, a proposta deste trabalho foi de avaliar os efeitos da privação alimentar e realimentação no perfil de grupos bacterianos específicos presentes na mucosa e conteúdo intestinal de pacus.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Peixes e condições experimentais*

Foram utilizados 45 juvenis de pacu, com peso médio inicial de  $346,77 \pm 25,82$  g, e comprimento  $25,86 \pm 0,72$  cm. O local, manejo, dieta, condições ambientais e desenho experimental são os mesmos descritos no Capítulo 2, nos itens “2.1. Peixes e condições experimentais – *Experimento 2*” e “2.2. Delineamento experimental e amostragem”.

### *Coleta de amostras*

Para a análise da microbiota associada à mucosa e conteúdo foram utilizadas amostras de cinco repetições por tratamento, sendo que cada amostra foi formada pelo material coletado de três peixes (“pool”), totalizando 15 peixes por tratamento. O número de animais foi determinado seguindo recomendações de Zhou *et al.* (2007), que estudou diferentes tamanhos de amostragem em análises de microbiota para frangos de corte, para se obter boa representatividade da população microbiana em estudo, diminuindo o efeito específico de indivíduo.

Os peixes foram abatidos (benzocaína  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ) e o trato gastrintestinal foi exposto. O intestino foi delimitado arbitrariamente em três porções (anterior, média e posterior), isolado e acondicionado em uma placa de petri contendo PBS esterilizado ( $8 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $2,7 \text{ mM KCl}$ ,  $1,5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4). As placas com os segmentos foram mantidas em ambiente resfriado e com

fluxo contínuo de CO<sub>2</sub> até o início da manipulação da amostra para a formação do pélete bacteriano. Este cuidado foi tomado com a finalidade de diminuir a proliferação das colônias presentes nos tecidos coletados e também evitar a proliferação de bactérias aeróbias não colonizadoras do trato durante o período entre a coleta das amostras e sua manipulação laboratorial.

## **Análise da microbiota intestinal**

### *Preparo do pélete bacteriano*

O processamento das amostras de microbiota associada ao conteúdo e mucosa intestinal foi realizada de acordo com metodologia proposta por Kurokawa *et al.* (2007), com pequenas modificações. O conteúdo presente nas porções do intestino dos peixes que compuseram cada amostra foi retirado por meio de pressão externa, colocado em um recipiente, homogeneizado e 8 g deste colocadas em um tubo Falcon contendo 30 mL de tampão PBS. As amostras foram totalmente dissolvidas em tampão por agitação vigorosa. Após, foram filtradas em membrana de 100µm de porosidade, e o filtrado centrifugado a 27000 g por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de TE 10:1 (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA; pH 8,0), novamente centrifugados e os sedimentos armazenados a -80°C. Para a coleta das amostras de microbiota associada à mucosa intestinal foi utilizada metodologia descrita por Gong *et al.* (2002). Neste procedimento, as mesmas porções das quais foi retirado o conteúdo foram abertas longitudinalmente, presas em uma base de isopor limpa, lavadas com solução PBS e colocadas em um mesmo tubo com 30 mL de solução PBS (1% Tween80). Após agitação vigorosa por um minuto, os segmentos de cada *pool* foram retirados do tubo e a solução centrifugada a 27000 g por 20 minutos, formando um pélete bacteriano. Os péletes foram ressuspensos em TE 10:1 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH8,0), centrifugados a 20000 g por 20 minutos, o sobrenadante descartado e os péletes bacterianos congelados a -80°C até a extração de DNA. De acordo com os autores, esta metodologia de coleta é capaz de recuperar mais de 95% das células bacterianas presentes no material coletado.

### *Extração de DNA das amostras de microbiota intestinal*

A extração do DNA total das amostras coletadas foi realizada com o AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit® (Axygen), seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota de 25 mg do pélete bacteriano de mucosa e 100 mg de conteúdo intestinal foi pesada e dissolvida em 150 µL do *buffer* S (contendo RNase A) por vigorosa homogeneização em vortex. Foram adicionados 20 µL da enzima lisozima (50 mg mL<sup>-1</sup>), 25 µL da enzima proteinase K (20 mg mL<sup>-1</sup>) e 60 µL de EDTA (0,25M; pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram resfriadas em gelo, e adicionou-se 450 µL de *buffer* G-A (responsável pela finalização da lise das células bacterianas e exposição do DNA). A mistura foi agitada em vortex por 15 segundos e novamente incubada a 65°C por 10 minutos. Após a lise, adicionou-se 400µL do *buffer* G-B, o qual se complexa com as proteínas presentes nas amostras, e 1 mL do *buffer* DV, que separa o DNA das proteínas complexadas. Após centrifugação, a fase superior, contendo o tampão e as proteínas foi descartado e mais 1 mL do *buffer* DV adicionado, repetindo a centrifugação. A fase superior com o tampão foi novamente descartada, e a fase inferior, contendo o DNA extraído, recuperada e transferida para um “spin-filter”, passando por posterior centrifugação. Ao filtrado, foram adicionados 400µL do “buffer” de ligação BV, a solução homogeneizada e transferida para uma coluna, seguido de posterior centrifugação. Descartou-se o filtrado e foram realizadas: uma lavagem com o “buffer” W1 e duas lavagens com o “buffer” W2. Após as lavagens, a coluna foi transferida para um novo tubo e o DNA eluído da coluna pela adição de 50µL água ultrapura aquecida a 65°C. A qualidade do DNA extraído foi verificada, uma amostra de trabalho diluída a 10ng µL<sup>-1</sup> para os procedimentos iniciais, e as amostras concentradas congeladas a -20°C. A concentração das amostras de DNA foi determinada mediante leitura da absorbância em espectrofotômetro (NanoDrop®, Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 260nm e por fluorometria (Qubit 1.0 fluorometer® , Life Technologies). Foram avaliadas também as relações dos comprimentos de onda 260/280 e 260/230 pelo espectrofotômetro, a primeira estima a contaminação por proteínas, a segunda por sais (Sambrook *et al.*, 1989).

A partir da quantificação por fluorometria, as amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de 2,50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  em água ultrapura, e estas soluções de trabalho armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a utilização no ensaio de qPCR.

#### *Oligonucleotídeos iniciadores utilizados e cobertura de estirpes*

Para a realização do ensaio de PCR quantitativo, foram escolhidos quatro conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos na literatura (Tabela 1). Foram escolhidos iniciadores que contemplam os principais grupos bacterianos presentes no intestino de peixes, para possibilitar a análise das variações globais na microbiota deste ambiente.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR.

| Microorganismo<br>Alvo               | T.<br>am.<br>(pb) <sup>1</sup> | T.<br>an.<br>(°C) <sup>2</sup> | T.<br>m.<br>(°C) <sup>3</sup> | Sequência (5'3')  | Referência   |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---|--|
| Classe <i>Actinobacteria</i>         | 275                            | 55                             | 84,5                          | F <sup>4</sup> : AAAGTCAAAGGAATTGACGG<br>R <sup>5</sup> : CTCCTCCGAGTTGACCC | Schäfer <i>et al.</i> , (2010)                               |
| Família<br><i>Enterobacteriaceae</i> | 195                            | 63                             | 82,9                          | F: ATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC<br>R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC                     | Bartosch <i>et al.</i> (2004)                                |
| Gênero <i>Enterococcus</i>           | 144                            | 61                             | 80,4                          | F: CCCTTATTGTTAGTTGCCATATT<br>R: ACTCGTTGTACTTCCCATTGT                      | Rinttilä <i>et al.</i> (2004)<br>Heilig <i>et al.</i> (2002) |
| Gênero <i>Lactobacillus</i>          | 341                            | 58                             | 82,6                          | F: CACCGCTACACATGGAG<br>R: AGCAGTAGGGAATCTTCCA                              | Walter <i>et al.</i> (2001)                                  |

<sup>1</sup>T. am.: Tamanho do “amplicon” em pares de bases.

<sup>2</sup>T. an.: Temperatura de anelamento dos oligos para qPCR.

<sup>3</sup>T. m.: Temperatura média de melting dos “amplicons” obtidos a partir das curvas de dissociação.

<sup>4</sup>F: *forward primer*

<sup>5</sup>R: *reverse primer*

Para a classe *Actinobacteria*, Schäfer *et al.*, (2010) verificaram a especificidade do conjunto de iniciadores com as cepas *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Arthrobacter*, *Jiangella*, *Nocardiopsis*, *Nocardioides*, *Actinopolymorpha*,

*Nesterenkonia*, *Brevibacterium*, *Yania*, *Microbacterium*, *Yonghaparkia*, *Blastococcus*, *Rubrobacter*, *Brachybacterium*, *Lentzea*, *Microlunatus*, *Saccharomonospora*, *Actinomycetospora*, *Stackebrandtia*, *Aeromicrobium*, *Klugeriella*, *Rathayibacter*, *Ruania*, *Agrococcus*, *Conexibacter*, *Glaciibacter*, *Leifsonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Actinoalloteichus*, *Agromyces*, *Clavibacter*, *Georgenia*, *Goodfellowiella*, *Kocuria*, *Kribella*, *Microcella*, *Micromonospora*, *Mycetocola*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Solirubrobacter* e *Umezawaea*.

Bartosch *et al.* (2004) confirmaram a especificidade do conjunto de iniciadores para a família *Enterobacteriaceae* com cepas de *Escherichia*, *Shigella* e *Salmonella*. Além destes gêneros, este grupo também inclui gêneros como *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus* e *Serratia*.

Heilig *et al.* (2002), Rintillä *et al.* (2004) e Walter *et al.* (2001), verificaram a especificidade do conjunto de iniciadores para o gênero *Lactobacillus*, e confirmaram a amplificação das seguintes cepas: *L. acetotolerans*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. alimentarius*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. aviarius*, *L. bifementans*, *L. brevis*, *L. buchnei*, *L. casei*, *L. collinoides*, *L. coryniformis*, *L. crispatus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fermentus*, *L. fructivorans*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. kefiri*, *L. mali*, *L. manihotivorans*, *L. mucosae*, *L. murinus*, *L. oris*, *L. panis*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. ruminis*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. sharpeae*, *L. vaginalis*, *L. zaeae*. Além destas, este par de primers também anelou com os gêneros *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. e *Weissella* spp.

Para o gênero *Enterococcus*, Rintillä *et al.* (2004) verificaram a especificidade do conjunto de iniciadores com as cepas: *E. asini*, *E. avium*, *E. azikeevi*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermanniensis*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. rottae*, *E. saccharolyticus*, *E. villorum*.

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados também foi avaliada *in silico*, utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Além disso, após a amplificação

via reação em cadeia de polimerase (PCR) com amostras de DNA do presente estudo e clonagem em vetor plasmídeo, a especificidade foi confirmada pelo sequenciamento dos insertos obtidos.

#### *Amplificação das amostras de DNA genômico*

As amostras de DNA genômico foram amplificadas via PCR com cada par de iniciadores em estudo (Tabela 1). Para cada reação de PCR, utilizaram-se 50 ng de DNA genômico, tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 66 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5U de taq DNA polimerase e água ultra-pura para um volume final de 25 µL. A reação de PCR foi realizada utilizando a seguinte sequência de termo-ciclos: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento específica para cada primer (*Actinobacteria* e *Lactobacillus spp.* 52°C; *Enterobacteriaceae* e *Enterococcus spp.* 62°C) por 40 segundos, 72°C por 1:30 minutos e 72°C por 7 minutos. Os *amplicons* gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 2%, diluído em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM; pH 8,0), conforme as recomendações de Sambrook e Russell (2001). Previamente à clonagem os produtos de PCR foram purificados através do Kit “QIAquick® Gel Extraction Kit” (QIAGEN), conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

#### *Clonagem em vetor plasmídeo TOPO TA®*

Após a obtenção dos “amplicons”, os fragmentos amplificados por PCR foram clonados utilizando o kit comercial TOPO TA® (Invitrogen), específico para clonagem de produtos de PCR, seguindo as instruções do fabricante. Após a inserção, 3 µL da reação de ligação foram adicionados a células quimicamente competentes de *Escherichia coli* DH10B, a solução incubada no gelo por 30 minutos, e um choque térmico provocado colocando os tubos em banho-Maria a 42°C por 45 segundos, inserindo assim o plasmídeo na célula competente. Para recuperação e multiplicação das células transformadas, foi adicionado 1 mL de meio SOC (triptona, extrato de levedura, 9,2mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 37mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75% de glicose), e os tubos incubados a 37°C, com agitação constante de 220rpm durante 90 minutos.

Placas de Petri foram preparadas com meio de cultura 2xTY (1,2% de ágar), acrescido de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  do antibiótico canamicina. Após solidificação do meio,  $40 \mu\text{L}$  de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e  $25 \mu\text{L}$  de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) foram espalhados sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, com o objetivo de identificar as colônias de bactérias que continham o inserto ligado ao vetor plasmídeo. Após secagem da solução IPTG – X-GAL,  $200 \mu\text{L}$  das células transformadas cultivadas em meio SOC foram aplicados nas placas de Petri com o auxílio de uma alça de Drigalski, e as placas incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 horas.

#### *Cultivo de clones bacterianos e extração de DNA plasmidial*

Uma colônia positiva (contendo o inserto) e isolada de cada placa foi coletada com o auxílio de palitos de madeira esterilizados e transferida para um tubo contendo meio de cultura 2xTY, acrescido de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  do antibiótico canamicina. O meio foi incubado sob agitação constante (220rpm), a  $37^\circ\text{C}$ , durante 16 horas.

O DNA plasmidial dos clones foi extraído utilizando o kit comercial QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN), segundo as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração de DNA plasmidial foi mensurada espectrofotometricamente através do aparelho NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific), e as amostras diluídas para uma solução de trabalho de concentração  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , a qual foi encaminhada para sequenciamento.

#### *Sequenciamento dos clones e comprovação da especificidade dos iniciadores*

A reação de sequenciamento foi realizada com a enzima AmpliTaq polimerase e BigDye Terminator (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores M13, específicos para a região do vetor TOPO TA (Invitrogen) que flanqueia o inserto. O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation). As sequências direta e inversa foram filtradas respeitando um mínimo de 85% de correspondência entre as sequências e sobreposição mínima de 20%. Em seguida, com auxílio do programa Chromas 1.45 (Griffith University, Australia) a localização exata dos iniciadores foi encontrada. Utilizando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento clonado foi comparado com as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), admitindo-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência. Após confirmação da sequência clonada, os plasmídeos foram purificados e preparados para confecção das curvas-padrão.

#### *Purificação e linearização dos plasmídeos para a construção das curvas-padrão*

O DNA plasmidial foi aplicado em gel de agarose padrão a 1,5% fundido em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA; pH 8,0), seguindo as recomendações de Sambrook e Russell (2001). As bandas de DNA plasmidial visualizadas foram identificadas e cortadas do gel com auxílio de lâmina estéril. Então, o DNA plasmidial presente no fragmento de gel foi purificado utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN), conforme o protocolo descrito no kit.

Com base no mapa da região do gene “LacZ operon” do vetor utilizado e o auxílio do programa Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation), foi verificada a inexistência de sítios de restrição para as enzimas candidatas nas sequências dos insertos clonados. Os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição BamHI. Para a reação de restrição, incluiu-se 5 µL de 10X “fast digest buffer” (Fermentas), 1 µg de DNA plasmidial, 3 µL da enzima BamHI e água ultra-pura para um volume final de 50 µL de reação. Os tubos foram incubados a 37°C durante 16 horas e então a enzima inativada por incubação de 20 minutos a 80°C. Uma alíquota de 2 µL do produto da reação de restrição foi visualizado em gel de agarose padrão a 1,5% fundido em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA; pH 8,0), em corrida realizada seguindo as recomendações de Sambrook e Russell (2001).

Após confirmação da digestão total, os plasmídeos linearizados foram purificados com o kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

#### *Construção da curva padrão e quantificação absoluta*

As curvas-padrão foram construídas a partir de plasmídeos linearizados, contendo o inserto alvo previamente confirmado por sequenciamento. A partir da soma do tamanho do inserto e do vetor plasmidial, calculou-se o número de cópias do gene em cada ponto da curva-padrão a partir da seguinte equação:

$$Y_{\text{moléculas/reação}} = \frac{x \text{ g de DNA}}{\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Onde: tamanho do plasmídeo corresponde à soma do vetor mais o inserto; 660 é a média do peso molecular em Daltons de um par de bases de DNA dupla fita;  $6,022 \times 10^{23}$  é a constante de Avogadro.

Para cada gene sob estudo foi gerada uma curva-padrão, através de 7 diluições do DNA de plasmídeo contendo o inserto específico com concentrações de  $2,45 \times 10^1$  a  $2,45 \times 10^7$  cópias do gene 16S rRNA para a classe *Actinobacteria*,  $1,94 \times 10^7$  a  $1,94 \times 10^1$  cópias para *Enterobacteriaceae*,  $1,88 \times 10^2$  a  $1,88 \times 10^8$  cópias para o gênero *Lactobacillus* e  $2,02 \times 10^1$  a  $2,02 \times 10^7$  cópias para o gênero *Enterococcus*.

#### *Reações de PCR em tempo real*

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um equipamento ABI 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 12,5 µl contendo 6,25µL do reagente 2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix Universal (Kapa Biosystems), 50X ROX High (Kapa Biosystems), 2,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador específico, 5ng de DNA metagenômico e água ultra-pura para completar o volume de reação de 12,5 µL. As condições de amplificação incluíram um período inicial de 50°C por 2 minutos, depois 10 minutos a 95 °C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento específica (Tabela 1) por 1 minuto. Ao final da reação foi empregado

um ciclo de vinte minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da amplificação.

### *Análise de threshold e eficiência das curvas-padrão*

Os valores de Cq foram obtidos e analisados pelo software ABI 7900HT Sequence Detection System v2.4.1 (Applied Biosystems). Para definição do *threshold* de cada curva-padrão, foi realizada análise conjunta da eficiência destas curvas, a partir do valor de *de* inclinação da reta, conforme equação abaixo.

$$e = 10^{(-1 / \text{inclinação})} - 1$$

Onde: *e* = eficiência

Todas as curvas apresentaram valor de inclinação entre -3,6 e -3,1, ou seja, os valores de eficiência ficaram entre 90 e 110% conforme recomendado por Livark e Schmittgen (2001). Os valores de inclinação da reta, as equações e demais informações sobre as curvas-padrão são apresentados na Tabela 2. Após definido na curva-padrão, o “threshold” foi aplicado a todas as amostras avaliadas, e os valores de Cq guardados. Além disso, para cada curva também foi definida uma faixa de detecção, a partir da análise das curvas de dissociação e dos controles. As estimativas do número de cópias para o gênero *Enterococcus* ficaram abaixo do limite de detecção do método (20 cópias / 5 ng de DNA) em todos os tratamentos, motivo pelo qual não foram incluídas nas tabelas.

**Tabela 2.** Equações das curvas-padrão e valores de inclinação da reta,  $r^2$  e eficiência dos grupos bacterianos estudados.

| Grupo de bactérias                   | Inclinação | Equação               | $r^2$ | e    |
|--------------------------------------|------------|-----------------------|-------|------|
| Classe <i>Actinobacteria</i>         | -3,34      | $Y = -3,34x + 39,439$ | 0,98  | 0,99 |
| Família<br><i>Enterobacteriaceae</i> | - 3,44     | $Y = -3,44x + 35,438$ | 0,99  | 0,95 |
| Gênero <i>Enterococcus</i>           | -3,52      | $Y = -3,52x + 36,054$ | 0,99  | 0,92 |
| Gênero <i>Lactobacillus</i>          | -3,33      | $Y = -3,33x + 34,063$ | 0,99  | 0,99 |

e = eficiência da reação de qPCR

Após todas as análises, os valores de  $Cq$  foram transformados em número de cópias a partir da equação linear resultante das curvas-padrão estimadas, pela seguinte fórmula:

$$N = 10^{(Cq-b)/a}$$

Onde:  $N$  = número de cópias na amostra;  $Cq$  = ciclo de quantificação;  $a$  = inclinação;  $b$  = intercepto.

### **Análise estatística**

A análise estatística utilizada neste trabalho é a mesma descrita para as variáveis laboratoriais do Capítulo 2 (item 2.4).

## **RESULTADOS**

Os resultados do jejum prolongado (21 dias) e do período de realimentação (7 dias) sobre o número de cópias da região variável do gene 16S DNAr, de microorganismos pertencentes à classe *Actinobacteria*, família *Enterobacteriaceae* e gênero *Lactobacillus* presentes na mucosa intestinal de pacus são apresentados na Tabela 3.

A privação de alimentos por 21 dias causou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de cópias do gene 16S DNAr dos táxons *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus*, mas não afetou o número de cópias da classe *Actinobacteria*, cujo valor foi estatisticamente igual ao do tratamento controle.

Por outro lado, verifica-se que a realimentação teve um efeito positivo sobre o número de cópias do 16S DNAr, haja vista que, em relação aos peixes mantidos em jejum, houve um aumento significativo desse parâmetro ( $P < 0,05$ ) nos três táxons estudados. Entretanto, esse efeito positivo favoreceu de maneira mais intensa a classe *Actinobacteria* e o gênero *Lactobacillus*, uma vez que o número de cópias do gene 16S DNAr de ambos os táxons foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos peixes realimentados do que naqueles que fizeram parte do grupo controle.

Tabela 3. Número de cópias<sup>1</sup> do gene 16S DNAr para *Actinobacteria*, *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus* (n=5) na mucosa intestinal de pacus.

| Tratamento   | Classe                | Família                   | Gênero               |
|--------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|
|              | <i>Actinobacteria</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Controle     | 5,19 ± 0,08 B         | 4,34 ± 0,10 A             | 3,02 ± 0,20 B        |
| Jejum        | 5,30 ± 0,07 B         | 2,96 ± 0,09 B             | 2,05 ± 0,20 C        |
| Realimentado | 5,92 ± 0,07 A         | 4,04 ± 0,09 A             | 3,92 ± 0,20 A        |

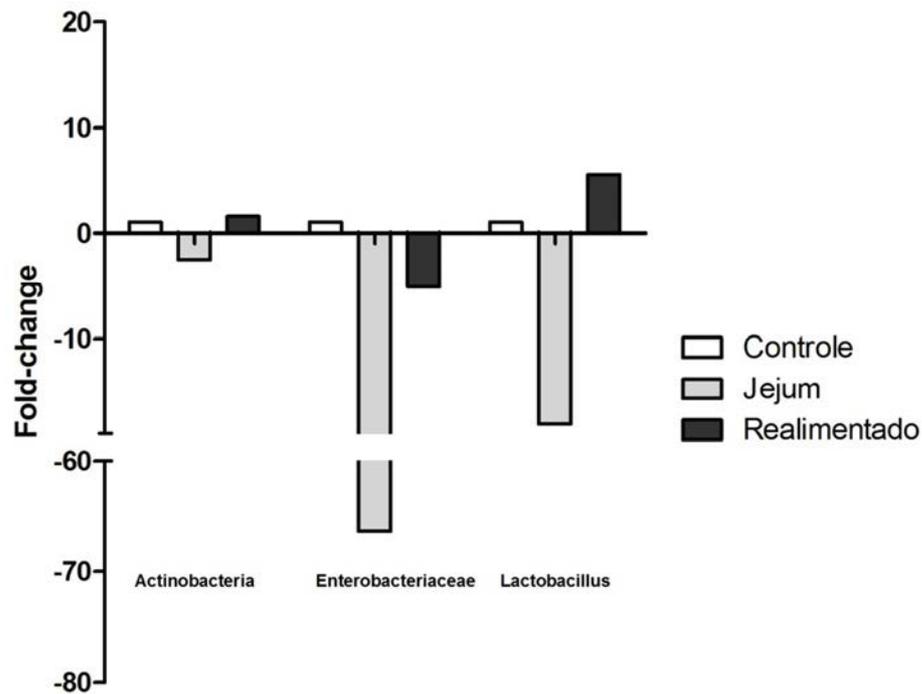
<sup>1</sup>log10 do número de cópias do gene 16S DNAr em 5,0ng de DNA genômico;

<sup>2</sup>Média ± erro padrão da média;

<sup>A,B,C</sup> Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

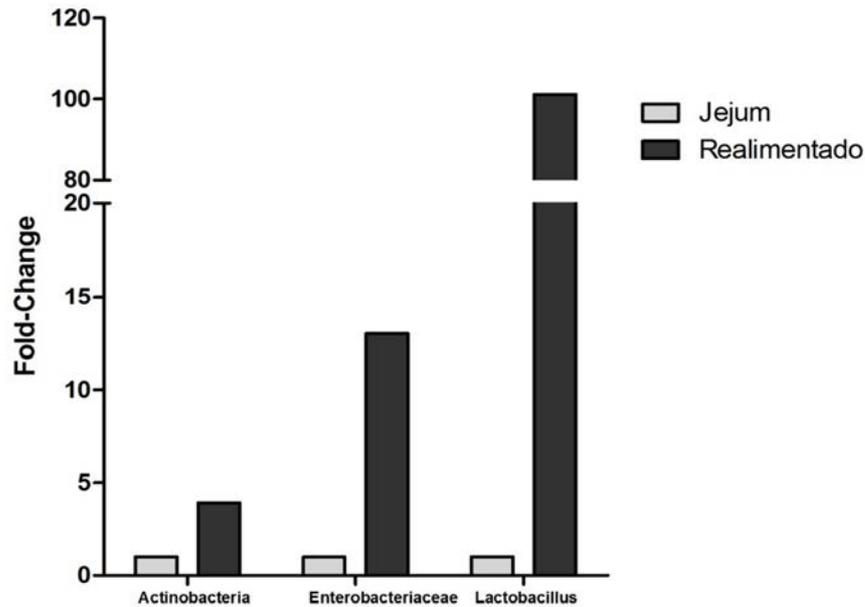
As magnitudes das diferenças supracitadas, expressas em *fold-change*, tendo como referência o grupo continuamente alimentado (controle), são apresentadas na Figura 1, onde se observa que o táxon *Enterobacteriaceae*, que teve uma redução de aproximadamente 66 vezes no número de cópias do 16S DNAr, foi o mais afetado pela privação de alimentos por 21 dias, seguido pelo gênero *Lactobacillus*, cuja redução nesse parâmetro foi da ordem de 18 vezes.

Ao final do período de realimentação, os táxons *Actinobacteria* e *Lactobacillus* apresentaram aumentos no número de cópias de pequena magnitude (1,5 e 5,5 vezes, respectivamente), enquanto que a variação no *fold-change* foi negativo para a família *Enterobacteriaceae* (5 vezes menor), embora tenha sido estatisticamente igual ao controle (Figura 1).



**Figura 1.** Valores de *fold-change* para o número de cópias de 16S DNAr na mucosa intestinal de pacus continuamente alimentados (Controle), em jejum por 21 dias (Jejum) e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum (Realimentado).

Os valores de *fold-change* do número de cópias do gene 16S DNAr na mucosa intestinal de pacus realimentados, tendo como referência os peixes mantidos em jejum, são apresentados na Figura 2, na qual se observa que esse índice foi positivo para os três táxons, sendo que as maiores magnitudes foram verificadas para o gênero *Lactobacillus* (101 vezes) e família *Enterobacteriaceae* (13 vezes).



**Figura 2.** Valores de *fold-change* para o número de cópias de 16S DNAr na mucosa intestinal de pacus em jejum por 21 dias (Jejum) e realimentados por 7 dias após 21 dias de jejum (Realimentado).

Na Tabela 4 são apresentados os números de cópias do 16S DNAr no conteúdo intestinal de pacus submetidos à 7 dias de realimentação. Entre os três táxons estudados, somente o gênero *Lactobacillus* apresentou aumento significativo dessa variável em relação ao controle ( $P < 0,05$ ). Quando expresso em valores de *fold-change* (Figura 3), verifica-se que o aumento no número de cópias do 16S DNAr de *Lactobacillus* teve a magnitude de aproximadamente 200 vezes.

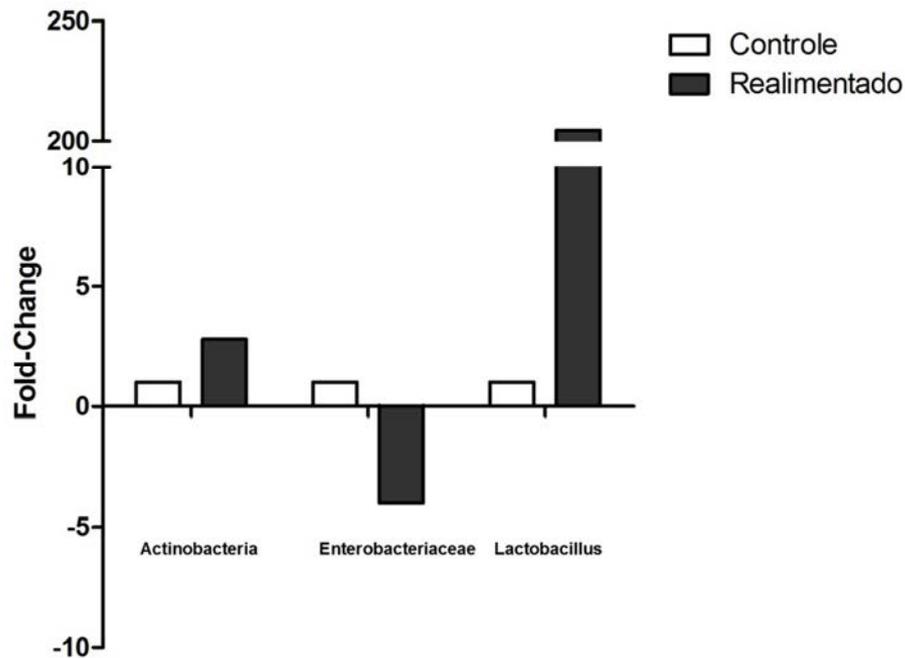
Tabela 4. Número de cópias<sup>1</sup> do gene 16S DNAr de *Actinobacteria*, *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus* (n=5) no conteúdo intestinal de pacus.

| Tratamento   | Classe                | Família                   | Gênero               |
|--------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|
|              | <i>Actinobacteria</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Lactobacillus</i> |
| Controle     | 6,53 ± 0,14           | 4,78 ± 0,23               | 3,06 ± 0,21 B        |
| Realimentado | 6,86 ± 0,14           | 4,10 ± 0,23               | 5,80 ± 0,24 A        |

<sup>1</sup>log<sub>10</sub> do número de cópias do gene 16S DNAr em 5,0ng de DNA genômico;

<sup>2</sup>Média ± erro padrão da média;

<sup>A,B</sup> Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ );



**Figura 3.** Valores de *fold-change* para as cópias de 16S DNAr no conteúdo intestinal de pacus continuamente alimentados (Controle), e em jejum por 21 dias e realimentados por 7 dias (Realimentado).

## DISCUSSÃO

O presente trabalho utilizou a técnica de quantificação absoluta do número de cópias do gene 16S DNAr por qPCR para monitorar as variações nas populações de microorganismos pertencentes à classe *Actinobacteria*, família *Enterobacteriaceae* e gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* na mucosa e no conteúdo intestinal de juvenis de pacu mantidos em jejum por 21 dias e, após esse período, realimentados por 7 dias.

Essa metodologia vem sendo frequentemente utilizada para a análise quantitativa dos diversos táxons que compõem a microbiota intestinal (Walter *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002; Rintillä *et al.*, 2004; Amit-Romach *et al.*, 2004; Lunedo *et al.*, 2014), porém, dentro do nosso conhecimento, foi utilizada uma única vez em estudo com peixes (Li *et al.*, 2013). Assim, além de escassas, as informações existentes sobre os aspectos quantitativos da microbiota intestinal de peixes foram obtidas em estudos sobre diversidade taxonômica, cuja metodologia (sequenciamento em larga escala) não é apropriada para a realização de análises quantitativas (Kwon e Ricke, 2011).

A privação de alimento consiste em um desafio fisiológico enfrentado por diversas espécies de peixes, que afeta diretamente a composição de sua microbiota intestinal (Kohl *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2014). Dois fatores são determinantes para as alterações da abundância relativa de populações microbianas nesta condição: (i) a redução na disponibilidade de nutrientes, que gera uma “crise de energia” para os microrganismos (McCue, 2012) e (ii) a redução do comprimento e massa úmida do intestino em resposta ao jejum (Zaldua e Naya, 2014), que limita a disponibilidade de espaço para o desenvolvimento da microbiota.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o jejum ocasionou uma drástica redução nas populações de microrganismos pertencentes aos taxons *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* associadas à mucosa intestinal do pacu, porém não as eliminou completamente desse ambiente, evidenciando que ambos os táxons fazem parte da microbiota autóctone dessa espécie.

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bactérias fermentadoras, anaeróbias facultativas, que sobrevivem no TGI de peixes em condições de baixo pH e abundância nutrientes (Holt *et al.*, 1994). Em hospedeiros saudáveis e bem nutridos, um grande número de representantes desta família são integrantes nativos da microbiota de peixes de água doce (Huber *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007). Assim sendo, é compreensível que os microrganismos pertencentes a esse táxon tenham sido os mais afetados pelo jejum, apresentando uma redução de aproximadamente 66 vezes quando comparada ao controle (Figura 1).

Embora não haja informações detalhadas sobre a forma como os integrantes da família *Enterobacteriaceae* reagem ao jejum, é razoável supor que eventuais alterações nos fatores bióticos e abióticos do ecossistema intestinal, tais como interações entre diferentes táxons (sinergismo e/ou competição), mudanças na osmolaridade e pH, entre outros, também tenham contribuído para a drástica redução populacional desse grupo de microrganismos após 21 dias de jejum. Contudo, nossos resultados sugerem que o período de sete dias de realimentação foi suficiente para recompor as condições ideais para sua

proliferação, haja vista que o número de cópias do gene 16S DNAr dos peixes realimentados foi semelhante ao dos peixes continuamente alimentados.

É preciso ressaltar que essa resiliência aos efeitos do jejum prolongado demonstrada pelos integrantes da família *Enterobacteriaceae* pode ter implicações negativas para o hospedeiro, uma vez que diversos integrantes desse táxon, dentre os quais bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Hafnia* e *Edwardsiella*, entre outros, são patógenos oportunistas de peixes, notadamente em situações de estresse, quando o sistema imunológico se torna debilitado (Sekirov e Finlay, 2009).

O jejum prolongado também afetou negativamente a população de *Lactobacillus* na mucosa intestinal do pacu, ocasionando uma redução populacional da ordem de aproximadamente 18 vezes, quando comparada ao tratamento controle. Efeito semelhante foi observado em tilápias-do-nilo submetidas ao jejum por 21 dias, que apresentaram um decréscimo significativo na população de *Lactobacillus* presente no ceco desses peixes (Kohl *et al.*, 2014).

No entanto, a presença da população de *Lactobacillus* no trato intestinal dos pacus submetidos ao jejum prolongado, ainda que numericamente reduzida, comprova a autoctoneidade desse táxon, haja vista que estes microorganismos são dependentes do aporte de diversos nutrientes (aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais, ésteres de ácidos graxos e carboidratos fermentáveis) para se desenvolverem (Kandler e Weiss, 1986; Walter, 2008).

Ainda que os representantes desse gênero sejam frequentemente descritos como organismos de crescimento fastidioso, característica limitante para o estabelecimento de uma população permanente no trato intestinal (Walter, 2008), os resultados do presente trabalho indicam que os *Lactobacillus* são bem adaptados ao ambiente intestinal do pacu, uma vez que após um curto período de realimentação (apenas 7 dias), a população desse táxon apresentou um crescimento significativo, da ordem de aproximadamente 101 vezes em relação aos peixes mantidos em jejum, sendo inclusive 5,6 vezes maior ( $p < 0,05$ ) do que a população de *Lactobacillus* do controle.

É preciso salientar que esse aumento na população de *Lactobacillus* observado ao final do período de realimentação não se deve apenas à proliferação da população remanescente do período de jejum, mas também ao aporte dietético de *Lactobacillus* naturalmente presente no alimento, decorrente do retorno ao arraçoamento.

É sobejamente conhecido que os integrantes desse gênero possuem elevado potencial de utilização como probióticos na alimentação animal, uma vez que apresentam a capacidade de inibir a colonização de bactérias patogênicas, por meio de exclusão competitiva (Ringø *et al.*, 2005; Balcazar *et al.*, 2006; Gomez & Balcázar, 2008) e pela produção de ácidos orgânicos (Atrih *et al.*, 2001), compostos antifúngicos (Corsetti *et al.*, 1998) e bacteriocinas (Ringø *et al.*, 2005; Gatesoupe, 2008).

Contudo, Wu *et al.* (2011) sugeriram que a utilização de *Lactobacillus* como probióticos não seria eficiente, pois as cepas não seriam capazes de se proliferar no TGI após a interrupção do seu fornecimento na dieta. Contrariando essa percepção, os resultados apresentados no presente estudo evidenciam que integrantes desse táxon são capazes de permanecer no trato intestinal de peixes durante longos períodos, mesmo em condições adversas, o que é uma característica altamente desejável para candidados a probiótico.

Assim sendo, um possível desdobramento desse trabalho seria efetuar a caracterização taxonômica da população de *Lactobacillus* presente na mucosa intestinal dos pacus mantidos em jejum e identificar aquelas com potencial para serem utilizadas como probióticos para peixes.

Nesse contexto, é preciso lembrar que diversos integrantes da classe *Actinobacteria* são capazes de produzir metabólitos secundários que apresentam potente atividade antibiótica (Ventura *et al.*, 2007), fato que também lhes confere potencial para serem usados como probióticos para peixes (Das *et al.*, 2008).

Diferentemente do que ocorreu com as populações de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae*, o jejum prolongado não afetou a população de *Actinobacteria* associada à mucosa intestinal do pacu, que permaneceu estável após o período de jejum. Um dos fatores que concorre para essa estabilidade é o constante

processo de colonização do trato intestinal dos peixes pelas bactérias pertencentes à classe *Actinobacteria*, uma vez os integrantes desse táxon se encontram amplamente distribuídos no ambiente aquático (Wu *et al.*, 2012). Devido a sua prevalência e distribuição universal, esse táxon faz parte do “core” da microbiota intestinal de peixes (Zhou *et al.*, 1998, Han *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2012).

Os resultados do presente trabalho sugerem ainda que a população de *Actinobacteria* responde positivamente ao aumento na disponibilidade de nutrientes, haja vista que o número de cópias do 16S DNAr desse táxon foi 50% maior nos peixes realimentados do que naqueles do controle, contrapondo-se aos resultados relatados por Li *et al.* (2013), que observaram um aumento na população desse táxon no intestino de carpas capim submetidas a privação de nutrientes.

O presente estudo fornece as primeiras informações a respeito das alterações do microbioma intestinal em pacus submetidos ao jejum prolongado e realimentação. Embora a microbiota tenha grande influência nos processos de digestão e absorção de nutrientes, poucos estudos na literatura avaliaram as modificações da microbiota intestinal em peixes nestas condições. Este estudo identificou modificações importantes, como a redução do número de cópias de 16S do gênero *Lactobacillus* e família *Enterobacteriaceae* durante o período de jejum, e restabelecimento destas populações ao final do período de realimentação, com aumento significativo da população de *Lactobacillus* na mucosa e conteúdo intestinal. A quantificação de grupos bacterianos específicos por meio da técnica de qPCR demonstrou ser uma importante ferramenta para avaliação das alterações das comunidades microbianas na mucosa e conteúdo intestinal de pacus.

## REFERÊNCIAS

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ATRIH A., REKHIFF N., MOIR A.J.G., LEBRIHI A., LEFEBVRE G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti – *Listeria* bacteriocin

produced by *Lactobacillus plantarum* C19. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p. 93-104, 2001.

BALCAZAR J.L., DECAMP O., VENDRELL D., DE BLAS I., RUIZ-ZARZUELA I. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. **Microbial Ecology in Health and Diseases**, v.18, p.65-70, 2006.

BARTOSCH, S.; FITE, A.; MACFARLANE, G.T.; MCMURDO, M.E. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment in the fecal microbiota. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, n.6, p. 3575-3581, 2004

BROWN, K., DECOFFE, D.; MOLCAN, E.; GIBSON, D. L. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. **Nutrients**, v. 4(11), p.1552–1553, 2012.

CORSETTI A., GOBETTI M., BALESTRIERI F., PAOLETTI F., RUSSI L., ROSSI J. Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling, **Journal of Food Science**, v.63, p. 347-351, 1998.

COSTELLO, E.K.; GORDON, J.I.; SECOR, S.M.; KNIGHT, R. Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. **The ISME Journal.**, v. 4, p.1375–1385, 2010.

DAS, S.; WARD, L. R.; BURKE, C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.81, p.419–429, 2008.

DETHLEFSEN L., ECKBURG P.B., BIK E.M., RELMAN D.A. Assembly of the human intestinal microbiota. **Trends Ecol Evol**, v.21(9), p.517–523, 2006.

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotics treatments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** 14,107-114, 2008.

GILBERT, J.A., DUPONT, C.L. Microbial metagenomics: beyond the genome. **Annu Rev Mar Sci**, v.3, p. 347–371, 2011.

GOMEZ, G.D., BALCAZAR, J. L. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 52, 145-154, 2008.

GONG, J.; FORSTER, R.J.; YU, H.; CHAMBERS, J.R.; SABOUR, P.M.; WHEATCROFT, R.; CHEN, S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. **FEMS Microbiology Letters**, v.208, p.1-7, 2002.

HAN, S.F., LIU, Y.C., ZHOU, Z.G., HE, S.X., CAO, Y.A. *et al.* Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. **Aquaculture Research** 42: 47–56, 2010.

HEILIG, H. G.; ZOETENDAL, E.G.; VAUGHAN, E.E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, n.1, p.114-123, 2002.

HOPKINS, M.J., SHARP, R., MACFARLANE, G.T. Variation in human intestinal microbiota with age. **Digest Liver Dis**, v.34, S12–S18, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition, Williams and Wilkins**, ISBN 0-68300-6032, Baltimore, Maryland, USA.

HUBER, I., SPANGGAARD, B., APPEL, K.F., ROSSEN, L., NIELSEN, T., GRAM, L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **J Appl Microbiol.**, v. 96, p.117–132, 2004.

KANDLER, O.; WEISS, N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods, p. 1208–1234. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

KIM, D.H., BRUNT, J., AUSTIN, B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J Appl Microbiol.**, v.102, p.1654–1664, 2007.

KOHL, K. D.; AMAYA, J.; PASSEMENT, C. A.; DEARING, M.D.; McCUE, M. D. Unique and shared responses of the gut microbiota to prolonged fasting: a comparative study across five classes of vertebrate hosts. **FEMS Microbiology Ecology**, v.90, p. 883-894, 2014.

KUROKAWA, K., ITOH, T., KUWAHARA, T., OSHIMA, K., TOH, H., TOYODA, A., TAKAMI, H., MORITA, H., SHARMA, V.K., SRIVASTAVA, T.P., TAYLOR, T.D., NOGUCHI, H., MORI, H., OGURA, Y., EHRLICH, D.S., ITOH, K., TAKAGI, T., SAKAKI, Y., HAYASHI, T., HATTORI, M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. **DNA Research**, v.14, n.4, p.169-181, 2007.

KWON, Y. M.; RICKE, S. C. **High-throughput Next Generation Sequencing**. Springer, 2011.

LI, X.; YAN, Q.; XIE, S; HU, W.; YU, Y.; HU, Z. Gut Microbiota Contributes to the Growth of Fast-Growing Transgenic Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). **PLOS ONE**, v.8, n.5, e64577, 2013.

LIVARK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUNEDO, R.; FERNANDEZ-ALARCON, M. F.; CARVALHO, F.M.S.; FURLAN, L. R.; MACARI, M. Analysis of the intestinal bacterial microbiota in maize- or sorghum-fed broiler chickens using realtime PCR. **British Poultry Science**, v.55, p.795-803, 2014.

MCCUE, M.D. (2012) **Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation**. Springer, New York.

MICHEL C., PELLETIER C., BOUSSAHAM., DOUET D-G., LAUTRAITE A., TAILLIEZ P. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.2947-2955, 2007.

MIYOSHI, Y.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; SATOH, E. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.70, p.1622–1628, 2006.

- NAYAK, S. K. Role of microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p.1553-1573, 2010.
- NIKOSKELAINEN, S., OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S., BYLUND, G. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. **Aquaculture**, v.198, p.229-236, 2001.
- OKADA, T.; FUKUDA, S.; HASE, K.; NISHIUMI, S.; IZUMI, Y.; YOSHIDA, M.; HAGIWARA, T.; KAWASHIMA, R.; YAMAZAKI, M.; OSHIO, T.; OTSUBO, T.; INAGAKI-OHARA, K.; KAKIMOTO, K.; HIGUCHI, K.; KAWAMURA, Y.I.; OHNO, H.; DOHI, T. Microbiota-derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice. **Nat Commun** 2013, 4:1654.
- O'MAHONY, S.M.; MARCHESI, J.R.; SCULLY, P.; CODLING, C.; GEOLHO A.M.; QUIGLEY, E.M.; CRYAN, J.F.; DINAN, T.G. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. **Biol Psychiatry**, v.65, n3, p.263–267, 2009.
- OTTESEN, O.H., OLAFSEN, J.A. Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae following microflora manipulation. **Aquaculture**, v.187, p.225-238. 2000.
- OVIEDO-RONDÓN, E. O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 209-225, 2009.
- PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends Microbiol.**, v.15, p. 546–553, 2007.
- RASTALL, R. A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 2022-2026, 2004.
- RINGØ, E.; BIRKBECK T.H. Intestinal microflora of fish larvae and fry. **Aquaculture Research**, v. 30, p.73-93, 1999.
- RINGØ, E., JUTFELT F., KANAPATHIPPILLAI P., BAKKENY., SUNDELL K., GLETTE J., MAYHEW T.M., MYKLEBUST R., OLSEN R.E. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Cell and Tissue Research**, v.318, p.305-311, 2004.
- RINGØ, E., SCHILLINGER U., HOLZAPFEL W. (2005) Antibacterial abilities of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: **Microbial Ecology in Growing Animals** (ed. By W. Holzapel & P. Naughton), p. 418-453. Elsevier, Edinburgh, UK.
- RINTILLÄ, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16 rDNA-targetes primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p. 1166-1177, 2004.
- RITALAHTI, K. M.; AMOS, B.K.; SUNG, Y.; WU, Q.; KOENIGSBERG, S.S.; LÖFFLER, F. E. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2765-2774, 2006.
- SALINAS I, CUESTA A, ESTEBAN MA, MESEGUER J. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 19, p.67-77, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 3. Ed., 2001.

- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v.31, p.107-133, 1977.
- SCHÄFER, J.; JÄCKEL, U.; KÄMPFER, P. Development of a new PCR primer system for selective amplification of *Actinobacteria*. **FEMS Microbiology Letters**, v.311, p.103–112, 2010.
- SEKIROV, I., FINLAY, B.B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. **Journal of Physiology**, v.587, p.4159-4167, 2009.
- TANAKA S, KOBAYASHI T, SONGJINDA P, TATEYAMA A, TSUBOUCHI M, KIYOHARA C, SHIRAKAWA T, SONOMOTO K, NAKAYAMA J. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. **Fems Immunol Med Mic**, v.56(1), p. 80–87, 2009.
- TAOKA, Y., MAEDA, H., JO, J.Y., JEON, M.J., BAI, S.C., LEE, W.J., YUGE, K., KOSHIO, S. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. **Fisheries Sci.**, v.72, p.310-321, 2006.
- TREMAROLI, V.; BACKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v.489, p.242–249, 2012.
- TRIPATHI, G., VERMA, P. Starvation-induced impairment of metabolism in a freshwater catfish. **Z Naturforsch C.**, v.58(5–6), p.446–451, 2003.
- TURNBAUGH P.J., HAMADY M, YATSUNENKO T, CANTAREL BL, DUNCAN A, LEY RE, SOGIN ML, JONES WJ, ROE BA, AFFOURTIT JP, EGHOLM M, HENRISSAT B, HEATH AC, KNIGHT R, GORDON JI: A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457(7228), p.480–484, 2009.
- VELEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER S.C.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v.276, p.140–148, 2007.
- VENTURA, M., CANCHAYA, C., TAUCH, A., CHANDRA, G., FITZGERALD, G.F., *et al.* Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.71, p.495–548, 2007.
- XIA, J. H.; LIN, G.; FU, G.H.; WAN, Z.Y.; LEE, M.; WANG, L.; LIU, X.J.; YUE, G. H. The intestinal microbiome of fish under starvation. **BMC Genomics**, v.15, 266, 2014.
- WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G.W.; LIS, C.M.; MUNRO, K.; HAMMES, W.P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weisella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.6, p.2578-2585, 2001.
- WALTER, J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4985–4996, 2008.
- WU, S.G.; GAO, T.H.; ZHENG, Y.Z.; WANG, W.W.; CHENG, Y.Y.; *et al.* Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Aquaculture**, v.303, p1–7, 2010.
- WU, S, WANG, G., ANGERT, E.R., WANG, W., LI, W., ZOU, H. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. **PLoS ONE** 7(2): e30440. doi:10.1371/journal.pone.0030440, 2012.

YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 670-679, 2005.

ZALDÚA, N.; NAYA, D.E. Digestive flexibility during fasting in fish: a review. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v.169, p.7–14, 2014.

ZHOU, W.H., CHEN, X.X., ZHANG, D.X., CHEN, C.F. A preliminary study on the influence of different feeding stuff on intestinal microflora of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Journal of Huazhong Agricultural University**, v.17, p.252–256, 1998.

ZHOU, H.; GONG, J.; BRISBIN, J.T.; YU, H.; SANEI, B.; SABOUR, P.; SHARIF, S. Appropriate sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. **Poultry Science**, v.86, p.2541-2549, 2007.

## **CAPÍTULO 4 – CLONAGEM, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE GENES DE REFERÊNCIA PARA NORMALIZAÇÃO EM ESTUDOS DE PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*)**

**RESUMO** – O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é um método de alta sensibilidade e exatidão em ensaios para quantificação da abundância de RNAm. No entanto, existem diversos fatores que podem comprometer a interpretação dos resultados. O principal deles consiste na seleção incorreta de genes de controle interno para a normalização dos dados de expressão gênica. Neste estudo realizou-se a clonagem, caracterização e a seleção de genes de referência adequados em estudos de privação alimentar com pacus. A estabilidade de expressão de quatro genes de referência [ $\beta$ -actina (ACTB), gliceraldeído-fosfato-desidrogenase (GAPDH), fator de alongamento embrionário 1-alfa (EEF1) e Acil CoA-oxidase 3 (ACOX3)] foram verificadas utilizando os algoritmos *geNorm*, *Normfinder* e a metodologia de modelos lineares mistos, em dois ensaios de privação alimentar e realimentação, considerando duas classes de peso distintas (150g e 350g). Os genes de referência selecionados para a quantificação de RNAm foram testados e validados para a expressão do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), e de proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90). As combinações de EEF1-A/GAPDH/ACTB/ACOX3 e GAPDH/ACTB/ACOX3 foram validadas como as melhores combinações para a normalização de dados de expressão de RNAm em qPCR em fígados pacu, para peixes menores e maiores, respectivamente. Estes genes de referência serão utilizados para normalização em estudos futuros de expressão gênica para esta espécie.

**Palavras-chave:** ACTB, GAPDH, EEF1-A, ACOX3, IGF-1, HSP70, HSP90, jejum

## **CHAPTER 4 - CLONING, CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF REFERENCE GENES FOR QUANTITATIVE PCR NORMALIZATION IN PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

**ABSTRACT** – The quantitative real-time PCR (qPCR) is a high sensitivity and accuracy method in assays to quantify the abundance of mRNA. However, there are several factors that may compromise the interpretation of results. The main problem is the incorrect selection of internal control genes for normalization of gene expression data. In this study, we proceeded to cloning, characterization and selection of the suitable reference genes in food deprivation studies with pacu. The stability of four reference gene expression [ $\beta$ -actin (ACTB), glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH), embryo elongation factor 1-alpha (EEF1) and Acyl-CoA oxidase 3 (ACOX3)] were verified using *geNorm* and *Normfinder* algorithms, and the methodology of mixed linear models, in two experiments of starvation and refeeding, considering two different weight classes (150g and 350g). The selected reference genes for quantification of mRNA were tested and validated for expression of the insulin-like growth factor I (IGF-1), and heat shock proteins (HSP70 and HSP90). Combinations of EEF1-A/GAPDH/ACTB/ACOX3 and GAPDH/ACTB/ACOX3 have been validated as the best combinations for normalizing mRNA expression in qPCR data in pacu livers of smaller and larger juveniles, respectively. These reference genes will be used for normalization in future studies of gene expression for this species.

**Keywords:** ACTB, GAPDH, EEF1-A, ACOX3, IGF-1, HSP70, HSP90, starvation

## 1. Introdução

Em pesquisas biológicas, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é a técnica mais reprodutível e sensível para a análise de expressão gênica, e tem sido extensivamente utilizada para medir e comparar níveis de transcrição dos genes (Bustin *et al.*, 2009; Derveaux *et al.*, 2010). Para isto, são necessários genes de referência internos adequados para a normalização das taxas de expressão dos genes-alvo. Os genes de referência mais amplamente utilizados e descritos em estudos de expressão gênica incluem a  $\beta$ -actina (ACTB), fator de alongamento embrionário 1-alfa (EEF1-A), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e o 18S RNA ribossomal (18S rRNA) (Radonic' *et al.*, 2004).

Em teoria, este controle interno deve apresentar níveis de expressão constante em todos os tipos de células e condições experimentais (Thellin *et al.*, 1999). Entretanto, diversos estudos têm relatado que a estabilidade dos genes de referência pode variar significativamente entre tratamentos experimentais e nos diferentes tipos de tecidos (Schmittgen e Zakrajsek, 2000; Bas *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2005). Além disso, a utilização de um único gene referência para a normalização dos dados pode levar a erros relativamente grandes (Kosir *et al.*, 2010; Matousková *et al.*, 2014). Diante disto, verifica-se a necessidade de validação dos genes de referência ou endógenos para cada organismo e condição experimental específica (Cicinnati *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2014).

A condição primordial para a realização de estudos de expressão gênica por meio da técnica de qPCR é a pré-existência de sequências de genes e/ou transcritos devidamente caracterizadas, que servirão de molde para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores que serão utilizados nas reações de amplificação. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie nativa que vem sendo utilizada recentemente como modelo experimental em diversos estudos de expressão gênica (Almeida *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010; Leitão *et al.*, 2011; Paula *et al.*, 2014). Entretanto, esta espécie possui apenas 115 sequências depositadas no *Genbank*, das quais cinco são sequências parciais que codificam RNAs mensageiros (RNAm), ou seja, sequências de proteínas (Miostatina, Miogenina, MyoD, GH e IGF-1), e apenas uma sequência parcial da unidade ribossomal 18S do RNA (18S rRNA). As demais sequências correspondem a DNA mitocondrial e marcadores moleculares

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore?cmd=search&term=Piaractus>; data de acesso: 14/04/2015).

O pacu está sujeito a períodos de jejum, tanto na natureza, devido a fatores como redução da temperatura da água, flutuações na disponibilidade de alimento ou durante os processos migratórios para reprodução, quanto na aquicultura, durante processos inerentes ao processo produtivo. Esta capacidade de lidar com longos períodos de restrição de nutrientes deve-se em parte à modulação da expressão de uma variedade de genes associados ao eixo GH/IGF-1 (Mackenzie *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2005; Gabillard *et al.*, 2006). O IGF-1 medeia a maioria das ações anabólicas do GH, promovendo o crescimento celular, e em conjunto com outros fatores de crescimento, estimula a diferenciação das células, além de exercer múltiplos efeitos metabólicos, como redução de glicose sanguínea, inibição da lipólise e retardamento da degradação proteica (Thissen *et al.*, 1999). Entretanto, as respostas de modulação celular em peixes têm se mostrado contraditórias. Diversos autores relataram redução no número de transcritos no fígado (Pierce *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2006; Peterson e Waldbieser, 2009; Sinha *et al.*, 2012), enquanto outros não verificaram nenhuma diferença nas taxas de expressão gênica de IGF-1 (Hevrøy *et al.*, 2011; Pujante *et al.*, 2015).

Adicionalmente, em condições de estresse, um sistema de resposta generalizado existe a nível celular, que inclui a ação de diversas proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs são um grupo de proteínas intracelulares induzidas por uma grande diversidade de agentes estressores, como temperatura (Kondo *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2008), inflamações e infecções (Ackerman e Iwama, 2001; Deane e Woo, 2005; Zhang *et al.*, 2011), poluentes ambientais (Verma *et al.*, 2007) e restrição alimentar (Cara *et al.*, 2005; Antonopoulou *et al.*, 2012). No entanto, estudos da expressão de HSPs em condições de jejum são discordantes. Estudos prévios relataram aumento da expressão de HSP70 e HSP90 em larvas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e dourada (*Sparus aurata*) em jejum, ou nenhuma alteração nos níveis de RNAm de HSP70 em juvenis de bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) (Weber e Bosworth, 2005), ou em larvas de salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) (Zarate e Bradley, 2003) em condições de estresse nutricional.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou a clonagem, caracterização e avaliação de genes endógenos (ACTB, GAPDH, EEF1-A e ACOX3) adequados para quantificação relativa de RNAm, em estudos para o pacu. Todos os resultados de qPCR foram obtidos em conformidade com as diretrizes MIQE (Bustin *et al.*, 2009). Os genes de referência foram utilizados em um estudo posterior para avaliação dos perfis de expressão de genes relacionados ao crescimento (IGF-1) e estresse (HSP70 e HSP90), em juvenis de pacu submetidos à privação alimentar e realimentação, em duas classes de peso distintas (150g e 350g, aproximadamente).

## **2. Material e métodos**

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e realizados de acordo com as orientações dos princípios éticos em experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA).

### **2.1. Peixes e condições experimentais**

As condições experimentais foram descritas detalhadamente no Capítulo 2 da presente tese. Resumidamente, no experimento 1, foram utilizados 120 juvenis de pacu ( $143,04 \pm 49,23\text{g}$ ), estocados em 12 aquários experimentais com volume útil de 150L ( $10$  peixes  $\text{aquário}^{-1}$ ), e então submetidos a um período de aclimação de uma semana às condições experimentais antes do início dos tratamentos. Durante o período experimental, a temperatura da água ( $26 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ), pH ( $7,6 \pm 0,1$ ), oxigênio dissolvido ( $> 5,0\text{ mg L}^{-1}$ ), amônia ( $175,8 \pm 43\text{ mg L}^{-1}$ ), nitrato ( $413 \pm 76\text{ mg L}^{-1}$ ) e nitrito ( $5,7 \pm 3,2\text{ mg L}^{-1}$ ) foram monitorados.

No experimento 2, foram utilizados 30 juvenis de pacu ( $346,77 \pm 25,82\text{g}$ ), estocados em 3 aquários experimentais de fibrocimento com volume útil de 500 L ( $10$  peixes  $\text{aquário}^{-1}$ ) e então submetidos a um período de aclimação (1 semana) às condições experimentais antes do início dos tratamentos. Durante o período experimental, a temperatura da água ( $30 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ), pH ( $7,8 \pm 0,2$ ), oxigênio dissolvido ( $> 5,0\text{ mg L}^{-1}$ ), amônia ( $167,3 \pm 70\text{ mg L}^{-1}$ ), nitrato ( $122 \pm 22\text{ mg L}^{-1}$ ) e nitrito ( $5,9 \pm 2,5\text{ mg L}^{-1}$ ) foram monitorados.

## 2.2. Delineamento experimental e amostragem

Os peixes foram distribuídos em três grupos: (1) Alimentados continuamente por um período de 21 dias (Controle); (2) Privação alimentar por um período de 21 dias (Jejum); e (3) Privação alimentar de 21 dias seguida de realimentação por um período de 7 dias (Realimentado). Os peixes dos tratamentos controle e realimentados foram alimentados com dieta comercial formulada para espécies onívoras, em uma frequência de duas vezes ao dia (9:00 e 17:00), até a saciedade aparente. Ao término do período experimental, 10 peixes de cada tratamento foram sacrificados (benzocaína 0,4 g L<sup>-1</sup>) para remoção imediata do fígado, sendo o órgão embalado em papel alumínio, previamente identificado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C até o momento da extração do RNA.

## 2.3. Procedimentos específicos

### *Extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNA total*

As extrações de RNA total das amostras de fígado foram realizadas utilizando o kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Aproximadamente 50 mg do tecido foi pulverizado em almofariz contendo nitrogênio líquido. Após maceração, as alíquotas foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente mantidas em freezer -70°C até o início da extração de RNA. O protocolo em questão sofreu apenas uma modificação, que consistiu na adição de um tratamento com DNase, para eliminar os fragmentos de DNA, entre as duas lavagens que antecedem a eluição do RNA presente na coluna cerâmica. Para tanto, a coluna foi incubada por 30 minutos a 37°C com uma solução composta por 5 µL da enzima RQ1 – “RNase-free” DNase (Prodinol®, 1U µL<sup>-1</sup>), 8 µL de 10x “Reaction buffer” (Prodinol®) e 67 µL de água DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato).

A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas mediante leitura em fluorímetro Qubit® (*Life Technologies*). As mesmas amostras foram utilizadas para quantificação de DNA e proteínas, para avaliação de pureza da extração.

A integridade do RNA foi avaliada pela razão entre as intensidades das bandas 28S e 18S, determinadas por eletroforese microfluídica (tecnologia *Lab-on-a-chip*), com detecção de fluorescência induzida a laser, utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

#### *Genes referência para PCR em tempo real*

Os genes escolhidos como candidatos a genes referência foram GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), ACTB ( $\beta$ -actina), EEF1-A (Fator de alongamento embrionário 1-alfa) e ACOX3 (Acil-CoA oxidase 3). Para selecionar um gene ou a combinação de genes de referência adequados, a estabilidade de expressão foi analisada estatisticamente com três *softwares*: *geNorm* (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), *Normfinder* (<http://moma.dk/normfinder-software>) e pelo método de modelos lineares mistos proposto por Steibel *et al.* (2009). Para as análises no *geNorm* e *Normfinder*, os valores de ciclo de quantificação (Cq) foram transformados em quantidades relativas - o formato de entrada de dados necessário. O nível máximo de expressão (menor valor de Cq) de cada um dos genes foi utilizado como controle e ajustado para o valor de 1. Os níveis de expressão relativa foram então calculados a partir dos valores de Cq utilizando a fórmula:  $2^{-\Delta Cq}$  ( $\Delta Cq$  = valor correspondente de Cq – valor mínimo de Cq). Os dados obtidos foram analisados adicionalmente com *geNorm* e *Normfinder*. As análises de modelos lineares mistos, baseada na avaliação das variâncias residuais e das repetições dos genes ou suas combinações, foram realizadas por meio do procedimento PROC MIXED do SAS (INSTITUTE, 2011). Para o *ranking* consenso de todos os candidatos a genes de referência, as médias geométricas dos *rankings* das três análises foram calculadas.

Os estudos de expressão gênica para validação dos genes de referência foram realizados a partir dos dados de 10 réplicas biológicas de cada tratamento. Os valores relativos e normalizados foram calculados manualmente em Microsoft Excel, a partir dos valores de ciclo de quantificação (Cq), importados do software RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems). Os valores de Cq foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livark e Schmittgen, 2001). Os dados de expressão foram importados para o software GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, Inc.).

*Reação de transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real*

A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o Kit comercial First Strand cDNA Synthesis Kit® (Thermo Scientific, USA), a partir de 3,0 µg de RNA total de fígado e utilizando-se oligo(dT) como iniciador. Para tanto, foram adicionados em um microtubo específico para reações de PCR, 3 µg de RNA total, 1 µL de oligo (dT) 18 (100 µM), e água tratada com DEPC, para um volume final de 11 µL.

A reação de síntese do cDNA em termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler), compreendeu uma desnaturação inicial de 65°C por 5 minutos, seguida de anelamento dos iniciadores a 20°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram mantidas no gelo, adicionando-se a cada reação um mix composto por 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20u µL<sup>-1</sup>), 2 µL de dNTP Mix (10 mM) e 2 µL de M-MuLV Reverse Transcriptase (20u µL<sup>-1</sup>). A reação prosseguiu com a extensão da fita a 37°C por 60 minutos, seguida de inativação da enzima a 70°C por 5 minutos.

Posteriormente à síntese do cDNA, as fitas molde de RNA foram removidas por meio de digestão com a enzima Ribonuclease H (1U), por 22 minutos a 37°C. A seguir, adicionou-se a cada amostra, 1 µL de EDTA (5M, pH 8,0) e 3 µL de água milli-Q autoclavada, seguindo-se de rápida centrifugação. As amostras foram transferidas para tubos estéreis de 1,5 mL devidamente identificados. Para iniciar o processo de precipitação do cDNA, adicionou-se por reação 25 µL de água milli-Q autoclavada, 5 µL de acetato de sódio (3M; pH 5,2) e 125 µL de álcool etílico absoluto gelado. Após a mistura, os tubos foram mantidos em freezer a -20°C *overnight* (12 horas). No dia seguinte, as amostras foram submetidas à centrifugação por 20 minutos, a 4°C, a 16000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de álcool etílico 70% gelado. As amostras foram novamente submetidas à centrifugação por 6 minutos, a 4°C, a 16000 g, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi seco em bomba a vácuo por 10 minutos e ressuspendido em 30 µL de água milli-Q autoclavada. Os cDNAs foram quantificados em espectrofotômetro (ND-1000 NanoDrop Technologies), e armazenados em freezer a -20°C para posterior realização do PCR em tempo real.

### *Amplificação por PCR dos fragmentos específicos para os genes estudados*

Para a confirmação da cobertura e fidelidade dos iniciadores utilizados, as amostras de cDNA foram amplificadas pela reação de polimerase em cadeia (PCR). Para cada reação, utilizaram-se 50ng de cDNA, tampão (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 66 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,0 U de Taq DNA polimerase e água ultra-pura para um volume final de 20 µL. A reação de PCR foi realizada utilizando a seguinte sequência de termo-ciclos: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, T°C de annealing específica para cada *primer* (IGF-1, 50°C; HSP70, 55 °C; HSP90, GAPDH, ACTB e EF1-α, 52°C) por 40 segundos, 72°C por 1:30 minutos e 72°C por 7 minutos. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR foram elaborados com base nas sequências de nucleotídeos de outras espécies de peixes depositadas no Genbank, em regiões de alta conservação interespecies, utilizando-se o software “Genamics Expression 1.1” (Tabela 1). A especificidade desses iniciadores foi avaliada *in silico*, utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Os amplicons gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, diluído em tampão TAE 1x (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM; pH 8,0). Foram aplicados a cada poço do gel, 5 µL de produto de PCR, 1µL de tampão de corrida (10mM Tris-HCl, 60mM EDTA, 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol, 60% glicerol) e 0,5 µL de GelRed™ (Biotium) 20X. A corrida foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook *et al.* (2001).

**Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR, descrição e tamanho do amplicon (pb).

| Gene          | Descrição do gene                                 | Nº acesso Genbank | Espécie                      | Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3'), F/R     | Tamanho do amplicon (pb) |
|---------------|---|-------------------|------------------------------|--|--------------------------|
| <i>IGF-1</i>  | fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 | NM_001123623.1    | <i>Salmo salar</i>           | GGTCATTTCTTTCAGTGGCAT / CTTCCCCCTGTGTTTCCT       | 506                      |
| <i>HSP70</i>  | proteína de choque térmico 70                     | NM_001124745.1    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | ATCCCCAAGGTCCAGAAGC / TCTTGTTCTCTTTGCCCGTG       | 475                      |
| <i>HSP90</i>  | proteína de choque térmico 90                     | NM_131310.3       | <i>Danio rerio</i>           | CTGAGACCTTTGCCTTCC / TGGTCGATGTACTTCTCCTC        | 802                      |
| <i>GAPDH</i>  | gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase             | NM_001124246.1    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | CGGTTCGTTACAAAGGTGAGG T / CAAAGATGGAGGAGTGGGTG T | 731                      |
| <i>ACTB</i>   | β-actina citoplasmática                           | NM_001124235.1    | <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | CCTTGAACACCCCTGCCAT / TCGTGGATACCGCAAGACTC       | 451                      |
| <i>EEF1-A</i> | Fator de alongamento embrionário 1-alfa           | NM_001279647.1    | <i>Oreochromis niloticus</i> | TCGTTGCTGCTGGTGTGG / TGGGTGGTTCGTTCTTGCC         | 660                      |

## 1 *Clonagem dos genes alvo e endógenos utilizados no estudo*

2 Os fragmentos dos genes amplificados por PCR foram clonados utilizando  
3 o kit comercial TOPO TA® (Invitrogen), específico para clonagem de produtos de  
4 PCR, seguindo as instruções do fabricante.

5 Uma alíquota de 3µL do produto de PCR foi adicionada a 1 µL de *Salt*  
6 *Solution* e 1 µL de água ultra-pura. Após homogeneização, 1 µL do vetor  
7 TOPOTA foi adicionado à mistura, e a mesma incubada por 10 minutos a  
8 temperatura ambiente para a inserção dos fragmentos nos vetores. Após a  
9 inserção, 3 µL da reação de ligação foram adicionados a células quimicamente  
10 competentes de *E. coli* DH10B, a solução incubada no gelo por 30 minutos, e um  
11 choque térmico provocado colocando os tubos em banho-maria a 42°C por 45  
12 segundos, inserindo assim o plasmídeo na célula competente. Para recuperação  
13 e multiplicação das células transformadas, foi adicionado 1 mL de meio SOC, e os  
14 tubos incubados a 37°C, com agitação constante de 220 rpm durante 90 minutos.

15 Placas de petri foram preparadas com meio de cultura 2xTY (1,2% de  
16 ágar), acrescido de 50 µg mL<sup>-1</sup> do antibiótico canamicina. Após solidificação do  
17 meio, 40µL de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e 25 µL  
18 de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) foram espalhados sobre o meio  
19 com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada, com o objetivo de identificar  
20 as colônias de bactérias que continham o inserto ligado ao vetor plasmídeo. Após  
21 secagem da solução IPTG/X-GAL, 200 µL das células transformadas cultivadas  
22 em meio SOC foram aplicados nas placas de petri com o auxílio de uma alça de  
23 Drigalski, e as placas incubadas a 37°C durante 16 horas.

24

## 25 *Cultivo de clones bacterianos e extração de DNA plasmidial*

26 Uma colônia positiva e isolada de cada placa foi coletada com o auxílio de  
27 palitos de madeira esterilizados por autoclavagem e transferida para um tubo  
28 contendo meio de cultura 2xTY, acrescido de 50 µg mL<sup>-1</sup> do antibiótico  
29 canamicina. O meio foi incubado sob agitação constante (220 rpm), a 37°C,  
30 durante 16 horas.

1 O DNA plasmidial dos clones foi extraído utilizando-se o kit comercial  
2 QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguindo protocolo recomendado pelo  
3 fabricante. A concentração de DNA nas amostras foi mensurada  
4 espectrofotometricamente através do aparelho NanoDrop® (Thermo Fisher  
5 Scientific), e as amostras diluídas para uma solução de concentração  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ,  
6 a qual foi encaminhada para sequenciamento.

7

#### 8 *Sequenciamento dos clones e comprovação da especificidade dos iniciadores*

9 Os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram amplificados com a  
10 enzima Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific) conforme as recomendações do  
11 fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores M13, específicos  
12 para a região do vetor TOPOTA® que flanqueia o inserto. O sequenciamento foi  
13 realizado em aparelho ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

14 As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa  
15 Sequencher 5.0 (Gene Codes Corporation). Primeiramente, as porções iniciais e  
16 finais das sequências foram trimadas, mantendo apenas a porção de alta  
17 qualidade. Após limpeza das sequências, foi realizado alinhamento das fitas  
18 *forward* e *reverse* de dois clones de cada conjunto de iniciadores, respeitando um  
19 mínimo de 85% de correspondência entre as sequências e sobreposição mínima  
20 de 20%. A posição do alinhamento foi guardada e as sequências visualizadas no  
21 programa Chromas 1.45 (Griffith University, Australia). A localização exata dos  
22 iniciadores foi encontrada, uma sequência no formato fasta exportada e o inserto  
23 do produto de PCR selecionado. Utilizando a ferramenta BLASTn  
24 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento clonado foi comparado com  
25 as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>),  
26 admitindo-se identidade de no mínimo 95% para confirmação da especificidade  
27 da sequência.

28

#### 29 *Reações de PCR em tempo real*

30 As reações de qPCR utilizaram o reagente Kapa Sybr® FAST qPCR kit  
31 Master Mix (2x) Universal e foram realizadas em aparelho ABI 7900HT Real-Time  
32 PCR System (Applied Biosystems), de acordo com protocolo descrito por

1 Coussens *et al.* (2003). Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR foram  
2 elaborados com base nas sequências de nucleotídeos dos genes para pacu  
3 obtidos no presente estudo, utilizando-se o *software* Primer Express 3.0 (Applied  
4 Biosystems) (Tabela 2). A especificidade desses iniciadores foi avaliada *in silico*,  
5 utilizando-se a ferramenta Primer-BLAST  
6 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

7

#### 8 **2.4. Análise estatística**

9 As análises de expressão gênica para validação dos genes de referência  
10 foram realizadas utilizando-se o método *one way* ANOVA, com efeito fixo de  
11 tratamento, sendo incluído o bloco de análises como efeito aleatório (repetição).  
12 Para as comparações dos tratamentos com o controle utilizou-se o teste de  
13 Tukey, com nível de significância de 5%. A análise estatística seguiu o modelo:

$$14 \quad Y_{ij} = \mu + Rep_i + Trt_j + e_{ij}$$

15 Em que:

16  $Y_{ij}$  é a observação referente ao bloco  $i$  e tratamento  $j$ ;

17  $\mu$  é a média geral do experimento (efeito fixo);

18  $Rep_i$  é o efeito aleatório do bloco  $i$ ;

19  $Trt_j$  é o efeito do tratamento  $j$ ; efeito fixo, com 3 níveis de tratamento;

20  $e_{ij}$  é o erro experimental.

**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de qPCR, descrição e tamanho do amplicon (pb).

| <b>Gene</b>  | <b>Descrição do gene</b>                          | <b>Sequência dos oligonucleotídeos (5'→3'), F/R</b> | <b>Tamanho do amplicon (pb)</b> |
|--------------|---|---|---------------------------------|
| <i>IGF-1</i> | fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 | TTCAGCAAGCCAACAGGTTATG /<br>CCACGATGCCACGGTTGT      | 61                              |
| <i>HSP70</i> | proteína de choque térmico 70                     | CAGCATTGTGACGATCTTTCC /<br>GGTGCTCACAAAATGAAGGA     | 62                              |
| <i>HSP90</i> | proteína de choque térmico 90                     | GAAAGGACCTGAAGATTGACATCAT /<br>GGTCATGCCGATTCCAGTGT | 80                              |
| <i>GAPDH</i> | gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase             | ATGCCTCTTGCACTACCAACTG /<br>GCCCTCAATGATGCCAAATT    | 74                              |
| <i>ACTB</i>  | β-actina citoplasmática                           | CTTGATGTCACGGACAATTTCC /<br>TCCTGACCGAGAGAGGCTACA   | 65                              |
| <i>EEF1A</i> | fator de alongamento embrionário 1-alfa           | CGCTGACTTCCTTGGTGATCTC /<br>TCCACCGAGCCCCCTTAC      | 58                              |
| <i>ACO3</i>  | acil-CoA oxidase 3                                | GCACAAACAGCAGGGTAAAGG /<br>CAGAATCCTGTTCCAGTCATCCA  | 79                              |

### 1        **3. Resultados**

2

#### 3        **3.1. Clonagem e caracterização das sequências parciais dos genes de** 4        **pacu utilizados no estudo**

5        As informações que caracterizam os cDNAs que foram clonados e  
6        sequenciados para se desenhar os iniciadores utilizados no estudo de expressão  
7        gênica por PCR em tempo real (qPCR), são apresentados na Tabela 3.

8        **Tabela 3.** Caracterização dos cDNAs clonados e sequenciados.

| cDNA          | Número de bases | Similaridade                      | No acesso     | Valor de e         | Identidade (%) |
|---------------|-----------------|-----------------------------------|---------------|--------------------|----------------|
| <i>IGF-1</i>  | 414             | <i>Astyanax mexicanus</i>         | XP007241889.1 | 6 <sup>e-89</sup>  | 87             |
| <i>HSP70</i>  | 475             | <i>Carassius carassius</i>        | AEQ29955.1    | 1 <sup>e-76</sup>  | 98             |
| <i>HSP90</i>  | 800             | <i>Amphiprion ocellaris</i>       | BAK20463.1    | 1 <sup>e-133</sup> | 96             |
| <i>GAPDH</i>  | 711             | <i>Misgurnus anquillicaudatus</i> | BAF43305.1    | 9 <sup>e-164</sup> | 96             |
| <i>ACTB</i>   | 325             | <i>Odontesthes hatcheri</i>       | ABF47513.1    | 8 <sup>e-73</sup>  | 100            |
| <i>EEF1-A</i> | 598             | <i>Astyanax mexicanus</i>         | XP007245773.1 | 9 <sup>e-142</sup> | 100            |
| <i>ACOX3</i>  | 410             | <i>Astyanax mexicanus</i>         | XP007248073.1 | 2 <sup>e-84</sup>  | 94             |

9        Parâmetros da pesquisa: Blastx; banco de dados de sequências proteicas não redundantes (nr);  
10        organismo: teleósteos (Taxid:7898). Data: 14/04/2015.

11

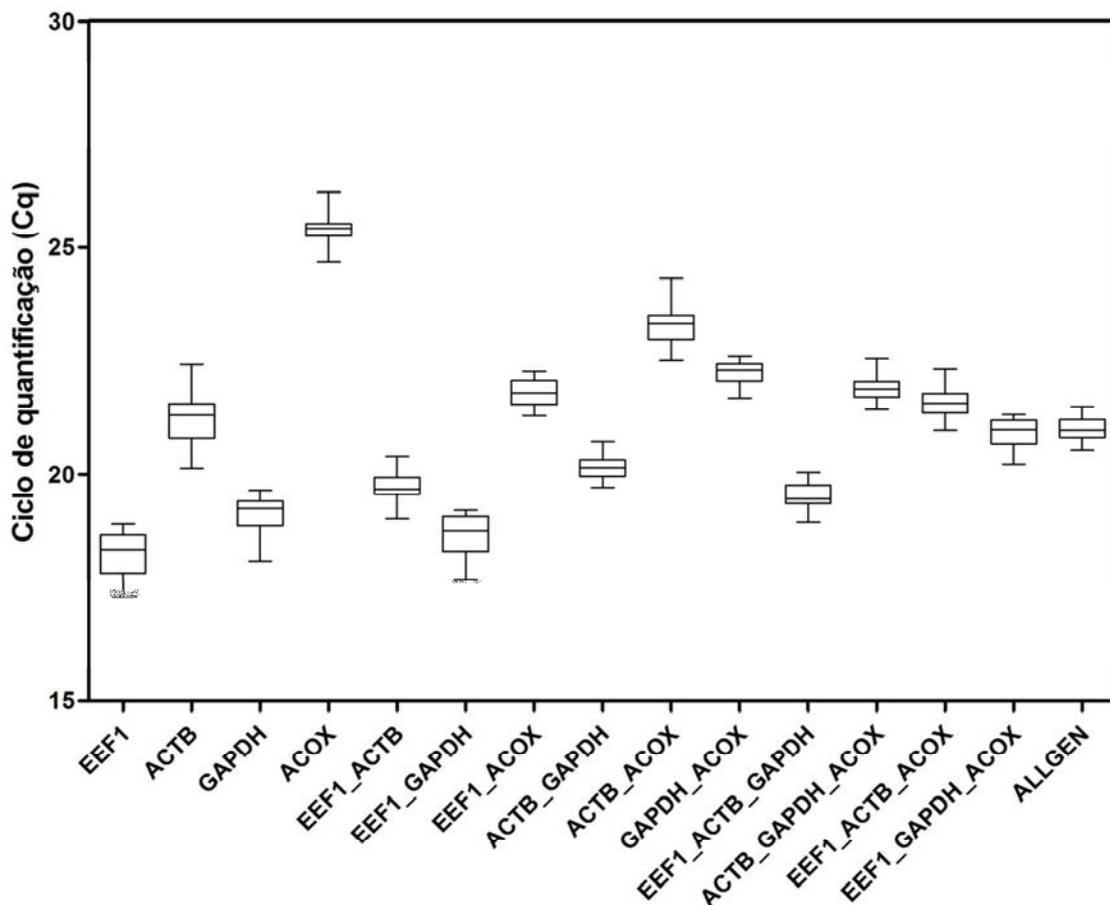
12        De acordo com dados apresentados, verificou-se que 40% dos cDNAs  
13        clonados do pacu apresentou maior similaridade com sequências de *Astyanax*  
14        *mexicanus*, que, à semelhança do pacu, pertence a ordem dos Characiformes. É  
15        importante salientar que os outros 60% também apresentaram alto grau de  
16        semelhança com sequências de espécies taxonomicamente relacionadas a esta  
17        ordem. Todos os transcritos clonados neste estudo apresentaram elevado grau de  
18        identidade de aminoácidos (acima de 87%) com as sequências depositadas no  
19        *Genbank*.

20

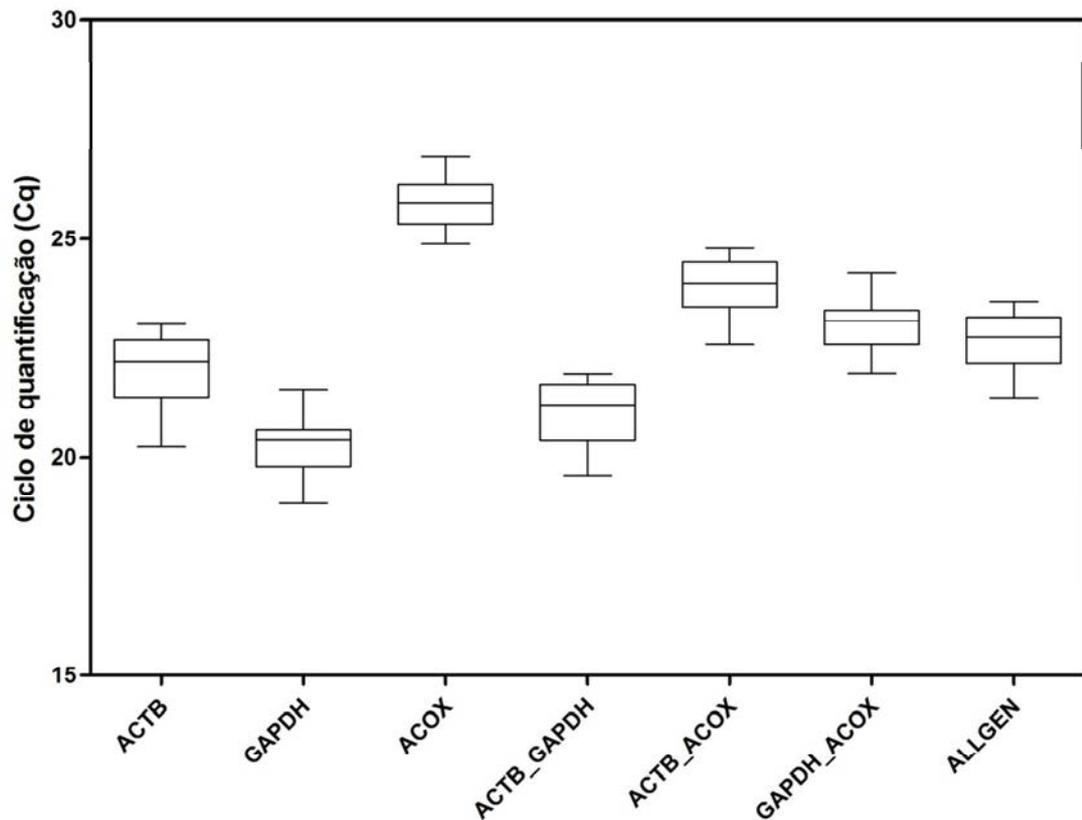
#### 21        **3.2. Perfis de expressão dos genes de referência**

22        Os valores de ciclo de quantificação (Cq) obtidos a partir dos dois ensaios de  
23        qPCR foram extraídos do programa RQ Manager 1.2.1 (Applied Biosystems) e  
24        representados em gráficos de caixa (boxplot), conforme demonstrado nas  
25        Figuras 1 e 2, respectivamente. No caso do experimento 1, verificou-se uma

- 1 expressão elevada dos genes *EEF1-A* e *GAPDH* (menores valores de *C<sub>q</sub>*) (Figura
- 2 1). Para o experimento 2, verificou-se maiores taxas de expressão para os genes
- 3 *ACTB* e *GAPDH* (Figura 2).



- 4
- 5 **Figura 1.** Variação dos valores de ciclo de quantificação (*C<sub>q</sub>*) dos genes candidatos a genes de
- 6 referência em amostras de RNA de fígado de pacu, para o experimento 1 (n=10). Os valores
- 7 correspondem as médias dos Cts do qPCR. As caixas representam os percentis 25% e 75%,
- 8 enquanto as barras representam o desvio padrão da média.



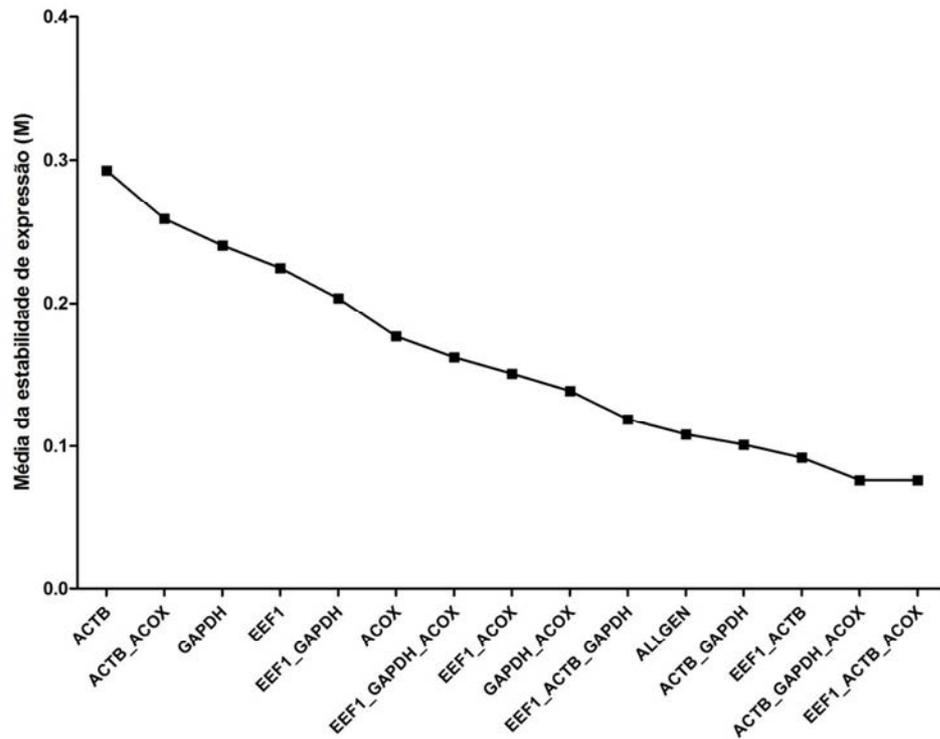
1

2 **Figura 2.** Variação dos valores de ciclo de quantificação (Cq) dos genes candidatos a genes de  
 3 referência em amostras de RNAm de fígado de pacus, para o experimento 2 (n=10). Os valores  
 4 correspondem as médias dos Cqs do qPCR. As caixas representam os percentis 25% e 75%,  
 5 enquanto as barras representam o desvio padrão da média.

6

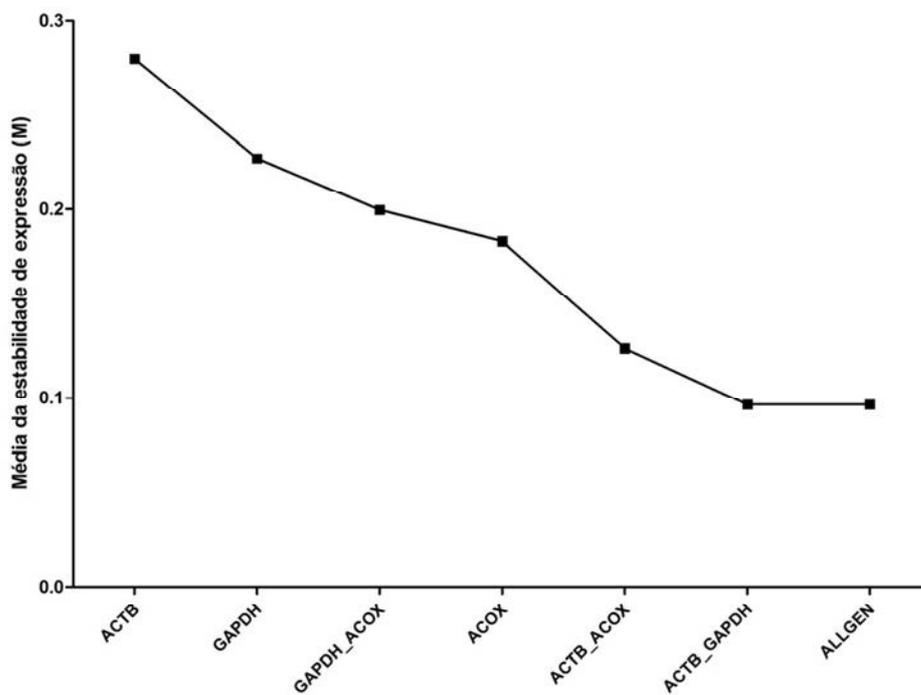
### 7 **3.3. Classificação de genes de referência de acordo com a estabilidade** 8 **de expressão**

9 O software *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) fornece uma classificação dos  
 10 genes testados baseada na sua estabilidade de expressão (M), que consiste na  
 11 variação média pareada de um determinado gene com todos os outros genes de  
 12 controle. Valores de M inferiores a 0,5 são tipicamente observados para genes  
 13 expressos de maneira estável (Hellemans *et al.*, 2007). As médias de estabilidade  
 14 de expressão (M) para os genes de referência estudados nos experimentos 1 e 2  
 15 são apresentados nas figuras 3 e 4, respectivamente. Observou-se que as  
 16 combinações de genes mais estáveis expressos no fígado de pacus foram: ACTB,  
 17 GAPDH e ACOX3 e EEF1-A, ACTB e ACOX3, no experimento 1, e ACTB e  
 18 GAPDH e ACTB, GAPDH e ACOX, no experimento 2.



1

2 **Figura 3.** Médias das estabilidades de expressão (M) dos candidatos a genes de referência  
 3 calculados pelo *geNorm*, para o experimento 1.



4

5 **Figura 4.** Médias das estabilidades de expressão (M) dos candidatos a genes de referência  
 6 calculados pelo *geNorm*, para o experimento 2.

7

1 O *Normfinder* (Andersen *et al.*, 2004) emprega uma abordagem baseada em  
2 um modelo que, além da variação dos níveis de expressão, também leva em  
3 consideração as variações intra- e intergrupos dos genes candidatos a avaliação  
4 da estabilidade de expressão. Utilizando este algoritmo, verificou-se que o  
5 agrupamento de todos os genes: ACTB, GAPDH, EEF1-A e ACOX3 (Tabela 4) e  
6 ACTB, GAPDH e ACOX3 (Tabela 5) apresentaram maior estabilidade, para o  
7 experimento 1 e 2, respectivamente.

8 Apesar dos softwares *geNorm* e *Normfinder* serem extensivamente utilizados  
9 em análises de quantificação relativa dos dados de qPCR, estes algoritmos não  
10 apresentam flexibilidade e propriedades estatísticas para a realização de  
11 inferências válidas em diversas situações experimentais. Neste sentido, Steibel *et*  
12 *al.* (2009) apresentaram um novo método para análises destes dados, que  
13 consiste na análise dos valores de Cq para os genes alvo e referência, utilizando  
14 a metodologia de modelos lineares mistos. De acordo com os autores, este  
15 método possui maior precisão e flexibilidade estatística, sendo especialmente útil  
16 em estudos envolvendo múltiplos fatores ambientais e delineamentos  
17 experimentais complexos.

18 As combinações de genes-referência de maior estabilidade, de acordo com o  
19 método de modelo linear misto foram ACTB, GAPDH, EEF1-A e ACOX3, no  
20 experimento 1 (Tabela 4), e ACTB, GAPDH e ACOX3 no experimento 2 (Tabela  
21 5). A comparação dos dados resumidos, apresentados nas Tabelas 4 e 5,  
22 mostram que os resultados fornecidos pelo *geNorm*, *Normfinder* e a metodologia  
23 de modelo linear misto apresentaram algumas diferenças na classificação dos  
24 genes, mas um consenso pôde ser obtido. A combinação mais adequada de  
25 genes de referência para normalização no experimento 1 foi a combinação ACTB,  
26 GAPDH, EEF1-A e ACOX3, e a combinação ACTB, GAPDH e ACOX3 para o  
27 experimento 2. Neste ponto é importante salientar que os genes ACTB e GAPDH,  
28 frequentemente utilizados individualmente como genes de controle interno,  
29 apresentaram as piores classificações, independente do experimento, sugerindo  
30 que estes genes podem ser inadequados em determinados estudos de  
31 expressão.

1

2 **Tabela 4.** Classificação dos genes candidatos a genes de referência, de acordo com seu valor de estabilidade utilizando *geNorm*,  
 3 *Normfinder* e o modelo linear misto (Experimento 1).

| Experimento 1   |                                    |      |      |           |                      |    |        |      |            |      |          |                 |
|-----------------|------------------------------------|------|------|-----------|----------------------|----|--------|------|------------|------|----------|-----------------|
| Normalizador    | Modelo linear misto_ termo de erro |      |      |           |                      |    | Genorm |      | Normfinder |      | Consenso |                 |
| Gene            | Valor de P                         | Vrep | Vres | Rank Vres | Rank Vres+Valor de P |    | VE     | Rank | VE         | Rank | Rank     | Rank Valor de P |
| ACOX            | 0,2775                             | ns   | 0,00 | 0,09      | 13                   | 6  | 0,18   | 9    | 0,22       | 8    | 9        | 5               |
| ALLGEN          | 0,2892                             | ns   | 0,01 | 0,05      | 4                    | 1  | 0,11   | 4    | 0,04       | 1    | 1        | 1               |
| ACTB            | <,0001                             | *    | 0,00 | 0,12      | 15                   | -- | 0,29   | 14   | 0,54       | 12   | 13       | --              |
| ACTB+ACOX       | 0,0008                             | *    | 0,00 | 0,09      | 12                   | -- | 0,26   | 13   | 0,33       | 9    | 11       | --              |
| ACTB+GAPDH      | 0,0266                             | *    | 0,01 | 0,05      | 2                    | -- | 0,10   | 3    | 0,12       | 6    | 2        | --              |
| ACTB+GAPDH+ACOX | 0,1226                             | ns   | 0,01 | 0,05      | 5                    | 2  | 0,08   | 1    | 0,10       | 3    | 1        | 1               |
| EEF1            | <,0001                             | *    | 0,02 | 0,09      | 14                   | -- | 0,22   | 11   | 0,35       | 10   | 12       | --              |
| EEF1+ACOX       | 0,086                              | ns   | 0,01 | 0,07      | 9                    | 3  | 0,15   | 7    | 0,12       | 6    | 7        | 4               |
| EEF1+ACTB       | 0,055                              | ns   | 0,01 | 0,07      | 11                   | 5  | 0,09   | 2    | 0,11       | 5    | 6        | 3               |
| EEF1+ACTB+ACOX  | 0,1837                             | ns   | 0,01 | 0,07      | 10                   | 4  | 0,08   | 1    | 0,10       | 4    | 5        | 2               |
| EEF1+ACTB+GAPDH | 0,0444                             | *    | 0,01 | 0,05      | 6                    | -- | 0,12   | 5    | 0,04       | 2    | 4        | --              |
| EEF1+GAPDH      | <,0001                             | *    | 0,01 | 0,06      | 8                    | -- | 0,20   | 10   | 0,33       | 9    | 8        | --              |
| EEF1+GAPDH+ACOX | 0,0018                             | *    | 0,01 | 0,05      | 3                    | -- | 0,16   | 8    | 0,17       | 7    | 6        | --              |
| GAPDH           | <,0001                             | *    | 0,00 | 0,06      | 7                    | -- | 0,24   | 12   | 0,35       | 11   | 10       | --              |
| GAPDH+ACOX      | 0,0402                             | *    | 0,01 | 0,04      | 1                    | -- | 0,14   | 6    | 0,11       | 5    | 3        | --              |

Vrep = Variância das repetições;

Vres = Variância do resíduo (Termo do erro experimental);

Rank Vres = Classificação com base na variância do resíduo;

Rank Vres+Valor de P = Classificação com base na variância do resíduo, excluindo-se os normalizadores com diferença significativa entre tratamentos;

VE = Valor de estabilidade, sendo que a maior estabilidade é indicada pelos menores valores de VE.

1

2 **Tabela 5.** Classificação dos genes candidatos a genes de referência, de acordo com seu valor de estabilidade utilizando *geNorm*,  
 3 *Normfinder* e o modelo linear misto (Experimento 2).

| Experimento 2 |                                    |      |      |           |                      |        |      |            |      |          |             |    |
|---------------|------------------------------------|------|------|-----------|----------------------|--------|------|------------|------|----------|-------------|----|
| Normalizador  | Modelo linear misto_ termo de erro |      |      |           |                      | Genorm |      | Normfinder |      | Consenso |             |    |
| Gene          | Valor de P                         | Vrep | Vres | Rank Vres | Rank Vres+Valor de P | VE     | Rank | VE         | Rank | Rank     | Rank_Pvalue |    |
| ACOX          | 0,1205                             | ns   | 0,00 | 0,24      | 1                    | 1      | 0,18 | 3          | 0,20 | 5        | 3           | 3  |
| ALLGEN        | 0,0931                             | ns   | 0,04 | 0,26      | 3                    | 3      | 0,10 | 1          | 0,05 | 1        | 1           | 1  |
| ACTB          | 0,0013                             | *    | 0,01 | 0,35      | 7                    | --     | 0,28 | 6          | 0,42 | 7        | 6           | -- |
| ACTB+ACOX     | 0,0146                             | *    | 0,01 | 0,27      | 4                    | --     | 0,13 | 2          | 0,12 | 3        | 3           | -- |
| ACTB+GAPDH    | 0,0668                             | ns   | 0,06 | 0,29      | 5                    | 5      | 0,10 | 1          | 0,05 | 2        | 2           | 2  |
| GAPDH         | 0,6542                             | ns   | 0,11 | 0,31      | 6                    | 6      | 0,23 | 5          | 0,30 | 6        | 5           | 5  |
| GAPDH+ACOX    | 0,3431                             | ns   | 0,05 | 0,26      | 2                    | 2      | 0,20 | 4          | 0,19 | 4        | 4           | 4  |

Vrep = Variância das repetições;

Vres = Variância do resíduo; (Termo do erro experimental);

Rank Vres = Classificação com base na variância do resíduo;

Rank Vres+Valor de P = Classificação com base na variância do resíduo, excluindo-se os normalizadores com diferença significativa entre tratamentos;

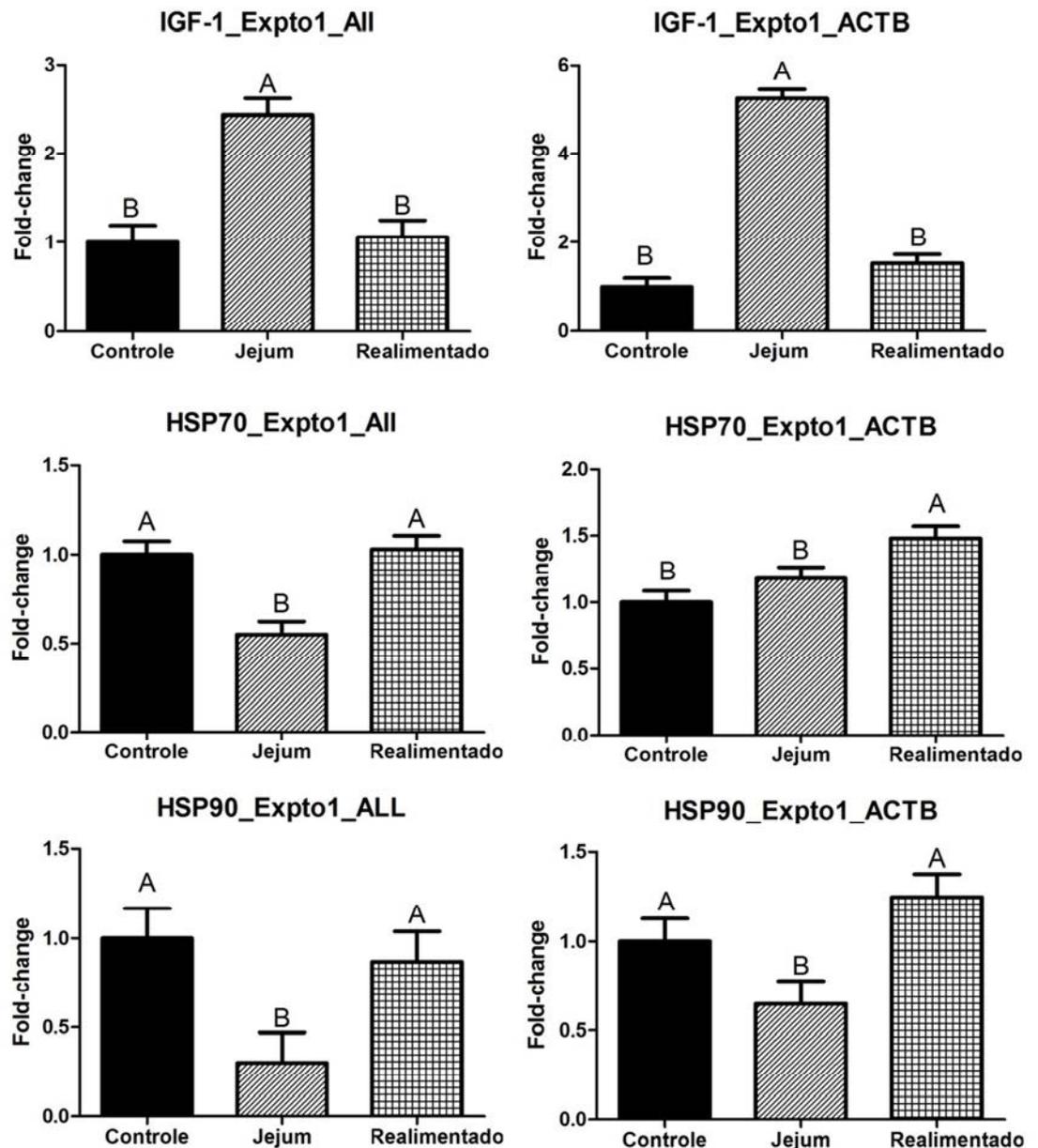
VE = Valor de estabilidade, sendo que a maior estabilidade é indicada pelos menores valores de VE.

4

### 1        **3.4. Validação dos genes de referência e quantificação relativa em tempo** 2        **real dos genes alvo**

3        Para investigar o desempenho dos genes de referência selecionados, e os  
4        mecanismos envolvidos na privação alimentar prolongada, os níveis de  
5        transcrição de três genes-alvo (IGF-1, HSP70 e HSP90) foram mensurados em  
6        dois ensaios, e em três diferentes condições experimentais: animais  
7        continuamente alimentados (Controle), submetidos a um período de jejum por 21  
8        dias (Jejum) e em jejum por 21 dias e realimentados durante 7 dias  
9        (Realimentado). Para isso foram utilizadas as combinações de genes mais  
10       estáveis e os genes de referência de menor estabilidade, de acordo com sua  
11       classificação consenso (Tabelas 4 e 5).

12       Os efeitos da normalização utilizando a melhor combinação de genes e o pior  
13       gene de referência individual, no experimento 1, são apresentados na Figura 5.  
14       Não foram verificadas diferenças estatísticas entre a normalização utilizando a  
15       combinação GAPDH, ACTB, ACOX3 e EEF1-A ou somente ACTB, para os  
16       genes-alvo IGF-1 e HSP90, embora as magnitudes das diferenças tenham se  
17       apresentado de maneira distinta. Entretanto, para a HSP70, a utilização de um  
18       único gene de referência (ACTB) como normalizador dos dados de expressão  
19       promoveu uma interpretação diferente dos resultados, quando comparada com a  
20       normalização utilizando a combinação de genes com maior estabilidade.

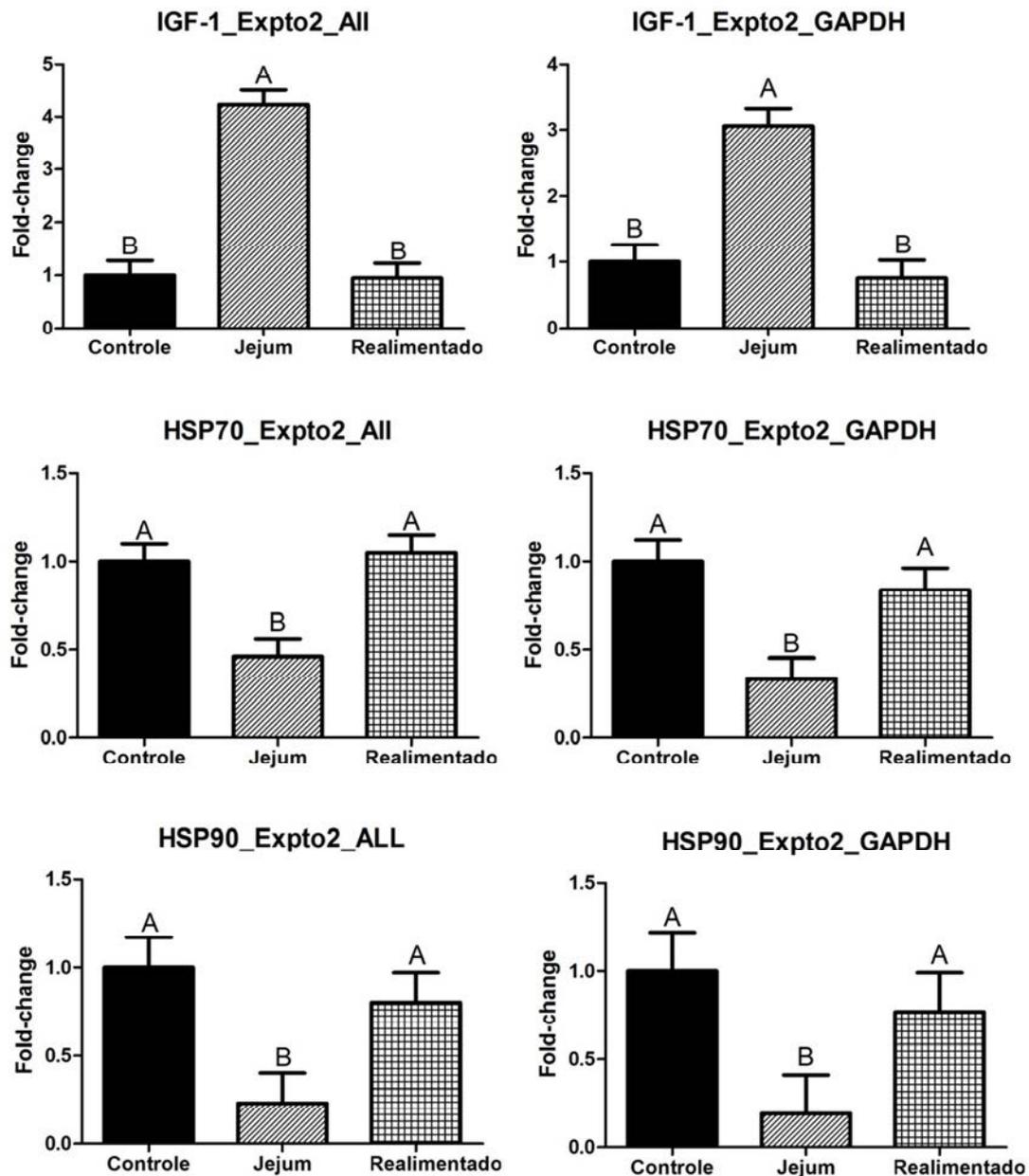


1

2 **Figura 5.** Efeitos da normalização na expressão de RNAm de IGF-1, HSP70 e HSP90 no fígado  
 3 de pacu (Experimento 1). Os dados são expressos como *fold-change* em relação ao tratamento  
 4 controle. As barras de erro correspondem aos valores de  $\Delta\Delta Cq$ . Letras diferentes indicam  
 5 diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

6

7 Os efeitos da normalização nos dados de expressão de RNAm no fígado de  
 8 pacu, referentes ao experimento 2, são apresentados na Figura 6. Neste caso,  
 9 não foram observadas diferenças nos perfis de expressão entre a normalização  
 10 com a combinação de melhor estabilidade (ACTB, GAPDH e ACOX3) em relação  
 11 a um dos genes individuais de menor estabilidade (GAPDH), embora as  
 12 magnitudes das diferenças tenham sido diferentes.



1

2 **Figura 6.** Efeitos da normalização na expressão de RNAm de IGF-1, HSP70 e HSP90 no fígado  
 3 de pacu (Experimento 2). Os dados são expressos como *fold-change* em relação ao tratamento  
 4 controle. As barras de erro correspondem aos valores de  $\Delta\Delta Cq$ . Letras diferentes indicam  
 5 diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

6

#### 7 **4. Discussão**

8 No presente trabalho, foram clonados, sequenciados e caracterizados sete  
 9 transcritos isolados do fígado de pacu (Tabela 3), seis dos quais correspondem a  
 10 transcritos que ainda não tinham sido previamente caracterizados para esta  
 11 espécie. Destas, duas correspondem a proteínas de choque térmico (HSP70 e  
 12 HSP90), duas sequências parciais de enzimas participantes do metabolismo

1 (ACOX3 e GAPDH), uma sequência parcial da proteína filamentosa  $\beta$ -actina  
2 (ACTB) e uma do fator de alongação de síntese proteica (EEF1-A). A sétima  
3 sequência corresponde a um fragmento de 414 pares de bases que cobre a maior  
4 parte da sequência de aminoácidos do peptídeo maduro do IGF-1 de peixes.

5 Em qualquer ensaio de quantificação relativa em qPCR, o propósito da  
6 normalização consiste em remover as diferenças de amostragem, tais como  
7 quantidade e integridade do RNA, com a finalidade de identificar as variações  
8 específicas reais dos genes avaliados (Matouskova' *et al.*, 2014). No caso dos  
9 genes de controle interno, essa variação deve ser mínima ou nula. A identificação  
10 e escolha de genes endógenos adequados é um passo crucial em análises de  
11 expressão gênica, uma vez que a utilização de um gene instável para a  
12 normalização pode resultar em conclusões equivocadas (Yang *et al.*, 2014).

13 Embora o pacu, uma espécie nativa de grande interesse comercial, venha  
14 sendo utilizado em uma quantidade expressiva de estudos de expressão gênica  
15 (Almeida *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010, Leitão *et al.*, 2011, Paula *et al.*, 2014),  
16 a existência de sequências de nucleotídeos caracterizadas disponíveis de genes  
17 endógenos para esta espécie são escassas. Almeida *et al.* (2008) utilizaram o  
18 18S RNAr para a normalização em estudo de expressão dos fatores regulatórios  
19 miogênicos (MRFs). Este mesmo gene foi utilizado como normalizador em estudo  
20 posterior de estratégias alimentares na fase larval de pacus realizado por Leitão  
21 *et al.* (2011). Os RNAs ribossomais, como o 18S, são genes de controle bastante  
22 comuns em estudos de expressão gênica, pois são abundantes e necessários em  
23 qualquer tipo de célula (Matouskova' *et al.*, 2014). No entanto, uma vez que o 18S  
24 RNAr não é um RNAm, a dinâmica de degradação pode não ocorrer de maneira  
25 semelhante, indicando que este pode não ser um gene de controle interno ideal  
26 em determinados estudos de expressão gênica (Solanas *et al.*, 2001; Olsvik *et al.*,  
27 2005).

28 Mais recentemente, Paula *et al.* (2014) utilizaram a  $\beta$ -actina citoplasmática  
29 como gene de controle interno para avaliação do perfil de expressão de RNAm de  
30 MRFs em pacus, cultivados sob diferentes temperaturas. O RNAm de ACTB é  
31 expresso ubiquamente nas células e tecidos animais, e utilizado frequentemente  
32 como um gene de referência em estudos com peixes (Ayson *et al.*, 2007; Sinha *et al.*  
33 *et al.*, 2012; Sánchez-Gurmaches *et al.*, 2013; Pujante *et al.*, 2015). Porém, sua

1 expressão pode variar de acordo com o tipo de tecido e o estado fisiológico do  
2 animal, e em determinadas condições experimentais, não é considerado um gene  
3 de referência quantitativo estável (Toegel *et al.*, 2007; Small *et al.*, 2008).

4 Com base nas análises dos genes de referência avaliados no presente estudo  
5 para a quantificação de RNAm, utilizando três programas estatísticos, a  
6 combinação com um maior número de genes: ACTB, GAPDH, EEF1-A e ACOX3,  
7 no caso do experimento 1, e ACTB, GAPDH e ACOX3, no experimento 2,  
8 apresentaram uma melhor estabilidade (Tabelas 4 e 5, respectivamente). A  
9 utilização de um maior número de genes de referência no processo de  
10 normalização dos dados pode aumentar a confiabilidade de um estudo, e diversos  
11 autores sugerem que o número mínimo a ser utilizado neste processo seja de  
12 dois genes-referência (Vandesompele *et al.*, 2002; Matouskova *et al.*, 2014).

13 Em ambos os experimentos, a utilização individual de ACTB ou GAPDH como  
14 genes de controle interno, apresentaram os piores valores de estabilidade. Em  
15 condições de estresse, como de jejum prolongado, os níveis de expressão de  
16 genes participantes de processos metabólicos, como o GAPDH, podem sofrer  
17 flutuações. Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, Small *et al.*  
18 (2008) verificaram que o RNAm de GAPDH e ACTB foram expressos  
19 diferencialmente no fígado de juvenis de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*)  
20 submetidos ao jejum, e quando o GAPDH foi utilizado para normalização dos  
21 dados, ocasionou uma interpretação errônea dos resultados. No presente estudo,  
22 a utilização de ACTB como gene de normalização ocasionou uma interpretação  
23 diferente em relação aos perfis de expressão de HSP70.

24 O sistema GH/IGF-1 possui papel importante na regulação metabólica em  
25 peixes teleósteos, e as alterações no estado nutricional podem afetar  
26 profundamente diversos dos componentes deste sistema (Duan, 2002). A  
27 habilidade do tecido hepático em responder ao GH circulante sofre a modulação  
28 do estado nutricional, sendo que em peixes submetidos ao jejum esse tecido se  
29 torna resistente à sinalização, devido à elevação dos níveis de GH plasmáticos  
30 (Gray *et al.*, 1992).

31 Diversos relatos têm reportado uma correlação positiva entre os níveis  
32 hepáticos de RNAm de IGF-1 e as concentrações plasmáticas deste hormônio,

1 sugerindo que a expressão de RNAm no fígado poderia ser utilizada como um  
2 índice para avaliação do crescimento em peixes (Beckman, 2011). A maioria dos  
3 trabalhos têm demonstrado que a resposta típica de peixes submetidos à privação  
4 alimentar consiste na redução dos níveis plasmáticos e de RNAm hepático de  
5 IGF-1 (Gabillard *et al.*, 2006; Pierce *et al.*, 2005; Picha *et al.*, 2008a,b). Contudo,  
6 existem relatos de relações discordantes entre os níveis hepáticos de RNAm e os  
7 níveis circulantes de IGF-1 (Picha *et al.*, 2006), ou mesmo a inexistência de  
8 qualquer relação entre essas duas variáveis (Uchida *et al.*, 2003). No presente  
9 estudo, observou-se aumento significativo dos níveis de RNAm no fígado de  
10 pacus em jejum, em ambos os ensaios. Este comportamento já foi previamente  
11 reportado em algumas espécies, como *Siganus guttatus*, entre o terceiro e o sexto  
12 dia de jejum (Ayson *et al.*, 2007) e *Seriola quinqueradiata*, entre o terceiro e nono  
13 dia de privação de alimento (Pedroso *et al.*, 2009). Ao final do período de jejum  
14 (21 dias) os níveis hepáticos de RNAm de IGF-1 foram elevados em relação ao  
15 grupo continuamente alimentado, em ambos os experimentos. Entretanto,  
16 verificou-se que a magnitude destas diferenças foi mais acentuada nos peixes  
17 maiores, sugerindo uma relação do tamanho corporal com a quantidade de  
18 transcritos desse gene.

19 Embora não tenham sido quantificados os níveis plasmáticos de GH ou a  
20 capacidade de ligação do seu receptor, o aumento dos níveis de RNAm hepáticos  
21 observados neste estudo permitem levantar a hipótese de que o mecanismo  
22 relacionado à resistência ao GH no tecido hepático de pacu ocorre de maneira  
23 diferente de outras espécies de peixes. A constatação da existência de dois  
24 subtipos de receptores de GH em alguns teleósteos (Jiao *et al.*, 2006) e a  
25 confirmação da participação ativa de um desses subtipos (GHR truncado) no  
26 mecanismo de resistência ao GH, parecem ser determinantes no controle dos  
27 mecanismos celulares GH-dependentes. Entretanto, a existência de mais de um  
28 subtipo de receptor de GH ainda não foi descrita para o pacu e outras espécies de  
29 peixes, sugerindo que o mecanismo de resistência ao GH ocorre de maneira  
30 diferente, o que poderia explicar os resultados contraditórios observados por  
31 Ayson *et al.* (2007) e Pedroso *et al.* (2009), assim como no presente estudo.

32 A HSP70 é essencial na síntese proteica, translocação e dobramento e  
33 desdobramento de proteínas (Kiang e Tsokos, 1998) e, portanto, é fundamental

1 em períodos de rápido *turnover* proteico. No estudo, 21 dias de jejum  
2 promoveram redução dos níveis de RNAm de HSP70 hepático em juvenis de  
3 pacu. Esse comportamento inesperado de redução dos níveis de HSP70 também  
4 foi relatado por Han *et al.* (2012), em larvas de *Acipenser transmontanus*. O  
5 aumento da citoproteção, por meio do aumento da proteotoxicidade, associada ao  
6 aumento do catabolismo proteico, durante o jejum, tem sido sugerido como o  
7 resultado do aumento dos níveis de HSPs observados em larvas de peixes  
8 submetidas à privação alimentar (Cara *et al.* 2005; Yengkokpam *et al.* 2008). Este  
9 mecanismo pode explicar os menores números de transcritos de HSP70 e HSP90  
10 observados nos animais em jejum, pois, de fato, não foi verificada mobilização de  
11 proteínas estruturais no músculo ou fígado de pacus mantidos em jejum ou  
12 continuamente alimentados. Ainda, tais discrepâncias podem ser associadas por  
13 diferenças de respostas entre espécies, tecidos-alvo, condições de cultivo,  
14 duração e intensidade da privação alimentar.

15 Diversos estudos têm relatado que a utilização das HSPs como indicadores de  
16 estresse nutricional em peixes parece ser limitada. Por exemplo, embora o  
17 estresse por choque térmico tenha resultado em elevação dos níveis de RNAm de  
18 HSP70 e HSP90 nas brânquias de larvas de salmão-do-atlântico (*Salmo salar*),  
19 nenhuma alteração na expressão destes genes foi observada em outras formas  
20 de estresse comuns na larvicultura desta espécie, como exposição à anestesia,  
21 formalina, hipóxia, hiperóxia, estresse por captura, densidade de estocagem e  
22 privação alimentar (Zarate e Bradley, 2003).

23 No presente estudo são apresentadas as primeiras comparações  
24 experimentais para validação de genes de referência para a normalização de  
25 dados de expressão de RNAm em qPCR para o pacu. O uso combinado de três  
26 (ACTB, GAPDH e ACOX3), ou quatro (ACTB, GAPDH, EF1- $\alpha$ , ACOX3) genes  
27 endógenos foi classificado como sendo o ideal para normalização nas condições  
28 experimentais propostas. Os dados apresentados evidenciam a necessidade da  
29 avaliação da estabilidade de expressão em diferentes condições experimentais.  
30 Os genes de referência clonados, sequenciados e validados poderão ser  
31 utilizados em estudos futuros de expressão gênica para esta espécie.

32

1        **5. Referências**

- 2        ACKERMAN, P.A.; IWAMA, G.K. Physiological and cellular stress responses of juvenile  
3        rainbow trout to vibriosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, p.173-180, 2001.
- 4        ALMEIDA, F.L.A., CARVALHO, R.F., PINHAL, D., PADOVANI, C.R., MARTINS, C., DAL PAI-  
5        SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle  
6        (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during  
7        juvenile and adult growth phases. **Micron**, v.39, p.1306–1311, 2008.
- 8        ALMEIDA, F.L.A., PESSOTI, N.S., PINHAL, D., PADOVANI, C.R., LEITÃO, N.J., CARVALHO,  
9        R.F., MARTINS, C., PORTELLA, M.C., DAL PAI-SILVA, M. Quantitative expression of  
10        myogenic regulatory factors myoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal  
11        muscle during growth. **Micron**, v.41, p.997–1004, 2010.
- 12        ANDERSEN, C.; JENSEN, J.; ØRNTOF, T. Normalization of real-time quantitative reverse  
13        transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited  
14        for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.6,  
15        p.5245–5250, 2004.
- 16        ANTONOPOULOU, E.; KENTEPOZIDOU, E.; FEIDANTISIS, K.; ROUFIDOU, C.; DESPOTI,  
17        S.; CHATZIFOTIS, S. Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and  
18        antioxidant enzymes activity of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative**  
19        **Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 165, p. 79-88, 2013.
- 20        AYSON, F.G., DE JESUS-AYSON, E.G.T., TAKEMURA, A. mRNA expression patterns for  
21        GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II during altered feeding status in rabbit fish, *Siganus guttatus*.  
22        **General and Comparative Endocrinology**, 150, 196–204, 2007.
- 23        BAS, A.; FORSBERG, G.; HAMMARSTROM, S.; HAMMARSTROM, M. L. Utility of the  
24        Housekeeping Genes 18S rRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase  
25        for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase- Polymerase Chain  
26        Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. **Scandinavian journal of**  
27        **immunology**, v.59, p.566–573, 2004.
- 28        BECKMAN, B.R. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like  
29        growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. **General and Comparative Endocrinology**,  
30        v.170, p.233–252, 2011.
- 31        BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J., et al. The MIQE  
32        Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.  
33        **Clinical Chemistry**, v.55, p.611–622, 2009.
- 34        CARA, J.B.; ALURU, N.; MOYANO, F.J.; VIJAYAN, M.M. Food deprivation induces hsp70 and  
35        hsp90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. **Comparative**  
36        **Biochemistry and Physiology, Part B**, v.142, p. 426–431, 2005.
- 37        CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F. Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu,  
38        *Colossoma mitrei* – Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 5, n.1, p.1-2,  
39        único, 1985.
- 40        CARY, N. SAS Institute Inc. **USA, SAS for Windows Release**, v. 8, 2002.
- 41        CICINNATI, V.R.; SHEN, Q.; SOTIROPOULOS, G.C.; RADTKE, A.; GERKEN, G., et al.  
42        Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular  
43        carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. **BMC cancer**, v.8, 350, 2008.
- 44        COUSSENS, P. M.; COLVIN, C. J.; ROSA, G. J. M.; LASPIUR, J. P.; ELFTMAN, M. D.  
45        Evidence for a Novel Gene Blood Expression Program in Peripheral Mononuclear Cells from  
46        *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Cattle. **Infection and Immunity**, v.  
47        71, n. 11, p. 6487–6498, 2003.

- 1 DEANE, E.E.; WOO, N.Y.S. Evidence for disruption of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and hsp70 during  
2 vibriosis of sea bream (*Sparus (=Rhabdosargus) sarba*). **Journal of Fish Disease**, v. 28,  
3 p.239–251, 2005.
- 4 DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene  
5 expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v.50, p.227–230, 2010.
- 6 DUAN, C., 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF binding  
7 proteins. *J. Endocrinol.* 175, 41–54.
- 8 FOX, B. K.; RILEY, L.G.; HIRANO, T.; GRAU, E. G. Effects of fasting on growth hormone,  
9 growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia,  
10 *Oreochromis mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v.148, p. 340–347,  
11 2006.
- 12 GABILLARD, J.C.; KAMANGAR, B.B.; MONTSERRAT, N. Coordinated regulation of the  
13 GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of**  
14 **Endocrinology**, v. 191, p. 15–24, 2006.
- 15 GRAY, E.S.; KELLEY, K.M.; LAW, S.; TSAI, R.; YOUNG, G.; BERN, H.A. Regulation of  
16 hepatic growth hormone receptors in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **General and**  
17 **comparative endocrinology**, v.88, p.243-252, 1992.
- 18 HAN, D., HUANG, S.S.Y., WANG, W.-F., DENG, D.-F, HUNG, S.S.O. Starvation reduces the  
19 heat shock protein responses in white sturgeon larvae. **Environ. Biol. Fish**, 93:333–342,  
20 2012.
- 21 HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J.  
22 qBase relative quantification framework and software for management and automated  
23 analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v.8, 2007.
- 24 HEVRØY, E.M.; AZPELETA, C.; SHIMIZU, M.; LANZÉN, A.; KAIYA, H.; ESPE, M.; OLSVIK,  
25 P. A. Effects of short-term starvation on ghrelin, GH-IGF system, and IGF-binding proteins in  
26 Atlantic salmon. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.37, p.217-232, 2011.
- 27 HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalization:  
28 strategies and considerations. **Genes and immunity**, v.6, p.279–284, 2005.
- 29 JIAO, B.; HUANG, X.; CHAN, C. C.; ZHANG, I.; WANG, D.; CHENG, C. H. K. The co-  
30 existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal  
31 transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. **Journal**  
32 **of Molecular Endocrinology**, v.36, p.23-40, 2006.
- 33 KIANG, J.G., TSOKOS, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and  
34 physiology. **Pharmacology Therapy**, v.80, p.183–201,1998.
- 35 KONDO, H.; HARANO, R.; NAKAYA, M.; WATABE, S. Characterization of goldfish heat shock  
36 protein–30 induced upon severe heat shock in cultured cells. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9  
37 (4), p. 350–358, 2004.
- 38 KOSIR, R.; ACIMOVIC, J.; GOLICNIK, M.; PERSE, M.; MAJDIC, G., et al. Determination of  
39 reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains. **BMC molecular**  
40 **biology**, v.11, p.60, 2010.
- 41 LEITÃO, N. J.; PAI-SILVA, M. D.; ALMEIDA, F. L. A.; PORTELLA, M. C. The influence of  
42 initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae.  
43 **Aquaculture**, v.315, p.78–85, 2011.
- 44 LIVARK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time  
45 quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C (T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408,  
46 2001.
- 47 MACKENZIE, D.S.; VANPUTTE, C.M.; LEINER, K.A. Nutrient regulation of endocrine function  
48 in fish. **Aquaculture**, v. 161, p. 3–25, 1998.

- 1 MATOUSKOVÁ, P.; BÁRTÍKOVÁ, H.; BOUSOVÁ, I.; HANUSOVÁ, SZOTÁKOVÁ, B.;  
2 SKÁLOVÁ, L. Reference Genes for Real-Time PCR Quantification of Messenger RNAs and  
3 MicroRNAs in Mouse Model of Obesity. **PLOS ONE**, v.9, n.1, e86033, 2014.
- 4 OLSVIK, P.; LIE, K.; JORDAL, A.E.; NILSEN, T.; HORDVIK, I. Evaluation of potential  
5 reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. **BMC Molecular Biology**,  
6 v.6, 21, 2005.
- 7 PAULA, T.G.; ALMEIDA, F.L.A.; CARANI, F.R.; VECHETTI-JÚNIOR, I.J.; PADOVANI, C.R.;  
8 SALOMÃO, R.A.S.; MARECO, E. A.; SANTOS, V.B.; DAL-PAI-SILVA, M. Rearing  
9 temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu  
10 (*Piaractus mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.169,  
11 p.31–37, 2014.
- 12 PEDROSO, F.L., DE JESUS-AYSON, E.G.T., CORTADO, H.H., HYODO, S., AYSON, F.G.  
13 Changes in mRNA expression of grouper (*Epinephelus coioides*) growth hormone and insulin-  
14 like growth factor I in response to nutritional status. **General and Comparative**  
15 **Endocrinology** 145, 237–246, 2006.
- 16 PEREZ, J.C.; AFONSO, L.O.B.; JOHNSON, S.C.; CURRIE, S.; GAMPERL, A.K. The stress  
17 and metabolic responses of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal  
18 challenge. **Journal of Fish Biology**, v.72, p. 899–916, 2008.
- 19 PETERSON, B.C.; WALDBIESER, G.C. Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding  
20 protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic animal**  
21 **endocrinology**, v.37, p.74-83, 2009.
- 22 PICHA, M.E., SILVERSTEIN, J.T., BORSKI, R.J. Discordant regulation of hepatic IGF-I mRNA  
23 and circulating IGF-I during compensatory growth in a telost, the hybrid striped bass (*Morone*  
24 *chrysops* x *Morone saxatilis*). **General Comparative Endocrinology**, v.147, p.196–205,  
25 2006.
- 26 PICHA, M.E.; TURANO, M.J.; TIPSMARK, C.K.; BORSKI, R.J. Regulation of endocrine and  
27 paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory growth in hybrid striped bass  
28 (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Journal of Endocrinology**, v.199, p.81-94, 2008a.
- 29 PICHA, M.E., TURANO, M.J., BECKMAN, B.R., BORSKI, R.J. Endocrine biomarkers of  
30 growth and applications to aquaculture: A minireview of growth hormone, insulin-like growth  
31 factor (IGF)-I, and IGF-Binding proteins as potential growth indicators in fish. **North American**  
32 **Journal of Aquaculture**, v.70, p.196–211, 2008b.
- 33 PIERCE, A.L.; SHIMIZU, M.; BECKMAN, B.R.; BAKER, D.M.; DICKHOFF, W.W. Time course  
34 of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in Chinook salmon  
35 (*Oncorhynchus tshawytscha*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 140, p. 192–  
36 202, 2005.
- 37 PUJANTE, I.M.; MARTOS-SITCHA, J. A.; MOYANO, F.J.; RUIZ-JARABO, I.; MARTÍNEZ-  
38 RODRÍGUEZ, G.; MANCERA, J. M. Starving/re-feeding processes induce metabolic  
39 modifications in thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). **Comparative**  
40 **Biochemistry and Physiology, Part B**, v.180, p.57-67, 2015.
- 41 RADONIC´, A.; THULKE, S.; MACKAY, I.M.; LANDT, O.; SIEGERT, W., et al. Guideline to  
42 reference gene selection for quantitative real-time PCR. **Biochemical and biophysical**  
43 **research communications**, v.313, p.856–862, 2004.
- 44 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning, a laboratory manual**, 2  
45 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 46 SÁNCHEZ-GURMACHES, J.; CRUZ-GARCIA, L.; IBARZ, A.; FERNÁNDEZ-BORRÁS, J.;  
47 BLASCO, J.; GUTIÉRREZ, J. Insulin, IGF-I, and muscle MAPK pathway responses after  
48 sustained exercise and their contribution to growth and lipid metabolism regulation in gilthead  
49 sea bream. **Domestic Animal Endocrinology**, v.45, p.145–153, 2013.

- 1 SCHMITTGEN, T.D.; ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping  
2 gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and**  
3 **Biophysical Methods**, v.46, p.69–81, 2000.
- 4 SINHA, A.K.; DIRICX, M.; CHAN, L.P.; LIEW, H.J.; KUMAR, V.; BLUST, R.; De BOECK, G.  
5 Expression pattern of potential biomarker genes related to growth, ion regulation and stress in  
6 response to ammonia exposure, food deprivation and exercise in common carp (*Cyprinus*  
7 *carpio*). **Aquatic Toxicology**, v.122-123, p.93-105, 2012.
- 8 SMALL, B. C.; PETERSON, B. C. Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for  
9 measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma  
10 concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel  
11 catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic animal endocrinology**, v. 28, p.202–215, 2005.
- 12 SMALL, B.C.; MURDOCK, C.A.; BILODEAU-BOURGEOIS, A.L.; PETERSON, B.C.;  
13 WALDBIESER, G.C. Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish  
14 (*Ictalurus punctatus*) tissues under varying physiological conditions. **Comparative**  
15 **Biochemistry and Physiology, Part B**, v.151, p.296–304, 2008.
- 16 SOLANAS, M.; MORAL, R.; ESCRICH, E. Unsuitability of using ribosomal RNA as loading  
17 control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal  
18 RNA content in rat mammary tumors. **Analytical Biochemistry**, v.288, p.99–102, 2001.
- 19 STEIBEL, J.P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P.M.; ROSA, G.J.M. A powerful and flexible  
20 linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data.  
21 **Genomics**, v.94, p.146–152, 2009.
- 22 THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAN, B.; COUMANS, B., et al. Housekeeping  
23 genes as internal standards: use and limits. **Journal of biotechnology**, v.75, p.291–295,  
24 1999.
- 25 THISSEN, J.P.; UNDERWOOD, L. E.; KETELSLEGERS, J. M. Regulation of insulin-like  
26 growth factor-I in starvation and injury. **Nutrition reviews**, v.57, n.6, p. 167-176, 1999.
- 27 TOEGEL, S.; HUANG, W.; PIANA, C.; UNGER, F.M.; WIRTH, M.; GOLDRING, M.B.; GABOR,  
28 F.; VIERNSTEIN, H. Selection of reliable reference genes for qPCR studies on  
29 chondroprotective action. *BMC Molecular Biology*, v.8, 13, 2007.
- 30 UCHIDA, K.; KAJIMURA, S.; RILEY, L.G.; HIRANO, T.; AINDA, K.; GRAU, E.G. Effects of  
31 fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis*  
32 *mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.134, p.429–439, 2003.
- 33 VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N. *et al.*  
34 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of  
35 multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3: research0034.1–11, 2002.
- 36 VERMA, A.K.; PAL, A.K.; MANUSH, S.M.; DAS, T.; DALVI, R.S.; CHANDRACHOODAN, P.P.;  
37 RAVI, P.M.; APTE, S.K. Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature  
38 induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings. **Fish & Shellfish**  
39 **Immunology**, v. 22 (5), p. 547–555, 2007.
- 40 WEBER, T. E.; BOSWORTH, B. G. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed  
41 restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth  
42 and metabolism in channel catfish. **Aquaculture**, v. 246, p. 483–492, 2005.
- 43 WOOD, A.W.; DUAN, C.; BERN, H. A. Insulin-like growth factor signaling in fish. **International**  
44 **Review of Cytology**, v. 243, p. 215–285, 2005.
- 45 YANG, Q.; LI, Z.; CAO, J.; ZHANG, S.; ZHANG, H.; WU, X.; ZHANG, Q.; LIU, X. Selection and  
46 Assessment of Reference Genes for Quantitative PCR Normalization in Migratory Locust  
47 *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). **PLOS ONE**, v.9., n.6, e98164, 2014.

- 1 YENGGOKPAM, S., PAL, A.K., SAHU, N.P., JAIN, K.K., DALVI, R., MISRA, S., DEBNATH, D.
- 2 Metabolic modulation in *Labeo rohita* fingerlings during starvation: Hsp70 expression and
- 3 oxygen consumption. **Aquaculture**, v.285, p.234-237, 2008.
- 4 YOUNG, J.C.; MOAREFI, I.; HARTL, F.U. Hsp90: A specialized but essential protein-folding
- 5 tool. **Journal of Cell Biology**, v.154, p.267–273, 2001.
- 6 ZARATE, J.; BRADLEY, T.M. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery
- 7 stress in salmon. **Aquaculture**, v. 223, p. 175–187, 2003.
- 8 ZHANG, X.; PANG, H.; WU, Z.; JIAN, J. Molecular characterization of heat shock protein 70
- 9 gene transcripts during *Vibrio harveyi* infection of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*.
- 10 **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p.897–910, 2011.