

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INDICADORES FISIOLÓGICOS DE ESTRESSE E
EXPRESSÃO DO GENE *hsp70* EM JUVENIS DO PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) APÓS IMPLANTE DE CORTISOL**

Luis Evert Enriquez Benavides

Jaboticabal, São Paulo

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INDICADORES FISIOLÓGICOS DE ESTRESSE E
EXPRESSÃO DO GENE *hsp70* EM JUVENIS DO PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) APÓS IMPLANTE DE CORTISOL**

Luis Evert Enriquez Benavides

Orientador: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientador: Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Jaboticabal, São Paulo

2013

B456i Benavides, Luis Evert Enriquez
Indicadores fisiológicos de estresse e expressão do gene hsp70
em juvenis do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após implante de
cortisol / Luis Evert Enriquez Benavides. – – Jaboticabal, 2013
x, 68 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2013
Orientadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati
Co-Orientadora: Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho
Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Marisa Narciso
Fernandes, Luiz Roberto Furlan

Bibliografia

1. Pacu-estresse. 2. Proteína de choque térmico. 3. Cortisol. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

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

SUMÁRIO

DEDICATORIA.....	9
AGRADECIMENTOS.....	10
APOIO FINANCEIRO.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1. O crescimento da aquicultura e fatores envolvidos.....	14
2. Estresse.....	15
2.1 Respostas celulares de estresse.....	16
2.1.1 Proteínas de choque térmico.....	17
2.1.2 Mecanismo molecular da resposta ao choque térmico.....	18
3. Uso de cortisol exógeno como resposta de estresse.....	19
4. Espécie modelo.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1. Peixes e condições de criação.....	21
2. Protocolo de implantação de cortisol.....	21

3. Manipulação e amostragens.....	22
4. Análises laboratoriais dos indicadores fisiológicos de estresse.....	22
5. Identificação e quantificação da expressão do gene <i>hsp70</i> em pacu....	23
5.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para o gene <i>hsp70</i>	23
5.2 Amplificação da sequência do gene <i>hsp70</i> por PCR convencional.....	25
5.3 Grupos experimentais utilizados nas análises de expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR).....	25
5.4 Extração do RNA total.....	26
5.5 Gel de agarose para visualização do RNA.....	27
5.6 Quantificação do RNA pelo método fluorimétrico.....	27
5.7 Avaliação da integridade do RNA através de BioAnalyzer.....	28
5.8 Síntese de cDNA.....	28
5.9 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	29
5.9.1 Oligonucleotídeos para PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	29
5.9.2 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR em Tempo Real.....	31
5.9.3 Curva de eficiência de amplificação da PCR Quantitativa em Tempo Real.....	32

5.9.4 Escolha do Gene de Referência.....	33
5.9.5 Método do Ct Comparativo ($\Delta \Delta Ct$).....	33
6. Análises Estatísticas dos dados.....	34
RESULTADOS.....	35
1. Indicadores fisiológicos de estresse.....	35
2. Indicadores moleculares de estresse.....	40
2.1 Obtenção e identificação do fragmento referente ao gene <i>hsp70</i>	40
2.2 Obtenção de RNAs de tecido hepático de pacu.....	43
2.3 PCR Quantitativa em Tempo Real.....	46
2.3.1 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores.....	46
2.3.2 Curva de Eficiência de amplificação da PCR Quantitativa em Tempo Real.....	49
2.3.3 Escolha do Gene de Referência.....	52
2.3.4 Análise estatística da expressão do gene <i>hsp70</i> em juvenis de pacu injetados com péletes de cortisol.....	53
DISCUSSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	60

Lista de Figuras

Figura 1. Níveis de cortisol sérico (n=6) em juvenis de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) implantados intraperitonealmente com peletes de cortisol.....	36
Figura 2. Níveis de glicose plasmática (n=8) em juvenis de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) implantados intraperitonealmente com peletes de cortisol.....	37
Figura 3. Níveis de cloreto plasmático (n=8) em juvenis de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) implantados intraperitonealmente com peletes de cortisol.....	38
Figura 4. Níveis de sódio sérico (n=6) em juvenis de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) implantados intraperitonealmente com peletes de cortisol.....	39
Figura 5. Níveis de potássio sérico (n=6) em juvenis de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) implantados intraperitonealmente com peletes de cortisol.....	40
Figura 6. Gel de agarose 1% ilustrando os fragmentos obtidos a partir de cDNA de tecido hepático de pacu.....	41
Figura 7. Análise em gel de agarose 1,5% de RNA total extraído de tecido hepático de pacu.....	43
Figura 8. Eletroferograma após corrida em eletroforese de capilar através do equipamento Bioanalyzer Agilent.....	45
Figura 9. Curva de dissociação, em duplicata, para os genes de referência (Beta Actina, EEF1- α , rRNA 18S) e alvo (HSP70_Tr, HSP70_Ch).....	49
Figura 10. Curva de eficiência, coeficiente angular da reta (slope), y-intercepto, coeficiente r ² e eficiência obtidos para os genes de referência (Beta Actina, EEF1- α , rRNA 18S) e alvo (HSP70_Tr, HSP70_Ch).....	52
Figura 11. Variabilidade dos genes de referência (Beta Actina, EEF1- α , rRNA 18S) em amostra de tecido hepático de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) testados através do programa NormFinder	53
Figura 12. Quantificação relativa do gene <i>hsp70</i> (n=6) em juvenis de pacu (<i>P. mesopotamicus</i>) injetados com peletes de cortisol.....	5

Lista de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na identificação do gene hsp70 em pacu.....	24
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes endógenos β -actina, EEF1- α (Eukaryotic Elongation Factor 1-alpha) e rRNA 18S, e do gene alvo hsp70 em tecido hepático de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) para as reações de qPCR.....	30
Tabela 3. RNAs obtidos de amostras de tecido hepático de pacu.....	44

Ofereço e Dedico

A minhas três mulheres: minha mãe, minha irmã e minha Natica. A meu pai e meu irmão e especialmente ao Monsenhor Luís Montero. Apesar da sua partida deste mundo, eu sei que sempre estará perto de mim para me ajudar num plano celestial.

Agradecimentos

Agradeço especialmente à Profa. Beth, por abrir as portas do seu laboratório para mim. Espero ter correspondido à confiança que a senhora colocou em mim. Obrigado pelo carinho e pela oportunidade. SEMPRE GRATO.

A Flávia, minha co-orientadora, que conduziu a orientação com profissionalismo e entrega, sem nunca tirar o sorriso do rosto. Eu devo a você meus primeiros passos na molecular.

Ao grupo de Fisiologia “Talitinha”, Rafa, Gimbo, “Spinha”, “Shrek”, Damares, Rô, Gi, Natalia, Soliris, Ana Paula, Marcos. Fizeram do trabalho uma experiência divertida. Nunca esqueçam o que é a vida. Agradecimento especial para a Gel.

Ao grupo de Molecular: Miguel, Gustavo, Raquel, Thálita. Obrigado pelos ensinamentos e a paciência.

Ao pessoal de “coçadores”: “Zé”, Jesa, “Wiska”. Obrigado pela amizade.

Ao CAUNESP e todos seus funcionários.

APOIO FINANCEIRO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES. Bolsa de Mestrado.

RESUMO

Quando as células de um organismo são expostas a um estressor, elas respondem sintetizando um grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (heat shock proteins - *hsp*), agrupadas em quatro famílias: *hsp*-90, *hsp*-70, *hsp*-60 e pequenas *hsp*'s, sendo a família das *hsp*-70 a mais conservada e filogeneticamente ubíqua, e que tem sido considerada indicador molecular da resposta de estresse. O objetivo deste estudo foi caracterizar as respostas fisiológicas e moleculares de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos à elevação exógena do cortisol, utilizando a expressão do gene da *hsp*-70 como ferramenta de determinação da resposta molecular. Um total de 104 peixes ($67,5 \pm 11,7$ g) recebeu implantes intraperitoniais de manteiga de cacau contendo 0, 50 e 100 µg cortisol /g de peso vivo, e foi amostrado 1, 3, 6 e 24 horas após o implante, para determinação das concentrações séricas de cortisol, sódio e potássio e plasmáticas de glicose e cloreto. Um grupo foi amostrado antes do implante (grupo basal). Para a expressão gênica foram analisados o grupo basal e o injetado com 50 µg cortisol/g. O cortisol circulante aumentou a partir de 1 hora após o implante dos péletes contendo cortisol e se manteve alto até 24 horas depois. A resposta da glicose circulante acompanhou as elevações do cortisol no sangue, confirmando sua ação gliconeogênica, porém houve ausência de respostas nos indicadores iônicos. A expressão do gene *hsp70* do pacu mostrou leve aumento 3 e 6 horas após o implante, mas foi mais expressiva 24 horas depois, indicando a possibilidade do uso da expressão gênica da *hsp70* como marcador de elevação dos níveis de cortisol e da resposta de estresse.

Palavras chave – estresse, cortisol, proteína de choque térmico, peixe

Abstract

When the cells of an organism are exposed to a stressor, they respond by synthesizing a group of proteins called heat shock proteins (hsp), which are grouped into four families: Hsp-90, Hsp-70, Hsp-60 and small hsp's, where the family of Hsp-70 is the most conserved and phylogenetically ubiquitous, and has been considered an indicator of molecular stress response. The aim of this study was to characterize the molecular and physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) to elevation exogenous cortisol, using gene expression of *hsp-70* as a tool for determining the molecular response. A total of 104 fish (67.5 ± 11.7 g) received intraperitoneal implants of cocoa butter containing 0, 50 and 100 mg cortisol / g of live weight and were sampled 1, 3, 6 and 24 hours after implantation for determination of serum cortisol, sodium and potassium and plasma glucose and chloride. One group was sampled before implantation (baseline group). For gene expression were analyzed the baseline group and the injected with 50 mg cortisol / g. The cortisol increased from 1 hour after implantation of pellets containing cortisol and remained high until 24 hours later. The response of circulating glucose followed elevations of cortisol in the blood, confirming gluconeogenic action, but there were no responses in ion indicators. The expression of the *hsp70* gene showed slight increase 3 and 6 hours after implantation, but was more pronounced after 24 hours, indicating the possibility of using gene expression of *hsp70* as a marker of increased levels of cortisol and stress response.

Keywords - stress, cortisol, heat shock protein, fish

REVISÃO DE LITERATURA

1. O crescimento da aquicultura e fatores envolvidos

A aquicultura global cresceu expressivamente nos últimos 50 anos e corresponde a cerca de 50% do suprimento de peixes consumidos no mundo (FAO, 2010). Em recente revisão, BOSTOCK et al. (2010) discutem os fatores primários responsáveis por sustentar esse crescimento e apontam entre eles a demanda e a competitividade, a disponibilidade de recursos ambientais, um ambiente de negócio favorável (investimento no setor) e destacam, ainda, a capacidade técnica da atividade pelo desenvolvimento de tecnologia de criação adequada. De acordo com os autores citados, no desafio para o desenvolvimento da Aquicultura, há um forte foco na melhoria da eficiência da utilização dos recursos através do manejo e mais soluções tecnológicas pelo avanço da engenharia e da biociência. Além disso, notáveis avanços para a melhoria da aquicultura aconteceram, na última década, em áreas científicas que sustentam a atividade, incluindo-se a área básica.

Um aspecto em destaque, no artigo citado, é o impacto negativo das doenças na produção eficiente em sistemas intensivos de aquicultura. Nesse sentido, está evidente por inúmeros estudos, a relação entre a resposta biológica de estresse e o aumento da suscetibilidade imunológica com subsequente aparecimento de doenças, e mesmo morte, nos peixes de cultivo (WENDELAAR BONGA, 1997; TORT, 2011). Assim, estudos que busquem esclarecer os mecanismos utilizados pelos peixes durante sua resposta frente a um estressor poderão trazer conhecimentos para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de

técnicas que controlem melhor o manejo dos peixes e otimizem o processo de criação de peixes.

2. Estresse

O estresse é definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo animal (homeostase) é ameaçado ou perturbado como resultado da ação de estímulos intrínsecos ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (WENDELAAR BONGA, 1997). SELYE (1936) criou o conceito de Síndrome de Adaptação Geral, que divide a resposta de um organismo frente ao agente estressor em três fases. A primeira é uma reação de alarme que tem uma resposta fisiológica rápida, seguida de uma segunda fase de resistência e adaptação, quando o organismo se adapta ou compensa as condições alteradas causadas pelo estresse a fim de recuperar o seu estado homeostático e, por último, a terceira fase, quando o organismo não mais consegue se adaptar e acontece a exaustão ou descompensação do organismo.

Ao nível organismal, as respostas de estresse dos peixes são divididas em três categorias clássicas: primárias, secundárias e terciárias. A resposta primária se caracteriza por um aumento rápido dos níveis sanguíneos dos hormônios catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e cortisol; a resposta secundária compreende os efeitos fisiológicos destes hormônios. A resposta secundária inclui mudanças nos níveis plasmáticos e teciduais de metabólitos e íons, mudanças no perfil hematológico, todas relacionadas a ajustes fisiológicos, tais como metabolismo, respiração, equilíbrio ácido-básico, balanço hidromineral e função imune. Por último, a resposta terciária inclui as alterações fisiológicas e

comportamentais que ocorrem no animal como um todo, e se referem ao crescimento, reprodução, resistência a doenças. Nesta fase, as alterações perdem o caráter adaptativo, e se tornam prejudiciais (WENDELAAR BONGA, 2011).

Esta divisão é simplista, e o quadro das alterações depende da magnitude e duração da exposição do peixe ao estressor, que pode afetar o animal em todos os níveis de organização, do molecular e bioquímico ao populacional (BARTON, 2002).

2.1 Respostas celulares de estresse

O termo “estresse” não está restrito ao nível organismal. Estressores físicos e químicos podem também atuar diretamente ao nível celular, e perturbar a fisiologia celular. As respostas de estresse celular, que são múltiplas e amplamente “estressor-específicas”, incluem a expressão estimulada ou induzida de proteínas, tais como as proteínas de choque térmico (HSPs) (WENDELAAR BONGA, 2011), que se caracterizam como resposta secundária, bem como as outras alterações já descritas.

As proteínas precisam de um mecanismo rápido e efetivo para voltar a sua configuração molecular estrutural correta, quer seja no processo de formação como no de degradação. Este tipo de tarefa, nesse nível de eficiência, é feito por um tipo de proteínas chamadas *chaperones* moleculares (hsp's). Estas proteínas se encontram em todos os organismos, desde os mais primitivos como as bactérias, até os mais complexos como o homem (LODISH et al., 2005).

2.1.1 Proteínas de choque térmico

Em 1962, Ritossa descobriu, na *Drosophila melanogaster*, que altas temperaturas induziam a expressão de certo tipo de genes, que depois seriam conhecidos pela formação das proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*). Estas estão presentes na maioria dos organismos estudados, sendo filogeneticamente bem conservados; reagem a um amplo grupo de estressores como temperatura (DIETZ e SOMERO, 1992; KONDO et al., 2004; PEREZ et al., 2008), estresse por UV (KIM et al., 2011; SANG et al., 2012), hipóxia (FUZZEN et al., 2011), inflamações e infecções (ACKERMAN e IWAMA, 2001; DEANE e WOO, 2005a; ZHANG et al., 2011) e poluentes ambientais (VERMA et al., 2007). Os tipos de HSPs estão definidos de acordo com o peso molecular em pequenas HSP's (sHSPs), HSP60, HSP70, HSP90, e HSP100 (HORVÁTH et al., 2008).

De acordo com DEANE E WOO (2011), em células não estressadas, as HSPs expressam-se de forma constitutiva, atuando como chaperones moleculares, auxiliando na montagem de polipeptídeos nascentes (ELLIS, 1987), no dobramento de proteínas (GEETHING e SAMBROOK, 1992), na translocação de proteínas (CHIRICO et al., 1988; DESHAIES et al., 1988) e na desmontagem ou degradação de proteínas deformadas (LINDQUIST e CRAIG, 1988; GEORGOPOULOS e WELCH, 1993). Quando o organismo é exposto a um estressor, como o choque térmico, a síntese de HSPs aumenta e este aumento e acumulação de HSPs fornecem à célula uma proteção adicional, importante no re-dobramento, re-agregação e restauração da conformação nativa da proteína (PELHAM, 1986). A exposição ao estressor faz com que o mRNA seja convertido

rapidamente em proteínas nascentes por que a maioria dos genes de *hsp70* não têm introns, tornando o processo mais rápido (IWAMA, 2004).

2.1.2 Mecanismo molecular da resposta ao choque térmico

Os genes que codificam as HSPs podem ser agrupados em três classes de regulação: (1) expressão constitutiva durante o crescimento e desenvolvimento, (2) expressão constitutiva e induzível, e (3) expressão estritamente induzível (CURRIE, 2011). A homologia de aminoácidos e de nucleotídeos entre os membros constitutivo e induzível da família das HSPs é elevada (acima de 80%), mas a diferenciação entre estes é possível porque as regiões heterogêneas de nucleotídeos podem ser usadas para a amplificação do gene. Por exemplo, as regiões carboxil *hsc70* e *hsp70*, em peixes, proporcionam suficiente heterogeneidade para desenhar ensaios de RT-PCR específicos, porque *hsc70* tem uma série de motivos GGXP únicos e possui a assinatura “SGPTIEEVD” no nonapeptídeo, enquanto que a forma induzível (*hsp70*) não tem repetição de motivos GGXP ou a assinatura nonapeptídica (DEANE e WOO, 2005b).

Em todos os organismos, a resposta ao choque térmico é mediada pela transcrição de uma família de *fatores de choque térmico* (HSFs). Há pelo menos quatro genes deste tipo conhecidos (*hsf1*, *hsf2*, *hsf3* e *hsf4*), sendo o *hsf1* o mestre regulador da resposta de choque térmico em eucariotas. Em peixes, foram identificados os genes *hsf1* e *hsf2* e, em truta, dois genes pertencentes ao *hsf1* (*hsf1a* e *hsf1b*) (CURRIE, 2011). O mecanismo de ação do *hsf* envolve a trimerização (ativação) de monômeros HSF, a translocação de trímeros HSF para o núcleo e a indução da transcrição através da ligação do HSF trimerizado ao

elemento de choque térmico (HSE) dentro da região promotora das HSPs (WESTWOOD et al., 1991). Altas taxas de transcrição são mantidas apenas quando trímeros de *hsf1* permanecem ligados aos *elementos de choque térmico* (HSEs). Quando o sinal de estresse é removido, as proteínas não são mais geradas e a resposta ao choque térmico é rapidamente diminuída. Esta rápida diminuição da resposta ao choque térmico, na ausência de esforço, é importante para reduzir os custos energéticos de síntese de HSPs e para evitar qualquer possível efeito deletério da sobre-expressão (CURRIE, 2011).

3. Uso de cortisol exógeno como resposta de estresse

Nos peixes, a resposta de estresse é controlada por um complexo sistema neuro-endócrino (URBINATI e CARNEIRO, 2004), que envolve o sistema nervoso simpático e o tecido cromafim no rim anterior e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), ativados pela presença e percepção dos estressores intrínsecos e extrínsecos. A liberação do cortisol pela ativação do HHI é um dos indicadores de estresse mais amplamente medidos em peixes (MOMMSEN et al., 1999). O cortisol tem uma variedade de funções em peixes teleósteos e, provavelmente, as mais importantes funções estejam relacionadas com a capacidade de mobilização de energia (principalmente pela gliconeogênese) e a participação em processos osmorregulatórios (PICKERING, 1993).

A administração de cortisol (estresse exógeno), como estratégia para aumentar os níveis circulantes de hormônio, é uma metodologia válida e amplamente utilizada em salmonídeos (PICKERING e DUSTON, 1983; FEVOLDEN et al., 1991; SPECKER et al., 1994; BASU et al., 2001; BARRETO et

al., 2006; GADAN et al., 2012), robalo (O'CONNOR et al., 2011), tilápia (VIJAYAN et al., 1997), goldfish (CHASIOTIS, 2012), etc.

4. Espécie modelo

O estudo da fisiologia do estresse em espécies nativas tem se intensificado na última década, incluindo o matrinxã (CARNEIRO e URBINATI, 2001; IDE et al., 2003; ROCHA et al., 2004; URBINATI et al., 2004), jundiá (BARCELLOS et al., 2004; BARCELLOS et al., 2009; CERICATTO et al., 2009), pintado (FAGUNDES e URBINATI, 2008), entre outros. Uma espécie muito importante na piscicultura nacional é o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (QUEIROZ et al., 2005), representante da superordem Ostariophysi, na qual se incluem os peixes de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileiras. A ordem Characiformes é um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul e compreende formas herbívoras, onívoras, iliófagas, carnívoras, algumas das quais muito especializadas. O grupo é amplamente distribuído na região neotropical e apresenta o maior número de famílias. A família Characidae apresenta o maior número de espécies descritas dentro da ordem e é a mais complexa com grande número de subfamílias (URBINATI et al., 2010). Alguns estudos sobre a fisiologia do estresse ligados ao processo de criação em ambiente controlado (KRIEGER et al., 1989; MARTINS et al, 2000; PERRY et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2006; LOPES et al., 2006; BILLER et al., 2008; ABREU et al., 2009) foram realizados com esta espécie, mas os estudos existentes não abordam as respostas moleculares, mas apenas as organismais.

Em vista do exposto, o presente trabalho teve por objetivo investigar se o padrão de expressão do gene da *hsp70* pode ser utilizado como indicador de estresse em juvenis do pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Peixes e condições de criação

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, S.P. Os peixes foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP. Um total de 104 peixes ($67,5 \pm 11,7$ g) foi distribuído aleatoriamente em 13 caixas de 100L, com renovação de água e aeração constante, e temperatura entre 27 e 28°C, com um regime de 12 horas claro/ 12 horas escuro. Os peixes permaneceram em período de adaptação por um mês sendo alimentados com ração comercial, duas vezes por dia.

2. Protocolo de implantação de cortisol

Baseado na metodologia de SPECKER et al. (1994), o cortisol (Sigma, 45698-250MG-R) foi implantado na cavidade abdominal dos peixes usando manteiga de cacau como veículo. As inclusões foram de 0, 50 e 100 µg cortisol /g de peso vivo, sendo cada concentração aplicada a peixes de quatro caixas. Inicialmente, a manteiga foi aquecida até o ponto de fusão. O cortisol foi incorporado à manteiga e dissolvido a uma concentração de 10 e 20 mg/mL de

veículo para atingir as duas doses experimentais. O volume do implante foi de 0,05 mL/10 g de peso corporal.

3. Manipulação e amostragens

Foram coletados oito peixes por tratamento (2 por caixa) 1, 3, 6 e 24 horas após o implante intraperitoneal do pélete de cortisol. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4 constituído por um controle (só veículo) e dois tratamentos (veículo+50 µg cortisol/g de peso e veículo+100 µg cortisol/g de peso) em quatro tempos de amostragem. Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) e o sangue extraído por punção de vasos caudais para obtenção do plasma e do soro, e posterior determinação dos níveis de glicose e cloreto (plasma) e cortisol, sódio e potássio (soro).

Para a realização das análises moleculares, o fígado foi removido e armazenado a -80°C até posterior utilização.

4. Análises laboratoriais dos indicadores fisiológicos de estresse

As concentrações de cortisol sérico foram determinadas por radioimunoensaio de fase sólida usando o kit Coat-A-Count.® ¹²⁵ I radiativo (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Los Angeles, CA, USA). As concentrações plasmáticas de glicose e cloreto foram determinadas por kit comercial (Labtest.®, Lagoa Santa, MG, Brasil) e dos íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) usando um seletor de íons (ISELAB DRAKE).

5. Identificação e quantificação da expressão do gene *hsp70* em pacu (*P. mesopotamicus*)

Os procedimentos para a identificação e quantificação da expressão do gene *hsp70* foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular - LBM do Departamento de Tecnologia, associado ao Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal/SP.

5.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para o gene *hsp70*

Pelo fato do pacu não ter seu genoma sequenciado, foi necessário acessar o banco de dados público contido no NCBI (National Center for Biotechnology Information) para buscar sequências gênicas do gene *hsp70* de espécies de peixes geneticamente próximas do pacu. Foram desenhados quatro oligonucleotídeos iniciadores com base nas regiões consenso do gene *hsp70* de quatro espécies de peixe: *Oreochromis niloticus* (tilápia), *Cyprinus carpio* (carpa), *Oncorhynchus mykiss* (truta) e *Astyanax mexicanus* (tetra mexicano, membro da família *Characidae*). O oligonucleotídeo do *A. mexicanus* foi o mesmo utilizado por HOOVEN et al. (2004). A proposta foi amplificar e identificar sequências do mesmo gene no material genético do pacu através destes iniciadores específicos para o gene *hsp70* em peixes. As sequências dos oligonucleotídeos, bem como os tamanhos dos amplicons, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na identificação do gene *hsp70* do pacu.

Espécie do peixe	Nome do oligonucleotídeo *	Sequência 5'-3' **	Acesso ao NCBI	Amplicon (pb) ***
<i>O. niloticus</i>	HSP70_Ti_F	CATCGCCTACGGTCTGGACAA	XM_003460596	498
	HSP70_Ti_R	AMMTTGGGGATTCTGGGTGGA		
<i>C. carpio</i>	HSP70_Ca_F	CCCTCATCAAACGCAACAC	JN544930	324
	HSP70_Ca_R	GCACCATCCTCTCAATCTCC		
<i>O. mykiss</i>	HSP70_Tru_F	ATCCCCAAGGTCCAGAAGC	AB176854	476
	HSP70_Tru_R	TCTTGTTCTCTTTGCCCGTG		
<i>A. mexicanus</i> ****	HSP70_Cha_F	ACGCAGCHAAGAACCAGGTG	PRJNA89115	375
	HSP70_Cha_R	CGTGGGYTCGTTGATRAT		

* F, Forward; R, Reverse.

** Sequência degenerada onde M = A+C; H = A+T+C; Y = C+T e R = A+G

*** pb, pares de bases.

**** O acesso no GenBank (NCBI) corresponde ao número do bioprojeto da sequência genômica completa.

5.2 Amplificação da sequência do gene *hsp70* por PCR convencional

As reações de PCR foram realizadas utilizando 1/10 de volume do tampão da enzima; 0,2 mM do mix de dNTPs (A,T,C,G); 1,5 mM de MgCl₂; 0.4 µM de cada oligonucleotídeo; 0.625 U de Taq polimerase (Fermentas) e 50 ng de cDNA teste (sintetizado a partir de tecido hepático de pacu – metodologia descrita abaixo item 5.8). Os ciclos de PCR utilizados foram: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 45 segundos de temperatura de anelamento (esta temperatura foi adequada para cada oligonucleotídeo iniciador), 72°C de extensão por 30 segundos e uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%.

Os produtos obtidos a partir da PCR convencional foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e 50 ng de cada produto foram submetidos ao sequenciamento automático. A sequência de nucleotídeos do gene *hsp70* foi obtida mediante o sequenciamento em Sequenciador ABI 3730 XL (Applied Biosystem).

5.3 Grupos experimentais utilizados nas análises de expressão gênica por PCR em Tempo Real (qPCR)

Com base no resultado das concentrações de cortisol sérico, decidiu-se comparar a expressão gênica do grupo basal com a do grupo injetado com 50 µg cortisol/g, em diferentes tempos de coleta. Assim, foram estabelecidos cinco grupos experimentais com oito réplicas, sendo eles:

1. Basal ou zero hora (sem veículo nem cortisol) = T0;
2. Uma hora após injeção = T1;
3. Três horas após injeção = T2;
4. Seis horas após injeção = T3;
5. Vinte e quatro horas após injeção = T4.

5.4 Extração do RNA total

A extração do RNA total das 40 (5 grupos experimentais x 8 animais) amostras de tecido hepático foi realizada com o kit AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep (Axygen Scientific, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações como descrito abaixo:

- Adição de 30% do volume original nos reagentes de lise (tampão R-I), neutralização (tampão R-II) e ligação (isopropanol);
- Tratamento com DNase (reação contendo 5 µL de DNase (Promega, RQ1 RNase-Free DNase), 8 µL de buffer DNase e 67 µL de água ultrapura). Esta reação foi adicionada à coluna Spin/Vac depois da primeira lavagem com tampão W2. A coluna junto com a reação de DNase foi incubada em banho úmido durante 30 minutos. Seguiu-se com a segunda lavagem em diante com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 70 µL de água ultrapura, para verificação da qualidade e integridade, bem como a determinação da quantidade de RNA obtido. Em seguida, o RNA foi estocado a -80°C até o momento de uso.

5.5 Gel de Agarose para Visualização do RNA

O gel de agarose (1,5%) foi utilizado primeiramente para deduzir se o RNA obtido estava íntegro, através da visualização das bandas do RNA ribossomal (rRNA), 28S e 18S, sendo que o rRNA 28S deve apresentar o dobro da intensidade da banda do rRNA 18S. O gel também permitiu verificar a presença de algum “arraste” abaixo das bandas do rRNA, indicativo de degradação da amostra de RNA, ou acima delas, indicando contaminação por DNA genômico. Esta rápida análise permite decidir se é viável seguir com outro método mais preciso e sensível para verificação da integridade, bem como de quantificação do RNA obtido, tendo em vista que, trata-se de técnicas mais dispendiosas.

5.6 Quantificação do RNA pelo Método Fluorimétrico

A concentração de RNA nas amostras, bem como a possível contaminação com DNA nas mesmas, foi mensurada por fluorometria através do Qubit (Fluorometer. Qubit® 2.0. Invitrogen). Este equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas utilizando corantes fluorescentes. Estes corantes são específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações, conferindo a esta metodologia uma alta especificidade e sensibilidade. Para quantificar o RNA obtido das amostras de tecido hepático de pacu, foi utilizado o *RNA Qubit® RNA Assay Kit* e para a quantificação do DNA foi utilizado o *Qubit® dsDNA HS Assay Kit*.

5.7 Avaliação da Integridade do RNA através de BioAnalyzer

A integridade do RNA de 24 amostras (60% do total) foi analisada com o equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 e o *kit Agilent RNA 6000 Nano Chips* (Agilent). O princípio do BioAnalyzer é o mesmo de uma eletroforese em gel de agarose, mas a corrida é feita em um capilar contendo o polímero e é gerado um eletroferograma, que é analisado automaticamente pelo aparelho que detecta qualquer traço de degradação. O resultado é exibido na forma de um gráfico, através do qual é possível calcular a razão 28S/18S com maior precisão a partir de seus respectivos picos, gerando desta forma o que se denomina RIN (RNA Integrity Number). Os valores de RIN estão numa escala de 1 a 10, sendo que, quanto maior esta pontuação maior é a qualidade e/ou integridade do RNA. De modo geral, para experimentos de PCR quantitativa em tempo real, considera-se um RNA de boa qualidade quando o valor de RIN está acima de 7,5.

5.8 Síntese de cDNA

As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese e purificação do cDNA utilizando o kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix, com algumas modificações como descrito a seguir.

O processo de desnaturação e anelamento foi realizado usando um volume de reação de 8 µL de RNA (4,0 µg de RNA total), 1 µL de oligo(dT)₂₀ (50 uM) e 1 µL de um mix de dNTPs (10mM). Os ciclos no termociclador (Applied Biosystems) foram: 65°C por 5 minutos, 20°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos, 80°C por 5 minutos e 37°C por 22 minutos. No final do segundo ciclo, foi adicionado o mix de síntese de cDNA contendo 2 µL do tampão RT 10X, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL

de DTT (0,1M), 1 µL de RNaseOUT™ (40U/µL) e 1 µL de SuperScript® III RT (200U/µL). Dois minutos após a reação atingir 37°C foi incorporado o mix de digestão contendo 0,5 µL de RNase H (2 U/µL) e 0,5 µL de H₂O ultrapura. Terminados os ciclos de PCR foi adicionado 1 µL de EDTA (125 mM, pH 8). As reações foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e foi adicionado água ultrapura para o volume final de 50 uL, 10% de acetato de sódio 3 M e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado. O cDNA foi precipitado (“overnight”) a -20°C.

Após precipitação do cDNA, este foi centrifugado a 20.000 x g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1000 µL de etanol 75% gelado, centrifugado a 20.000 x g por 6 minutos, a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado de cDNA foi seco por 10 minutos (bomba de vácuo) e imediatamente eluído em 30 µL de H₂O ultrapura. As amostras de cDNA foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop.

5.9 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

5.9.1 Oligonucleotídeos para PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As sequências de nucleotídeos utilizadas para desenhar os iniciadores específicos para os genes endógenos, beta-actina e EEF1-α foram obtidas no banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), tendo como molde sequências de RNA mensageiro ou cDNA de espécies de peixe geneticamente próximas ao pacu, enquanto que os iniciadores para o gene endógeno rRNA 18S foram os mesmos utilizados por ALMEIDA et al. (2010). Já para desenhar os

iniciadores específicos para o gene *hsp70* foram utilizadas as sequências geradas após o sequenciamento descrito anteriormente (item 5.2). Cabe aqui salientar que, para desenhar os oligonucleotídeos para a PCR quantitativa em tempo real, utilizou-se o programa específico para tal finalidade, o *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems). Após obter os pares de oligonucleotídeos, eles foram submetidos a uma ferramenta contida no NCBI, chamada de *primer blast*, onde é possível verificar se o par de oligonucleotídeos escolhido é específico para o gene de interesse, ou se também anela a algum outro gene. Desta forma, para as reações de PCR em tempo real foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes endógenos β -actina, *EEF1- α* (Eukaryotic Elongation Factor 1-alpha) e rRNA 18S, e do gene alvo *hsp70* em tecido hepático de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) para as reações de qPCR.

Nome do oligonucleotídeo [*]	Sequência 5'-3'	Amplicon (pb) ^{**}
Beta-actina_F Beta-actina_R	CTTGATGTCACGGACAATTTCC TCCTGACCGAGAGAGGCTACA	65
EEF1- α _F EEF1- α _R	CGCTGACTTCCTTGGTGATCTC TCCACCGAGCCCCCTTAC	58
rRNA 18S_F rRNA 18S_R	CGGAATGAGCGTATCCTAAACC GCTGCTGGCACCAGACTTG	65
HSP70_Trü_F ¹ HSP70_Trü_R ¹	GGCACGCTCACCCTCGTA CCAAGCAGACCCAGACTTTCA	80
HSP70_Ch_F ² HSP70_Ch_R ²	CAGCATTTGTGACGATCTTTCC GGTGCTCACCAAAATGAAGGA	60

^{*} F, Forward; R, Reverse.

^{**} pb, pares de bases.

¹ Baseado na sequência do gene *hsp70* da truta.

² Baseado na sequência do gene *hsc70* do tetra mexicano (*Characidae*).

5.9.2 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR em Tempo

Real

A técnica de PCR quantitativa em tempo real requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência, uma delas é a titulação dos oligonucleotídeos, ou seja, saber qual concentração dos oligonucleotídeos deriva no melhor resultado. Desta maneira, foram realizadas várias reações em que variou-se as concentrações de cada oligonucleotídeo utilizado, sendo eles, 50/50 nM, 150/150 nM e 300/300 nM (“forward/reverse”), e como molde da reação utilizou-se 3,75 ng de um *pool* de todas as amostras de cDNA do tecido hepático do pacu. Todas as reações foram feitas em duplicata, com controles negativos para cada combinação de iniciadores.

As reações foram realizadas no equipamento *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems) e utilizando o *kit Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Este kit contém os reagentes necessários para as reações de PCR (tampão 2X, dNTPs, MgCl₂, fluoróforo SYBR Green, enzima Taq polimerase e ROX como referência passiva). As reações de PCR foram feitas para um volume final de 12,5 uL, de maneira que continha *Power SYBR Green PCR Master Mix* 1X, cDNA e oligonucleotídeos específicos. Os ciclos de amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C para anelamento e extensão. Ao término das amplificações foi adicionado o estágio referente à curva de dissociação para que a especificidade das reações fosse garantida. Os dados gerados foram analisados com o programa *7500 software v 2.0.6* (Applied Biosystems).

5.9.3 Curva de eficiência de amplificação da PCR Quantitativa em Tempo Real

Após a determinação da melhor concentração dos oligonucleotídeos, utilizou-se esta concentração obtida para realizar uma curva padrão para verificação da eficiência de amplificação da reação. A inclinação (*slope*) de uma curva padrão é utilizada para calcular a eficiência de amplificação da reação de PCR em tempo real, conforme equação: $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$

Para definir o *threshold* de cada gene estudado, foi realizada a análise de eficiência de cada curva a partir do valor do *slope*. A curva padrão é obtida pela regressão linear do valor de Ct (*cycle threshold*) sobre o log da quantidade inicial de cDNA. Um coeficiente angular da curva padrão de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência. São consideradas eficientes as reações em que as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene endógeno sejam muito próximas, com tolerância de $\pm 10\%$ de variação (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Desta forma, para obter a curva de eficiência de amplificação da reação de PCR quantitativa foram realizadas reações utilizando um *pool* de cDNA do tecido hepático do pacu em diluições seriadas de 1:2. Foram realizadas 7 diluições para que houvesse uma margem de segurança, caso fosse necessário descartar algum ponto da diluição devido a resultados incoerentes. As reações foram realizadas em duplicata e a amplificação foi realizada sob as mesmas condições descritas no item anterior.

5.9.4 Escolha do Gene de Referência

A normalização com o gene de referência é um processo indispensável para a medição correta da expressão gênica. Um bom gene de referência vai ser aquele cuja expressão gênica não varie entre os grupos estudados.

Após as amplificações das reações de PCR em tempo real, foi possível avaliar a estabilidade dos três genes endógenos. A estabilidade do normalizador (endógeno) foi mensurada pelo NormFinder (ANDERSEN et al., 2004). O NormFinder é um algoritmo para identificar o melhor gene normalizador entre um conjunto de genes candidatos. Ele classifica esses genes de acordo com sua estabilidade de expressão. O valor de estabilidade que proporciona o NormFinder é uma medida direta da variação da expressão para cada gene, permitindo avaliar o erro sistemático introduzido quando se utiliza o gene para a normalização, sendo o melhor normalizador aquele que resultou na menor variação.

5.9.5 Método do Ct Comparativo ($\Delta \Delta Ct$)

Para a quantificação relativa (método do Ct comparativo) da expressão do gene *hsp70* em pacu injetado intraperitonealmente com 50 µg/g de hidrocortisona foram realizadas reações de PCR utilizando cDNAs sintetizados a partir dos RNAs de tecido hepático do pacu. As amplificações dos genes alvo bem como dos endógenos foram realizadas na mesma placa de 96 poços. Todas as reações foram realizadas em duplicatas, e os cDNAs sintetizados a partir de RNAs obtidos de tecido hepático dos 40 peixes foram quantificados em relação aos 2 genes alvo e 3 genes endógenos. A concentração de cDNA definida através da curva de

eficiência foi de 4 ng. As reações foram conduzidas em aparelho e condições de amplificação descritos anteriormente (item 5.9.2).

Os dados obtidos ao final das reações de PCR foram gerados na forma de valores de Ct (*cycle threshold*), que indica o ciclo em que iniciou o sinal de detecção do produto amplificado. Estes resultados foram analisados no programa Genex 5 (MultiD).

6. Análises Estatísticas dos dados

Os dados das análises fisiológicas foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade e após satisfeitos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças estatísticas encontradas foram submetidas ao teste de Tukey.

De acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001) a amostra basal ou zero hora (sem veículo nem cortisol) foi usada como calibrador. O valor de Ct foi obtido pela média entre as duas repetições técnicas de cada amostra biológica, sendo corrigido pela eficiência das reações. Em seguida, os dados foram transformados usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde: $\Delta\Delta Ct = (Ct, hsp70 - Ct, EEF-1\alpha) \text{ Tempo X} - (Ct, hsp70 - Ct, EEF-1\alpha) \text{ Tempo 0}$

Os dados são apresentados como expressão relativa de mRNA em unidades arbitrárias, com a média $\pm$ DP (desvio padrão) e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para encontrar diferenças entre os tratamentos. A relação da expressão entre os dois genes utilizados (*hsp70-tru/hsp70-ch*) foi verificada pela análise de correlação de Pearson.

RESULTADOS

No presente estudo, utilizamos o método de implante intraperitoneal de péletes de cortisol em juvenis de pacu para simular uma condição hormonal de estresse e verificar a resposta molecular da expressão do gene *hsp70*, como possível ferramenta de detecção de estresse em peixes. Duas concentrações de cortisol foram utilizadas e os indicadores metabólicos e iônicos clássicos foram medidos, além da determinação da expressão do gene que codifica as proteínas de choque térmico da família *hsp70*.

1. Indicadores fisiológicos de estresse

Como mostra a Figura 1, os níveis de cortisol circulante aumentaram significativamente a partir de 1 hora após o implante nos grupos de peixes que receberam as duas concentrações do hormônio (de 50 e 100 µg/g). As concentrações circulantes não diferiram entre si, mas houve redução significativa no grupo que recebeu a concentração de 50 µg/g 24 horas após a administração intraperitoneal do pélete. O cortisol circulante dos peixes que receberam apenas o veículo do pélete não mostrou alteração durante as amostragens, em relação aos valores basais, de peixes que não foram manuseados.

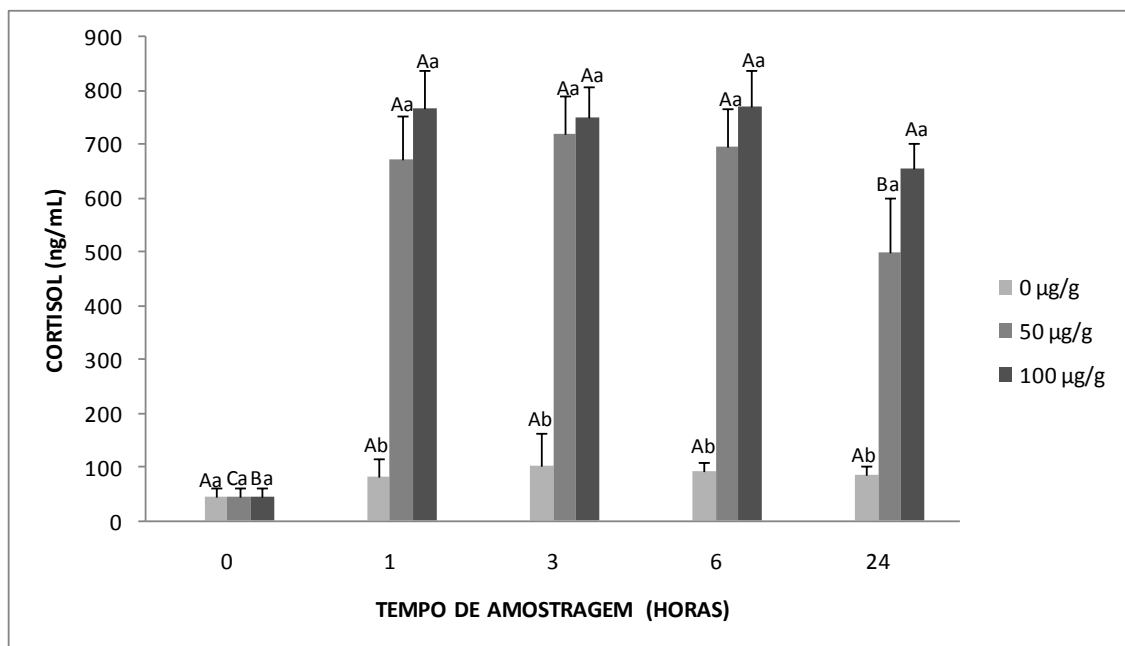


Figura 1. Níveis de cortisol sérico (n=6) em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) implantados intraperitonealmente com péletes de cortisol. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas em um grupo experimental ao longo do tempo e as letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos para um determinado tempo de amostragem. Médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam desvio padrão.

Pela Figura 2, observamos que as concentrações de glicose plasmática dos peixes que receberam o cortisol exógeno aumentam 1 hora após o implante, a valores que se mantiveram até 24 horas, exceto no grupo que recebeu 100 µg/g de cortisol, que retorna a condição inicial. Nas amostragens basal e de 1 hora, a glicose não diferiu entre os três grupos de peixes, mas as 3 e 6 horas os valores dos peixes que receberam o hormônio exógeno são significativamente superiores ao do grupo que recebeu apenas o veículo. Às 24 horas, apenas o grupo que recebeu 50 µg/g de cortisol continuou com valores mais elevados em relação aos outros grupos. O implante do veículo do pélete não afetou o perfil da glicose circulante em relação a condição basal.

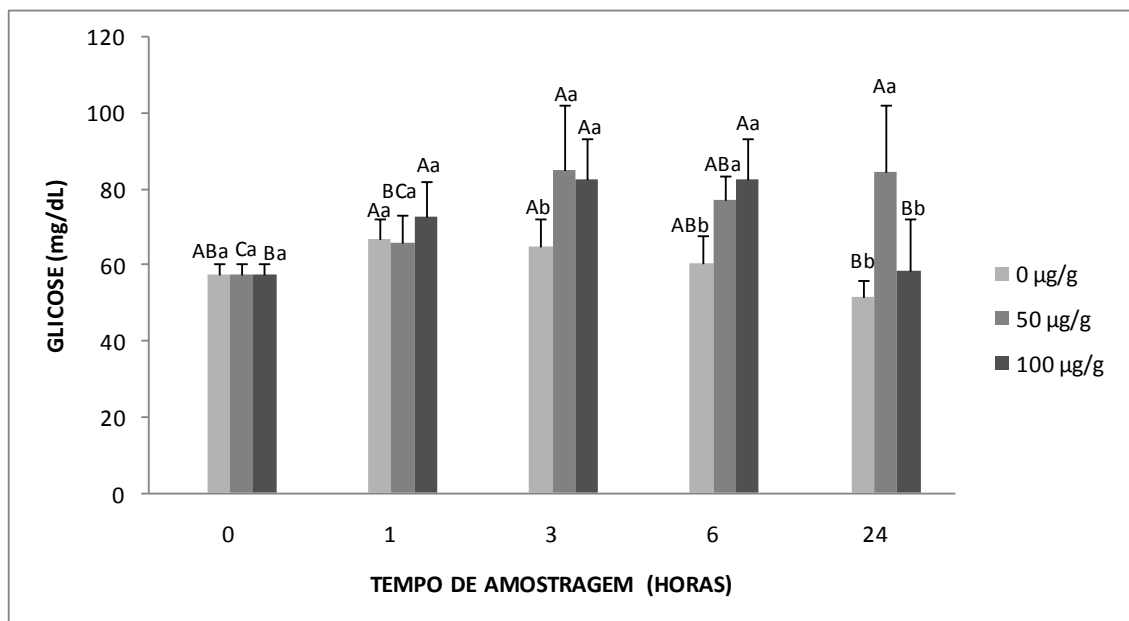


Figura 2. Níveis de glicose plasmática (n=8) em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) implantados intraperitonealmente com péletes de cortisol. Ver Figura 1 para informações adicionais.

Com respeito aos níveis de cloreto plasmático (Figura 3), não há diferença significativa entre os peixes do grupo controle e 100 µg/g ao longo do tempo, enquanto no grupo 50 µg/g os valores são mais altos às 3 horas em relação aos valores de 24 horas, não diferindo nos outros tempos de amostragem. Comparando os tratamentos em cada tempo de amostragem, apenas às 24 horas os valores são mais altos no grupo 100 µg/g em relação aos outros grupos.

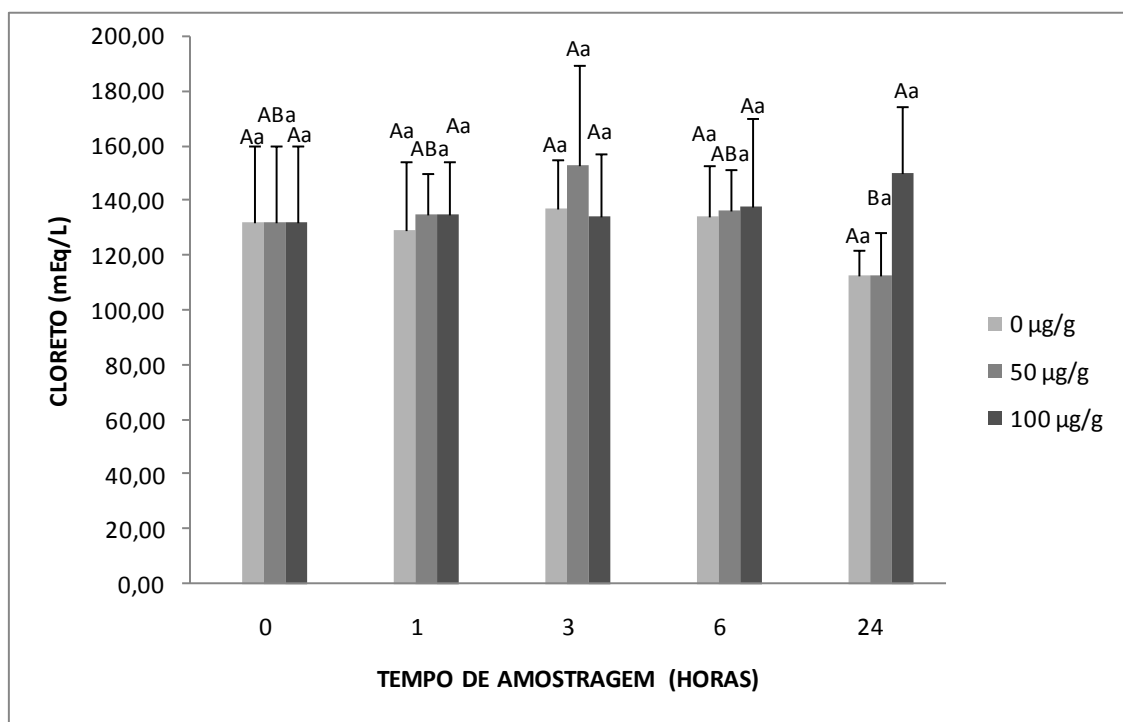


Figura 3. Níveis de cloreto plasmático (n=8) em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) implantados intraperitonealmente com péletes de cortisol. Ver Figura 1 para informações adicionais.

Com relação as concentrações de sódio sérico, como mostra a Figura 4, a única diferença significativa observada foi um aumento nos valores verificados nos peixes do grupo 50 µg/g, às 6 horas, em relação aos valores observados 1 hora após o implante.

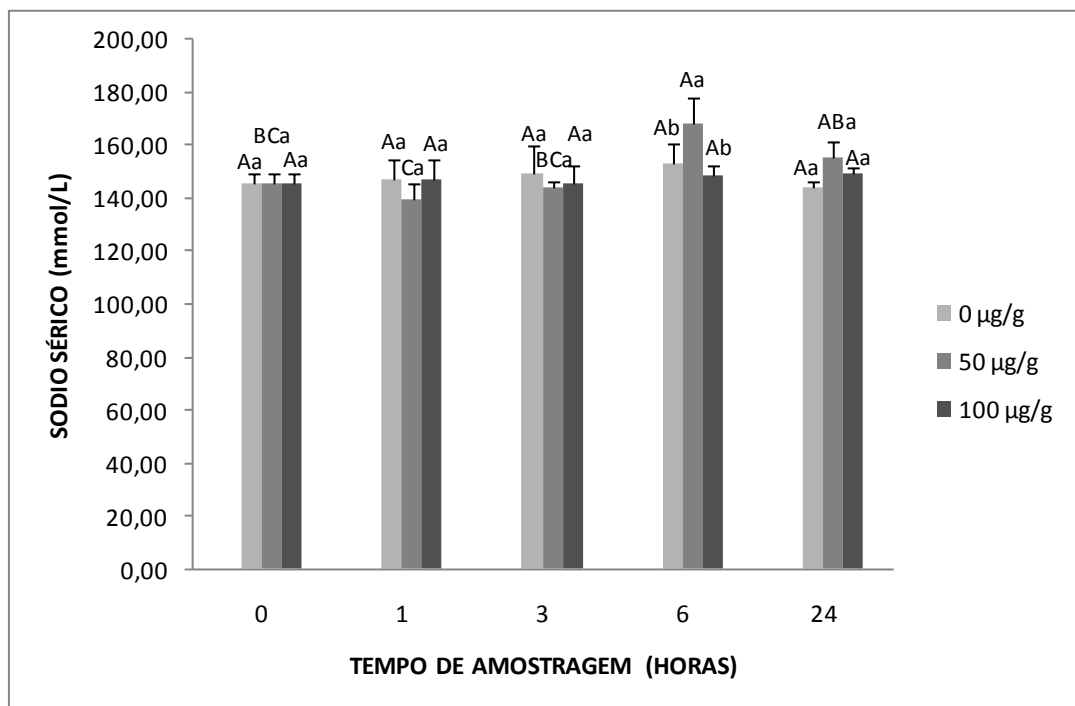


Figura 4. Níveis de sódio sérico (n=6) em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) implantados intraperitonealmente com péletes de cortisol. Ver Figura 1 para informações adicionais.

Em relação às concentrações de potássio sérico, como mostra a Figura 5, não houve interação entre fatores, mas observa-se aumento dos valores às 6 e 24 horas após o implante, independente do tratamento, valores que são iguais nos dois tempos.

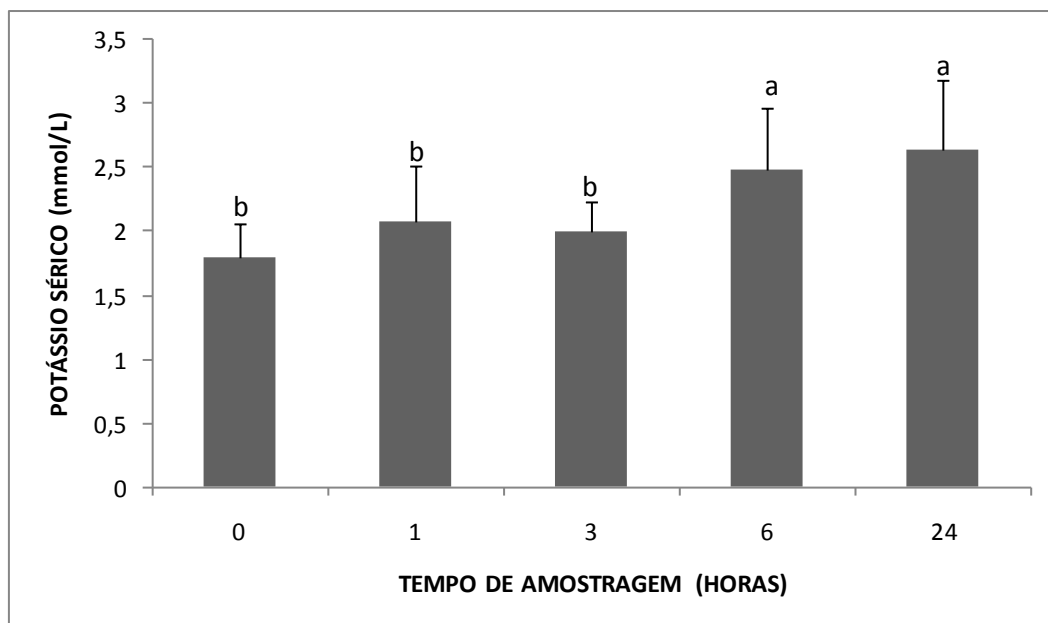


Figura 5. Níveis de potássio sérico (n=6) em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) implantados intraperitonealmente com péletes de cortisol. Letras diferentes indicam diferenças significativas no tempo. Médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam desvio padrão. Pela ausência de interação entre fatores, os dados foram agrupados pela variável tempo.

2. Indicadores moleculares de estresse

2.1 Obtenção e identificação do fragmento referente ao gene *hsp70*

Os quatro oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *hsp70* em peixes (Tabela 1) foram capazes de amplificar sequências de tamanho esperado em amostras de tecido hepático de pacu. Entretanto, houve diferenças na eficiência de amplificação entre os oligonucleotídeos utilizados, como pode se observado na Figura 6. Os fragmentos (bandas no gel) provenientes dos oligonucleotídeos desenhados a partir da sequência de cDNA de *A. mexicanus* (Characidae) e de *O. mykiss* foram os que apresentaram melhores resultados de

amplificação, ou seja, maior eficiência, nas temperaturas de 55°C e 50°C, respectivamente (Figura 6, B e D).

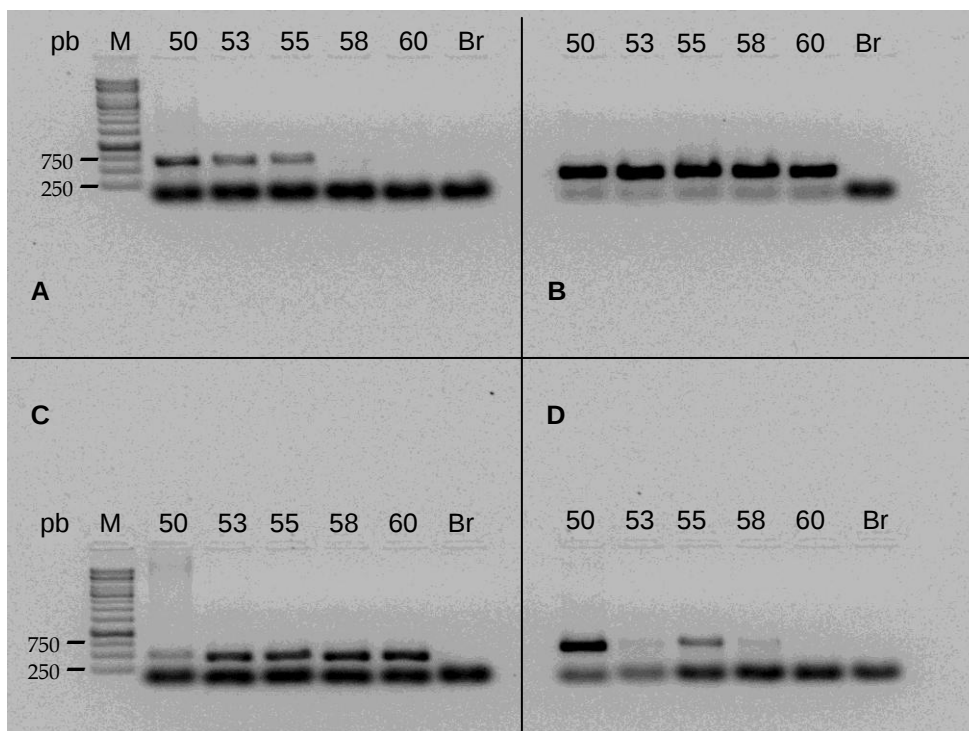


Figura 6. Gel de agarose 1% ilustrando os fragmentos obtidos a partir de cDNA de tecido hepático de pacu. A, B, C e D correspondem aos fragmentos a partir de oligonucleotídeos iniciadores do gene específico hsp70 de *O. niloticus*, *A. mexicanus* (*Characidae*); *C. carpio* e *O. mykiss*, respectivamente. Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder) em pares de bases (pb); coluna Br corresponde ao controle negativo da reação de PCR e as demais colunas indicam as temperaturas de anelamento (TA) utilizadas.

Todos os quatro produtos de PCR provenientes dos quatro diferentes pares de oligonucleotídeos para o gene hsp70 foram submetidos ao sequenciamento, contra o banco de dados, especificamente de peixes teleósteos (*bony fishes*) do NCBI, para confirmação da identidade gênica. Todos os fragmentos foram

confirmados como sendo sequências do gene *hsp70*, sendo que os fragmentos amplificados a partir de:

- oligonucleotídeos iniciadores específicos de *C. carpio* resultaram em 78% de similaridade com a sequência de *Salmo salar*;
- oligonucleotídeos de *O. niloticus* revelaram 81% de similaridade com a sequência de *Danio rerio*;
- oligonucleotídeos iniciadores específicos de *A. mexicanus* (*Characidae*) mostraram 87% de similaridade com a sequência de *Ctenopharyngodon idella*, *Hypophthalmichthys nobilis* e *Cyprinus carpio*;
- os oligonucleotídeos iniciadores de *O. mykiss*) tiveram similaridade de 90% com a sequência de *Erythroculter ilishaeformis*, *Clarias macrocephalus* e *Ictalurus punctatus*.

Em função dos resultados obtidos, apenas duas sequências, as provenientes dos oligonucleotídeos desenhados a partir da sequência de cDNA de *A. mexicanus* (*Characidae*) e de *O. mykiss* (truta), , foram eleitas para serem utilizadas como molde para desenhar os oligonucleotídeos específicos para o gene *hsp70* de pacu, no experimento de PCR quantitativa em tempo real. Estas sequências foram as que apresentaram os melhores resultados (maior similaridade).

2.2 Obtenção de RNAs de tecido hepático de pacu

As amostras de RNA total extraídas de tecido hepático de pacus injetados com 50 µg cortisol/g de peso, bem como de animais controle (sem injeção de cortisol, nem de veículo) foram utilizadas para produção de cDNAs, os quais foram utilizados para as reações de PCR quantitativa em tempo real.

No perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% foi possível visualizar as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S claramente bem definidas e na proporção esperada, bem como verificar a ausência de DNA genômico, como pode ser visto na Figura 7, que ilustra algumas amostras de RNA extraídas de tecido hepático de pacu.

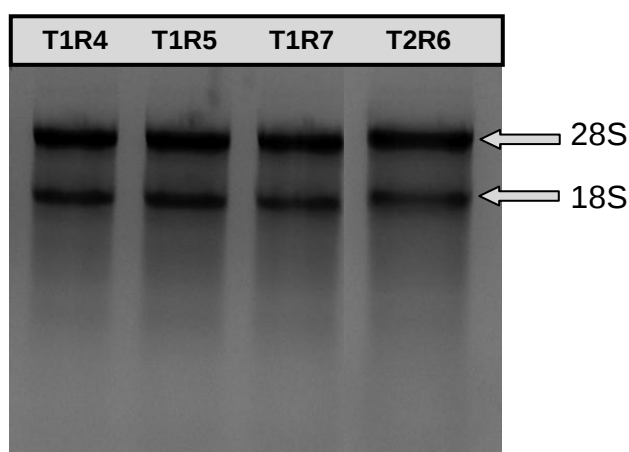


Figura 7. Análise em gel de agarose 1,5% de RNA total extraído de tecido hepático de pacu. Colunas contém 1 µg de RNA total. A posição de migração dos RNAs ribossomais 28S e 18S é mostrada no gel.

Os rendimentos e as relações DNA/RNA de todas as amostras foram determinados através do equipamento Qubit (Fluorometer Qubit® 2.0. Invitrogen) (Tabela 3).

Tabela 3. RNAs obtidos de amostras de tecido hepático de pacu.

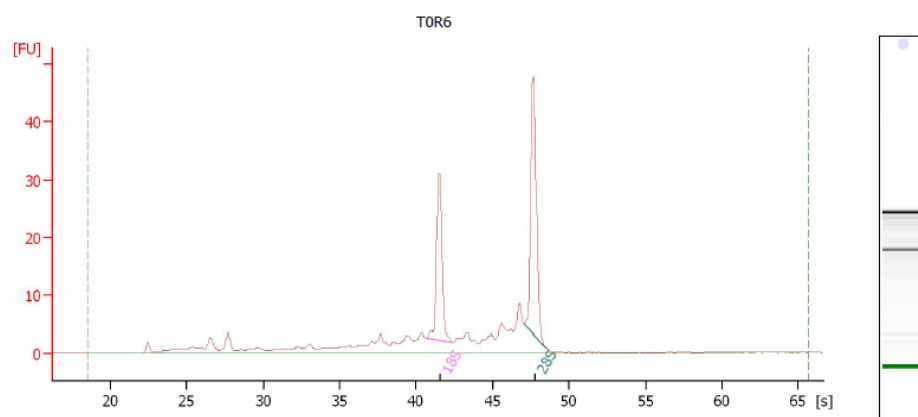
Amostra *	Concentração de RNA (ng/uL)	Concentração de DNA (ng/uL)	Relação DNA/RNA (%)
T0R4	466	41,2	8,8
T0R6	365	33,8	9,2
T1R2	306	20,7	6,7
T2R1	426	35,2	8,2
T3R5	439	25,9	5,9
T4R8	397	51,8	13,0

*T refere-se ao tratamento descrito no item 5.3 e R refere-se à repetição da amostra.

Os eletroferogramas gerados pelo BioAnalyzer Agilent 2100 mostraram que todas as amostras de RNA analisadas (60% do total) obtiveram RNAs íntegros, revelados pelo número de integridade do RNA (RIN), que, em média, tiveram RIN = 8,0. A Figura 8 ilustra os resultados de duas amostras (T0R6 e T2R1) de RNA, gerados pelo equipamento BioAnalyzer.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE72905093_2013-04-16_09-18-35.xad

Created: 16/4/2013 09:18:34
 Modified: 16/4/2013 09:42:27

Electropherogram Summary Continued ...**Overall Results for sample 4 : T0R6**

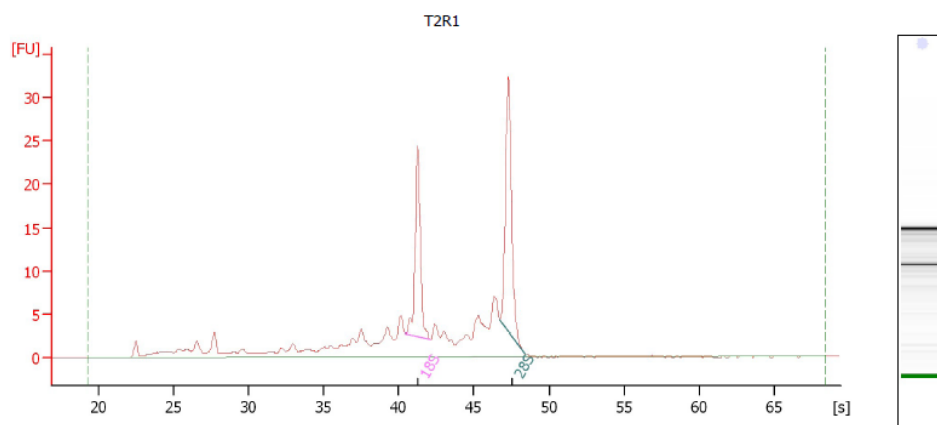
RNA Area:	180,6	RNA Integrity Number (RIN):	8.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	356 ng/ul	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,4	Result Flagging Label:	RIN: 8.10

Fragment table for sample 4 : T0R6

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40,67	42,43	28,3	15,7
28S	47,09	48,47	39,1	21,6

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE72905093_2013-04-16_09-18-35.xad

Created: 16/4/2013 09:18:34
 Modified: 16/4/2013 09:42:27

Electropherogram Summary Continued ...**Overall Results for sample 10 : T2R1**

RNA Area:	161,4	RNA Integrity Number (RIN):	7.6 (B.02.08)
RNA Concentration:	318 ng/ul	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,3	Result Flagging Label:	RIN: 7.60

Fragment table for sample 10 : T2R1

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40,44	42,13	21,9	13,6
28S	46,73	48,37	29,1	18,0

Figura 8. Eletroferograma após corrida em eletroforese de capilar através do equipamento Bioanalyzer Agilent. A figura apresenta os resultados de duas amostras de RNA de tecido hepático de pacu.

Os resultados das amostras de RNA do tecido hepático de pacu utilizadas neste experimento e, parcialmente mostrados na Tabela 3 e na Figura 8, revelaram que as amostras apresentavam-se com bom grau de pureza (quantidade de DNA nas amostras de RNA são aceitáveis), bem como qualidade (RNAs íntegros), respectivamente.

Uma vez verificada a boa qualidade dos RNAs extraídos, os mesmos foram então utilizados para a produção de cDNAs utilizando o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix* como descrito no item 5.8.

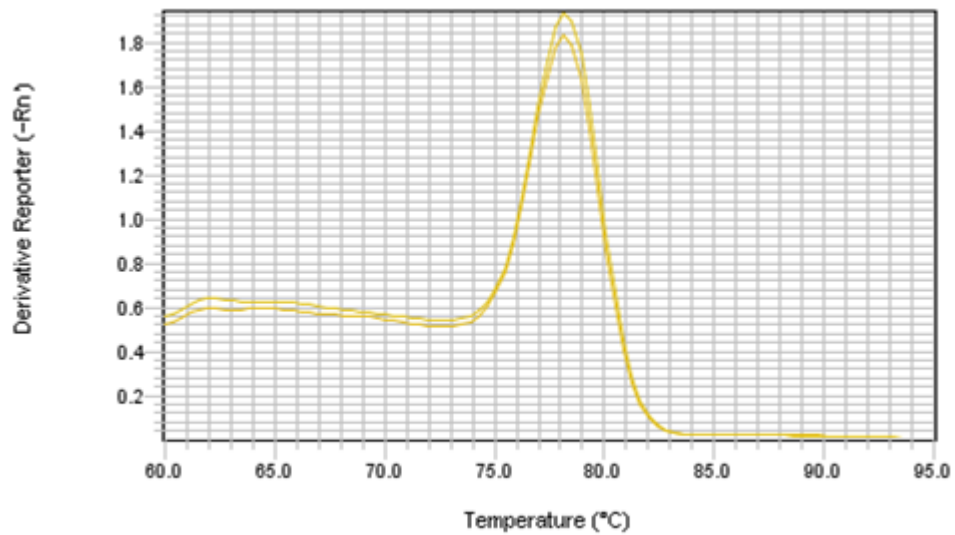
Após a síntese, todas as amostras de cDNAs foram submetidos a quantificação no aparelho NanoDrop, em seguida, todas as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng/uL. Após diluição, todas as amostras foram lidas no mínimo três vezes, garantindo a correta diluição. De posse das amostras de cDNAs na mesma concentração, seguiu-se com as reações de PCR em tempo real.

2.3 PCR Quantitativa em Tempo Real

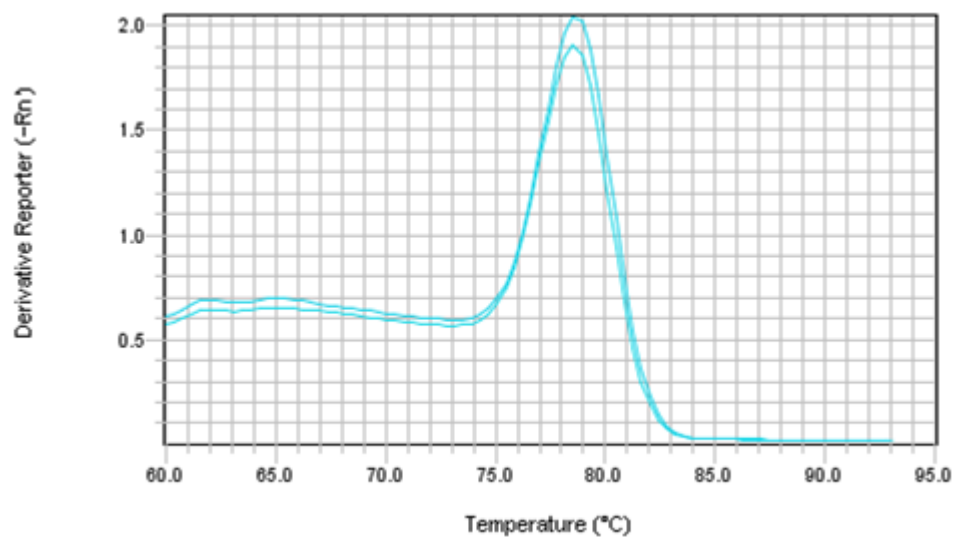
2.3.1 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram verificadas e determinadas as concentrações dos iniciadores (*Forward-Reverse*). A melhor concentração determinada, tanto para genes referência quanto para genes alvo, foi de 150 nM para ambos os iniciadores (150/150). Estas concentrações foram definidas escolhendo as combinações de iniciadores de menor Ct (*Cycle threshold*). Além disso, foram analisadas as curvas de dissociação, e demonstrou-se a especificidade da amplificação, sendo as

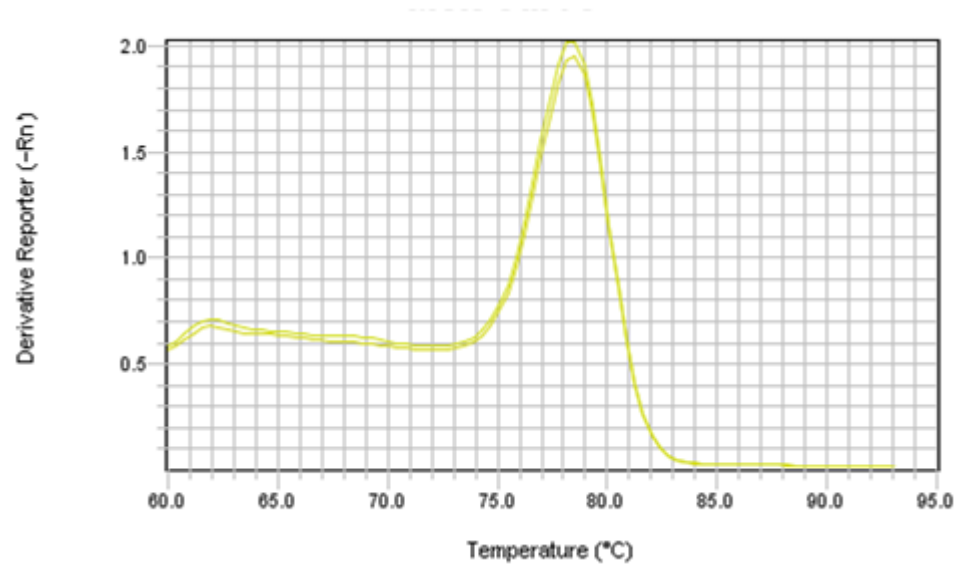
temperaturas as esperadas para cada gene. Também se verificou, nesta curva, a ausência de *hairpins* que indicam uma eventual contaminação da reação ou a formação de dímeros de primer (Figura 9).



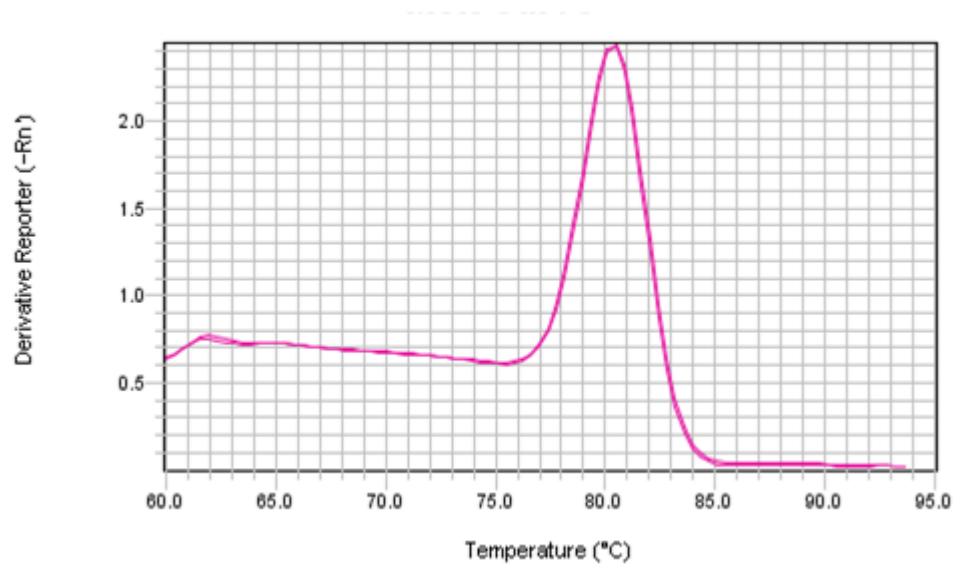
Beta-actina (150/150)



EEF1-α (150/150)



rRNA 18S (150/150)



HSP70_Tru (150/150)

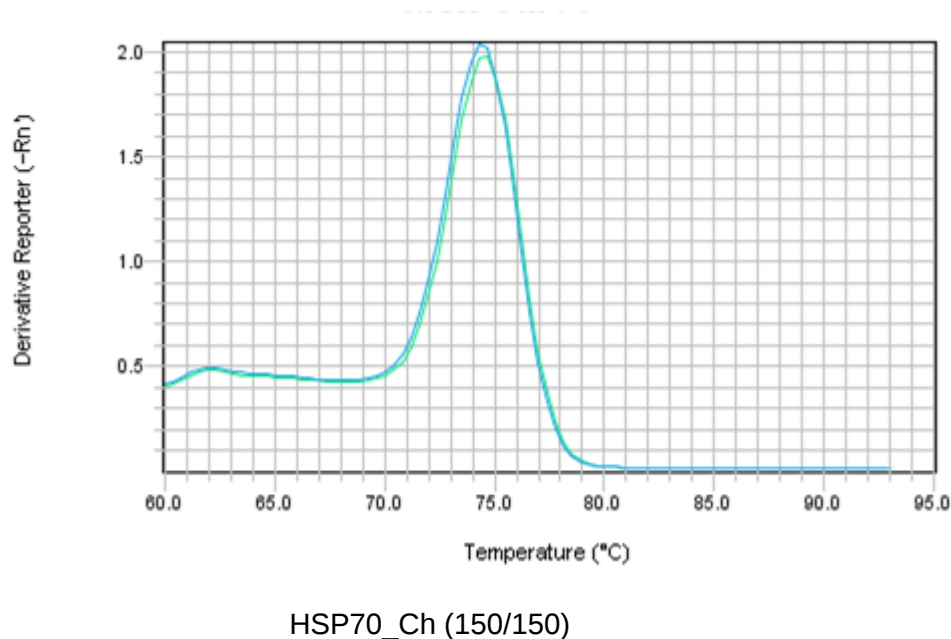
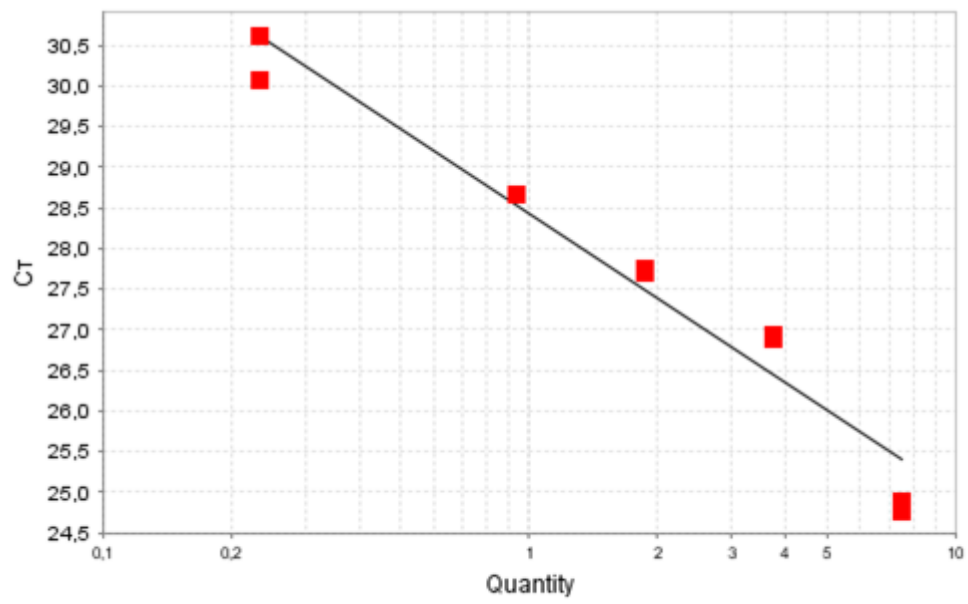


Figura 9. Curva de dissociação, em duplicata, para os genes de referência (Beta Actina, $EEF1-\alpha$, rRNA 18S) e alvo (HSP70_Tr, HSP70_Ch). Entre parênteses estão às concentrações escolhidas para os iniciadores (F/R).

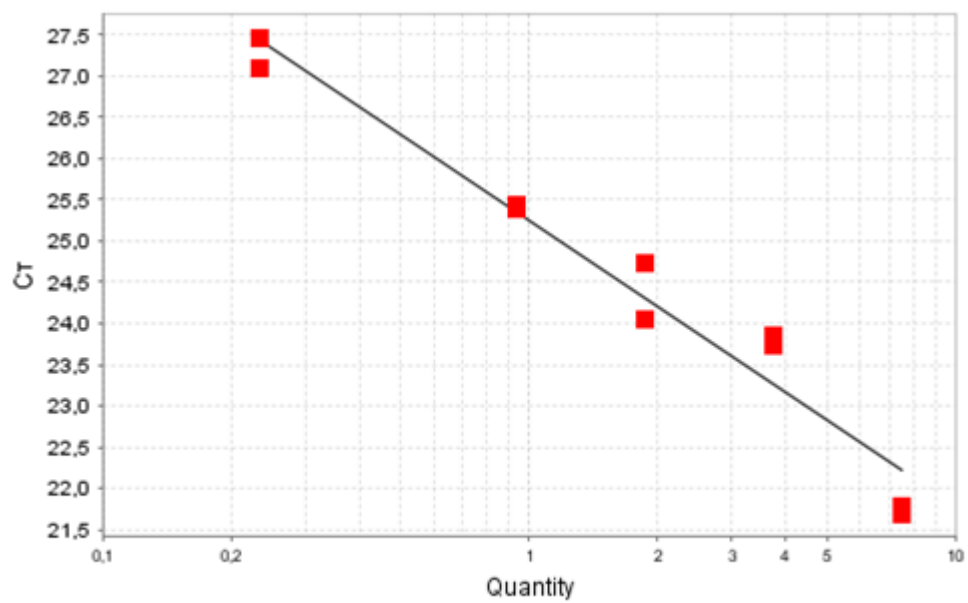
2.3.2 Curva de eficiência de amplificação da PCR Quantitativa em Tempo Real

Os valores de slope para os genes avaliados provenientes do tecido hepático do pacu (*P. mesopotamicus*) variaram entre -3,17 e -3,57; com eficiências entre 90,28% e 106,73%. Os valores de Ct foram corrigidos pela eficiência ajustando o *threshold*. Foram tirados do gráfico os pontos que apresentaram incoerências de amplificação. Na Figura 10 estão detalhadas outras características da curva de eficiência, mostrando que no presente trabalho, todos os genes obtiveram resultados de eficiência dentro dos limites estabelecidos, portanto, os mesmos puderam se analisar pelo método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$).



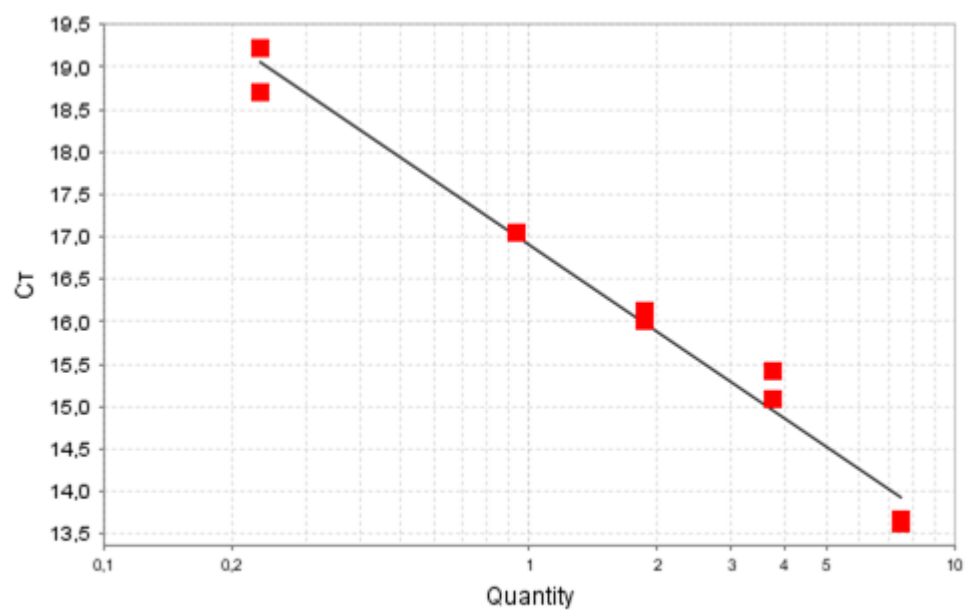
Target: BETA **Slope: -3,464** **Y-Inter: 28,433** **R²: 0,955** **Eff%: 94,391**

Beta-actina

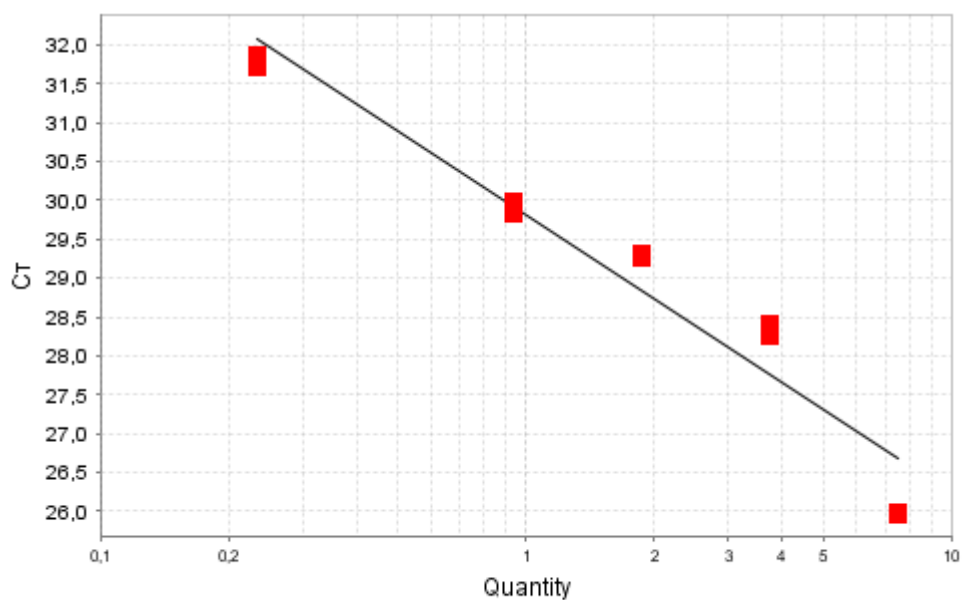


Target: EEf1 **Slope: -3,465** **Y-Inter: 25,257** **R²: 0,959** **Eff%: 94,35**

EEf1-α

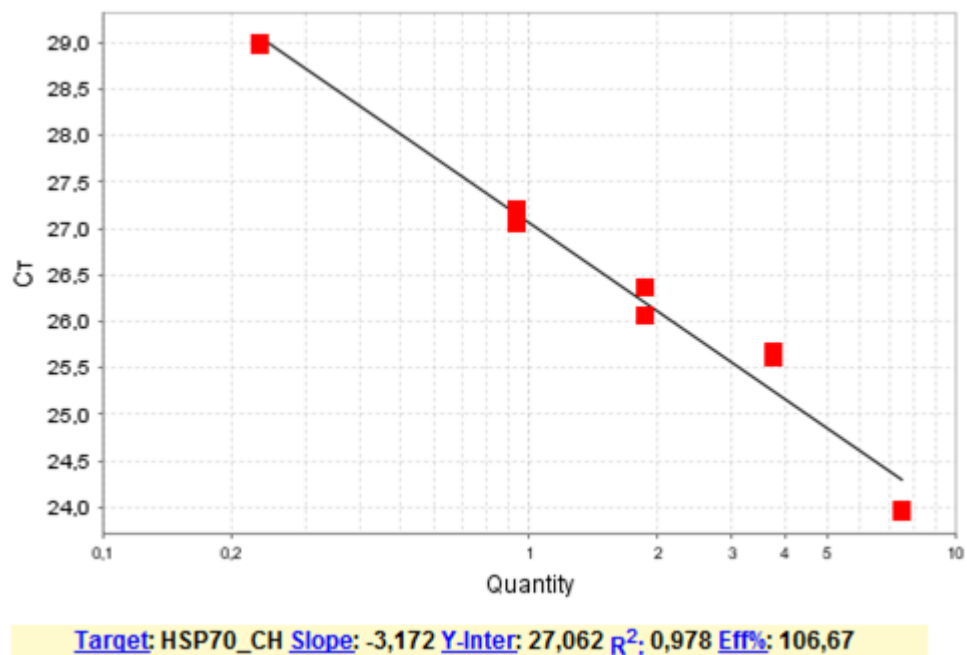


rRNA 18S



Target: HSP70_TR Slope: -3,579 Y-Inter: 29,823 R^2 : 0,939 Eff%: 90,283

HSP70_Tru



HSP70_Ch

Figura 10. Curva de eficiência, coeficiente angular da reta (*slope*), y-intercepto, coeficiente r^2 e eficiência obtidos para os genes de referência (Beta Actina, EEF1- α , rRNA 18S) e alvo (HSP70_Tru, HSP70_Ch).

2.3.3 Escolha do Gene de Referência

O gene endógeno com maior estabilidade foi o EEF-1 α , apresentando a menor variabilidade (0,56) em comparação com os outros genes candidatos (18S rRNA = 1,36; β -actina = 1,75) (Figura 11).

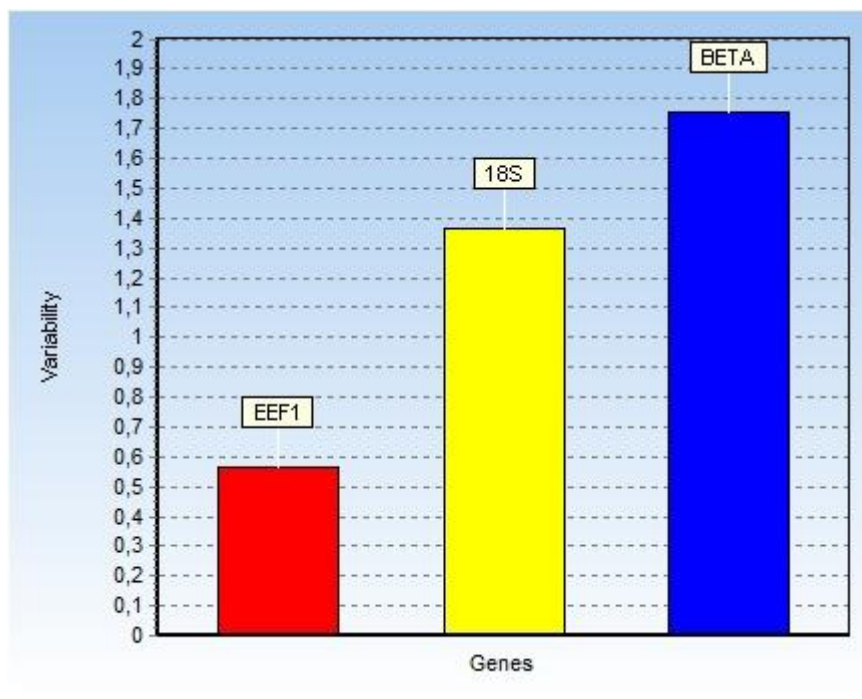


Figura 11. Variabilidade dos genes de referência (Beta Actina, EEF1- α , rRNA 18S) em amostra de tecido hepático de pacu (*P. mesopotamicus*) testados através do programa NormFinder.

2.3.4 Análise estatística da expressão do gene *hsp70* em juvenis de pacu injetados com péletes de cortisol

A partir do cDNA sintetizado, realizaram-se as reações de qPCR em tempo real. Com base nos resultados das amplificações, houve a necessidade de suprimir duas repetições biológicas por cada tratamento por apresentar valores de Ct com incoerências de amplificação que não permitiram sua validação como dados confiáveis. Isso provavelmente foi causado por problemas na síntese de cDNA dessas amostras.

Como ilustrado na figura 12, o gene *hsp70-tr* do pacu teve uma expressão estatisticamente significativa 24 horas após a injeção de cortisol exógeno. O

gene *hsp70-tr* foi 19,6 vezes mais expresso 24 horas após a injeção de 50 µg/g de cortisol em relação ao grupo no tratado (basal). A diferença significativa na expressão do gene *hsp70-ch* no pacu foi evidente ao nível de confiança de 90%. O gene *hsp70-ch* foi 28,75 vezes mais expresso 24 horas após o implante de cortisol em relação ao grupo não tratado.

A correlação entre a expressão dos dois genes revelou que os dois estão tendo um comportamento semelhante. Por tanto, poderia se especular que se trata de um mesmo gene, só que flanqueando regiões distintas. (Coeficiente de correlação de Pearson, $r=0.929$, $p<0.001$).

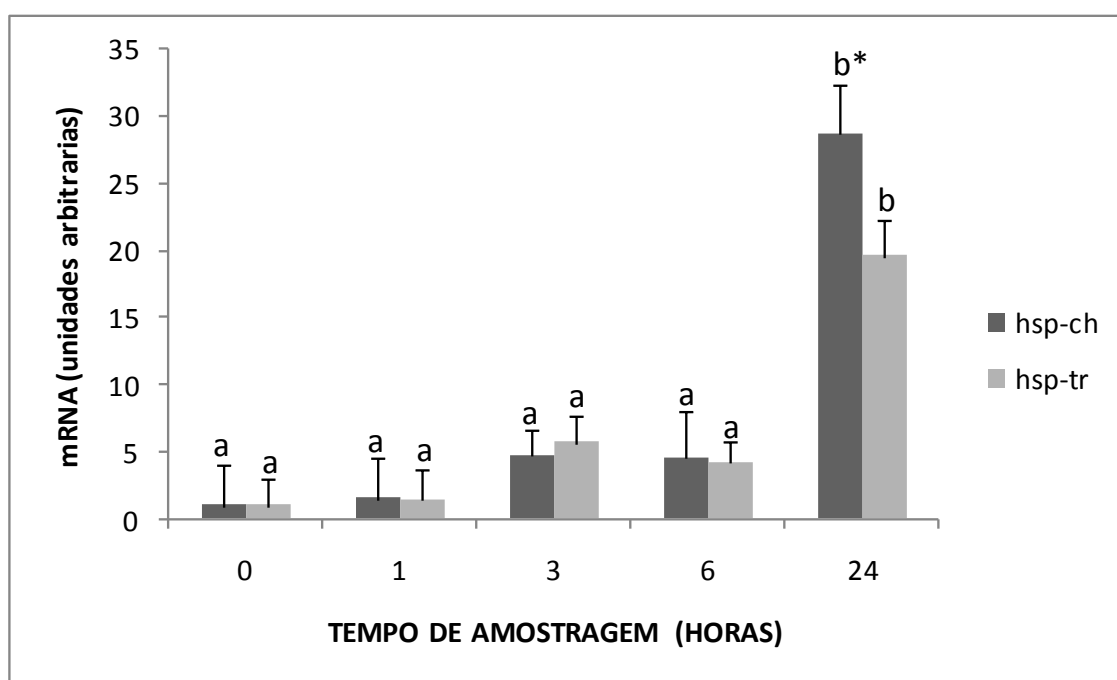


Figura 12. Quantificação relativa do gene *hsp70* (n=6) em juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) injetados com péletes de cortisol. Os dados de Ct foram normalizados com o gene *EEF-1 α* e foi usado como calibrador a amostra basal ou zero hora (sem veículo nem cortisol). Os valores de expressão relativa foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gene *hsp-ch* está baseado na forma constitutiva do gene a partir do tetra mexicano (Characidae), embora que o gene *hsp-tr* está baseado na forma induzível a partir da truta. Médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras verticais representam desvio padrão. O asterisco indica diferença estatística com $\alpha = 0,1$.

DISCUSSÃO

Este estudo utilizou a administração de cortisol exógeno, por implante intraperitonal de péletes de manteiga de cacau contendo cortisol, como ferramenta para simular uma condição hormonal de estresse e avaliar seu efeito na expressão de genes das HSPs, uma manifestação molecular considerada como resposta secundária de estresse (BASU et al., 2001). Essa metodologia de implantes de cortisol tem sido bastante utilizada em peixes (PICKERING e DUSTON, 1983; FEVOLDEN et al., 1991; SPECKER et al., 1994; BASU et al., 2001; BARRETO et al., 2006; GADAN et al., 2012; O'CONNOR et al., 2010; VIJAYAN et al., 1997; CHASIOTIS, 2012), entretanto ela pode ser limitada pois não representa a resposta completa do estresse que envolve, inicialmente, a ativação do eixo sistema nervoso autônomo e tecido cromafim, com liberação de catecolaminas, hormônios responsáveis pela liberação inicial de glicose, aumento da perfusão sanguínea nas brânquias e subsequente desbalanço iônico, além de contração esplênica e aumento do número de células sanguíneas na circulação (WENDELAAR BONGA, 1997). Esta limitação pode ter sido responsável pela ausência de alterações nos indicadores iônicos nos peixes deste estudo. A resposta da glicose circulante observada no pacu acompanhou as elevações do cortisol no sangue, confirmando sua conhecida ação proteolítica e gliconeogênica (MOMMSEN et al., 1999).

Neste estudo, foram testadas duas concentrações de cortisol nos péletes (50 e 100µg/g), e as concentrações circulantes do hormônio observadas em diferentes tempos após o implante foram muito superiores ao que se observa em condição de estresse causada por manejos ligados ao processo de criação na

mesma espécie. Níveis de cortisol inferiores a 46 µg/dL em pacus submetidos a manuseio foram descritos por MARTINS et al. (2000) e, em indivíduos da mesma espécie, as concentrações de cortisol após transporte não superaram os 20 ng/mL (TAKAHASHI et al., 2006). Já, valores abaixo de 60 ng/g de cortisol tecidual foram relatados em pacus submetidos a exposição aérea (BILLER et al., 2008). Do mesmo modo, concentrações inferiores a 140 ng/mL de cortisol sérico foram encontrados em juvenis de pacu estressados por perseguição, captura e exposição aérea (ABREU et al., 2009). Em futuros estudos, as concentrações incluídas nos péletes poderão ser até 50% da utilizada no presente estudo.

Comparando os resultados do presente estudo com outros que utilizaram a mesma metodologia e concentrações de cortisol exógeno, observa-se uma diferença na liberação do hormônio para o sangue. No presente estudo, o implante de 50µg/mL foi suficiente para que o cortisol circulante atingisse as mesmas quantidades de cortisol observadas em estudos que utilizaram implantes com concentrações superiores. CHASIOTIS e KELLY (2012) utilizaram 400µg/mL para atingir 446,4ng/mL de cortisol circulante em peixe dourado, a 18°C, enquanto que os níveis de cortisol em esturjão foram inferiores a 30 ng/mL sendo injetados com péletes de 5mg/kg de peso a temperatura 15°C (POURSAEID et al., 2012). Esta diferença pode ser proveniente das diferenças de temperatura da água onde vivem os peixes modelos destes estudos.

Nossos resultados mostram a importância da filogenia das espécies nas técnicas de identificação de genes de interesse. Os oligonucleotídeos iniciadores que melhores eficiências tiveram foram os mais próximos à ordem do pacu. No início deste estudo, não havia qualquer informação a respeito da sequência do

gene na espécie modelo, por tanto, foi necessário o alinhamento de espécies de ordens próximas (characiforme, salmoniformes, cypriniformes, perciformes) para partir de sequências conservadas. Com base nisso, foram obtidos primers para as reações de amplificação do segmento, que depois de sequenciado foi confirmado nas bases de dados públicas (*A. mexicanus*: 87% de similaridade com *Ctenopharyngodon idella*, acesso NCBI: JF436930; *Hypophthalmichthys nobilis*, acesso NCBI:HM560973.1; *Cyprinus carpio*, acesso NCBI:AY219845; Truta arco Iris: 90% de similaridade com *Erythroculter ilishaeformis*, acesso NCBI: EU693910.1; *Clarias macrocephalus*, acesso NCBI: JX112294.1; *Ictalurus punctatus*, acesso NCBI: NM_001200273.1).

A expressão dos genes *hsp70-ch* e *hsp70-tr* do pacu, determinada pela quantificação do mRNA, mostrou pequeno aumento numérico a partir de 3 horas após o implante, mas foi mais expressiva 24 horas depois do implante dos péletes contendo o hormônio. De acordo com CURRIE (2011), é difícil generalizar a evolução temporal da resposta ao estresse gerado por hsp's em peixes porque é uma resposta muito espécie-específica, e tecido-específica, bem como dependente do HSP particular a ser estudado. Existe também um elemento temporal para a resposta estressora, que dependente de sua intensidade, e neste estudo, como já aventado anteriormente foi utilizado uma metodologia que pode ser limitada para reproduzir umas condições de estresse.

De acordo com IWAMA et al. (2004), alguns estudos têm explorado a possível relação direta entre as respostas de estresse fisiológico e celular em peixes. Estes estudos têm demonstrado que os hormônios esteróides, incluindo cortisol, podem ter uma influência direta sobre a resposta ao estresse celular. Os

níveis de cortisol plasmático atenuaram a resposta de estresse da *hsp30* em truta (*Oncorhynchus clarki clarki*) (ACKERMAN et al., 2000), da *hsp 70* em fígado e brânquias de truta arco-íris, da *hsp70* em brânquias de tilápia (BASU et al., 2001.), do mRNA da *hsp90* em cultura de hepatócitos de truta arco-íris (SATHIYAA et al., 2001) e da *hsp70* em cultura de hepatócitos de tilápia (BOONE e VIJAYAN, 2002).

BASU et al. (2003) mostraram uma ligação funcional e estrutural entre *hsp70* e o receptor glicocorticóide em truta arco-íris. Eles também demonstraram que o heterocomplexo receptor glicocorticóide contém *hsp70* e que a associação entre a *hsp70* e o receptor glicocorticóide pode ser alterado de acordo com o estressor. Em nosso estudo, observamos que a expressão gênica do gene *hsp70* até a sexta hora de amostragem é pequena, mas torna-se bastante expressiva às 24 horas de observação, quando já ocorre uma redução nas concentrações de cortisol circulante, embora ainda em níveis superiores aos observados nos peixes controle. Nossos dados sugerem uma relação inversa entre os níveis de cortisol sérico e a expressão do gene *hsp70*, como demonstrado em estudos anteriormente citados.

Com base na literatura, a expressão gênica das HSPs pode não ser indicadora de estresse dependendo do tipo de estressor ao qual o peixe é exposto. Por exemplo, enquanto o manuseio e os procedimentos de amostragem podem afetar os indicadores comuns de resposta de estresse, como os níveis de cortisol sanguíneo, já foi demonstrado que o estresse de manipulação não altera os níveis de *hsp70* no fígado de truta arco-íris (VIJAYAN et al., 1997), nem os de *hsp60* no músculo, brânquias e coração da mesma espécie (WASHBURN et al.,

2002). ZARATE e BRADLEY (2003) mostraram, ainda, que as formas comuns de estressores relacionados com a larvicultura (exposição à anestesia, formalina, hipóxia, hiperóxia, estresse por captura, densidade de estocagem, restrição alimentar, estresse térmico) não alteraram os níveis de *hsp30*, *hsp70* e *hsp90* no salmão do atlântico (*Salmo salar*).

Com base neste estúdio podemos concluir que a quantificação da expressão de genes relacionados com estresse é uma ferramenta válida, mas precisa ser aprimorada. A partir desta pesquisa pode se afirmar que a expressão do gene *hsp70* em juvenis de pacu sob condições específicas do estudo acontece 24 horas após implante de cortisol. Contudo, estudos posteriores devem visar à identificação mais detalhada do gene, discriminando entre as formas constitutivas e induzíveis, com base na informação fornecida neste trabalho. Novos estudos poderão focar na expressão de genes relacionados aos receptores glicocorticóides, sendo eles genes primordiais que desencadeiam a resposta celular de estresse em peixes num nível anterior aos genes *hsp*'s aqui estudados. Este estudo identificou um novo gene para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

REFERÊNCIAS

ABREU, J.S.; TAKAHASHI, L.S.; HOSHIBA, M.A.; URBINATI, E.C. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. Brazilian Journal of Biology, v. 69(2), p.415-421, 2009.

ACKERMAN, P. A.; FORSYTH, R. B.; MAZUR, C. F.; IWAMA, G. K. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.23, p. 327-336, 2000.

ACKERMAN, P.A.; IWAMA, G.K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 13, p.173-180, 2001.

ALMEIDA, F.L.A.; PESSOTTIA, N.S.; PINHAL, D.; PADOVANIC, 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.

ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ØRNTØFT, 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.

BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C.; DE SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, v. 237, p. 229–236, 2004.

BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G. S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E. Influence of color

background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. *Aquaculture*, v. 288, p. 51-56, 2009.

BARRETO, R.E.; VOLPATO, G.L.; POTTINGER, T.G. The effect of elevated blood cortisol levels on the extinction of a conditioned stress response in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, v. 50, p. 484–488, 2006.

BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: ADAMS, S. M. (Ed). *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*. Ed: Bethesda, USA: American Fisheries Society, p. 111-148, 2002.

BASU, N.; NAKANO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *General and Comparative Endocrinology*, v. 124, p. 97–105, 2001.

BASU, N.; KENNEDY, C. J.; IWAMA, G. K. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology.A*, v.134, p. 655-663. 2003.

BILLER, J.D.; BENDHACK, F.; URBINATI, E.C. Stress responses in pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to repeated air exposure. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* v. 30 (1), p. 89-93, 2008.

BOONE, A.N.; VIJAYAN, M.M. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. C*, v. 132, p. 223-233. 2002.

BOSTOCK, J.; MCANDREW, B.; RICHARDS, R.; JAUNCEY, K.; TELFER, T.; LORENZEN, K.; LITTLE, D.; ROSS, L.; HANDISYDE, N.; GATWARD, I.;

CORNER, R. Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B (Biological Sciences)*, v. 365, p. 2897-2912, 2010.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquaculture Research*, v. 32, p.297-304, 2001.

CERICATO, L.; MACHADO, J.G.N.; KREUTZ, L.C ; QUEVEDO, R.M.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G. ; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L.J.G . Responsiveness of the interrenal tissue of jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology*, v. 149, p. 363-367, 2009.

CHASIOTIS, H.; KELLY, S.P. Effects of elevated circulating cortisol levels on hydromineral status and gill tight junction protein abundance in the stenohaline goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, v. 175, p. 277–283, 2012.

CHIRICO, W.J; WATERS, M.G.; BLOBEL, G.; 70 k heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, v. 332, p.805–810, 1988.

CURRIE, S. Heat shock proteins and temperature. In: FARRELL, A.P; CECH, JJ; RICHARDS, J.G; STEVENS, E.D. (Eds). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Ed: Elsevier, 2266p, 2011.

DEANE, E.E.; WOO, N.Y.S. Evidence for disruption of Na⁺-K⁺-ATPase and hsp70 during vibriosis of sea bream (*Sparus (=Rhabdosargus) sarba*). *Journal of Fish Disease*, v. 28, p.239–251, 2005a.

DEANE, E.E.; WOO, N.Y.S. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: modulated gene expression between warm and cold

temperature acclimation. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 330, p.776–783, 2005b.

DEANE, E.E.; WOO, N.Y.S. Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 21, p.153–185, 2011.

DESHAIES, R.J.; KOCH, B.D.; WERNER-WASHBURNE, M.; CRAIG, E.A.; SCHEKMAN, R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature, v. 332, p.800–805, 1988.

DIETZ, T.J.; SOMERO, G. N. The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 89, p. 3389-3393, 1992.

ELLIS, J. Proteins as molecular chaperones. Nature, v. 328, p. 378–379, 1987.

FAO. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>. Fish Statistics, fishery statistical collections: aquaculture production (1950–2008). Acessado em março de 2010.

FAGUNDES, M., URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. Aquaculture v. 276, p.112-119, 2008.

FEVOLDEN, S.E.; REFSTIE, T.; ROED, K.H. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v. 95, p. 53-65, 1991.

FUZZEN, M.L.M.; ALDERMAN, S. L.; BRISTOW, E.N.; BERNIER, N.J. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in rainbow trout and differential effects

of hypoxia on the endocrine and cellular stress responses during development. *General and Comparative Endocrinology*, v. 170, p. 604–612, 2011.

GADAN, K.; SINGH MARJARA, I.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; EVENSEN, Ø. Slow release cortisol implants result in impaired innate immune responses and higher infection prevalence following experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 32, p.637-644, 2012.

GEETHING, M.J; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. *Nature*, v. 355, p.33–45, 1992.

GEORGOPOULOS, C.; WELCH, W.J. Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 9, p.601–635, 1993.

HOOVEN, T.A.; YAMAMOTO, Y.; JEFFERY W.R. Blind cavefish and heat shock protein chaperones: a novel role for hsp90 α in lens apoptosis. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 48, p.731-738, 2004.

HORVÁTH, I; MULTHOFF, G; SONNLEITNER, A; VÍGH, L. Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Review of Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778, p. 1653–1664, 2008.

IDE, L. M., URBINATI, E.C., HOFFMANN, A. The role of olfaction in the behavioral and physiological responses to conspecific skin extract in a teleost fish, *Brycon cephalus*. *Journal of Fish Biology*, v. 63, p. 332-343, 2003.

IWAMA G.K; AFONSO, L.O. B; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P; NAKANO, K. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish?. Review. *The Journal of Experimental Biology*, v. 207, p.15-19, 2004.

- KIM, R.O.; RHEE, J.S.; WON, E.J.; LEE, K.W.; KANG, C.M.; LEE, Y.M.; LEE, J.S. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus sp.* *Aquatic toxicology*, v.101, p. 529-539, 2011.
- KONDO, H.; HARANO, R.; NAKAYA, M.; WATABE, S. Characterization of goldfish heat shock protein-30 induced upon severe heat shock in cultured cells. *Cell Stress & Chaperones*, v. 9 (4), p. 350–358, 2004.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, v.25, p.402–408, 2001.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat shock protein. *Annual Review of Genetics*, v. 22, p.631–677, 1988.
- LODISH, H.; ARNOLD, B.; MATSUDARIA, P.; KAISER, C.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. *Molecular Cell Biology: Protein structure and function*. 5 ed. 979p, 2003.
- LOPES, R.B.; PARAIBA, L.C.; CECCARELLI, P.S.; TORNISIELO, V.L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere*, v. 64, p.56–62, 2006.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha da resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, v. 22 (4), p. 545-552. 2000.

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.

O'CONNOR, C.M.; GILMOUR, K.M.; ARLINGHAUS, R.; MATSUMURA, S.; SUSKI, C.D.; PHILIPP, D.P.; COOKE, S.J. The consequences of short-term cortisol elevation on individual physiology and growth rate in wild largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 68, p. 693–705, 2011.

PELHAM, H.R.B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell, v. 46, p. 959–961, 1986.

PEREZ, J.C.; AFONSO, L.O.B.; JOHNSON, S.C.; CURRIE, S.; GAMPERL, A.K. The stress and metabolic responses of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge. Journal of Fish Biology, v.72, p. 899–916, 2008.

PERRY, S.F.; REID, S.G.; GILMOUR, K.M.; BOIJINK, C.L.; LOPES, J.M.; MILSOM, W.K.; RANTIN, F.T. A comparison of adrenergic stress responses in three tropical teleosts exposed to acute hypoxia. American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 287 (1), p. 188-197, 2004.

PICKERING, A.D. Growth and stress in fish production. Review in Aquaculture, v.111, p.51-63, 1993.

PICKERING, A.D; DUSTON, J. Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to Saprolegnia infection and furunculosis. Journal of Fish Biology, v. 23, p.163-175, 1983.

POURSAEID, S.; FALAHATKAR, B.; MOJAZ, B.A.; VAN DER KRAAK, G. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and

ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Huso huso*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v.163, p.111–119, 2012.

QUEIROZ, JF; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. World Aquaculture Magazine, v. 36, p. 45–50, 2005.

ROCHA, R.M., CARVALHO, E.G., URBINATI, E.C. Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã, *Brycon cephalus*, (Gunther, 1869), Teleostei: Characidae. Aquaculture Research, v. 35, p.245-249, 2004.

SANG, W.; MA, W.H.; QIU, L.; ZHU, Z.H.; LEI, C.L. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. Journal of insect physiology, v. 58, p. 830-836, 2012.

SATHIYAA, R.; CAMPBELL, T.; VIJAYAN, M.M. Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. Comparative Biochemistry and Physiology. B, v. 129, p. 679-685, 2001.

SELYE, H.A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, v. 138, p. 32. 1936.

SPECKER, J.L; PORTESI, D.M; CORNELL, S.C; VEILLETTE, P.A. Methodology for implanting cortisol in Atlantic salmon and effects of chronically elevated cortisol on osmoregulatory physiology. Aquaculture, v.121, p.181-193, 1994.

TAKAHASHI, L.S.; ABREU, J.S.; BILLER, J.D.; URBINATI, E.C. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus

juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. Acta Scientiarum. Animal Sciences (UEM), v. 28, p. 469-475, 2006.

TORT, L. Impact of stress in health and reproduction. In: FARRELL, A.P; CECH, JJ; RICHARDS, J.G; STEVENS, E.D. (Eds). Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Ed: Elsevier, 2266p, 2011.

URBINATI, E.C; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. Aquaculture, v. 229, p, 389-400, 2004.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Ed: TecArt, 533p, 2004.

URBINATI, E.C; GONÇALVES, F.D; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldissierotto, B.; Gomes, L.C. (Eds). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. Editora UFSM, Santa Maria, 606p., 2010.

VERMA, A.K.; PAL, A.K.; MANUSH, S.M.; DAS, T.; DALVI, R.S.; CHANDRACHOODAN, P.P.; RAVI, P.M.; APTE, S.K. Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings. Fish & Shellfish Immunology, v. 22 (5), p. 547–555, 2007.

VIJAYAN M. M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.; IWAMA G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 116C, p. 89–95, 1997.

WASHBURN, B.S.; MORELAND, J.J.; SLAUGHTER, A.M.; WERNER, I.; HINTON, D.E.; SANDERS, B.M. Effects of handling on heat shock protein expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry, v. 21, p.557-560, 2002.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. Physiological Reviews, v. 77, p.591-625, 1997.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormonal responses to stress. In: FARRELL, A.P; CECH, J.J.; RICHARDS, J.G; STEVENS, E.D. (Eds). Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Ed. Elsevier, 2266p, 2011.

WESTWOOD, J.T.; CLOS J.; WU, C. Stress induced oligomerization and chromosomal localization of heat shock factor. Nature, v. 353, p.822–827, 1991.

ZARATE, J.; BRADLEY, T.M. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. Aquaculture, v. 223, p.175-187. 2003.

ZHANG, X.; PANG, H.; WU, Z.; JIAN, J. Molecular characterization of heat shock protein 70 gene transcripts during *Vibrio harveyi* infection of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. Fish Physiology and Biochemistry, v. 37, p.897–910, 2011.