

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

NÍVEIS DE FÓSFORO EM DIETAS PARA ZEBRAFISH *Danio rerio*

JULIANA MARA COSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU – SP
Novembro - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

NÍVEIS DE FÓSFORO EM DIETAS PARA ZEBRAFISH *Danio rerio*

JULIANA MARA COSTA
Engenheira Agrônoma

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Edivaldo
Pezzato

BOTUCATU – SP
Novembro – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C837n Costa, Juliana Mara, 1987-
 Níveis de fósforo em dietas para Zebrafish *Danio rerio*/
 Juliana Mara Costa. - Botucatu : [s.n.], 2015
 xii, 77 f. : ils., fots. color., grafs., tabs.

 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
 culdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
 2015
 Orientador: Luiz Edivaldo Pezzato
 Inclui bibliografia

 1. Peixe ornamental - Alimentação e rações. 2. Fósforo
 na nutrição animal. 3. Ossos - Anomalias. 4. Expressão
 gênica. I. Pezzato, Luiz Edivaldo. II. Universidade Esta-
 dual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botu-
 catu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III.
 Título.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.*

Marcel Proust

DEDICATÓRIA

“À Deus, aos meus pais Lair e Josefina, aos meus mestres, especialmente ao meu orientador Luiz E. Pezzato, ao meu namorado, Samir M. Kadri, e à todos os amigos e familiares.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e meu anjo da guarda, por ter conseguido atingir mais esta etapa de minha vida, de forma a atender os meus objetivos e de sentir-me orgulhosa de meus atos e metas alcançadas. E também, agradeço pelos ensinamentos obtidos em toda a minha vida, me tornando uma pessoa melhor a cada dia e pela maturidade e sabedoria para superar as dificuldades nos âmbitos pessoal e profissional.

Ao meu orientador professor Luiz Edivaldo Pezzato, por aceitar me orientar nesta pesquisa, abrindo as portas do laboratório AquaNutri, pela confiança, amizade, paciência, dedicação, auxílio e atenção durante todo o processo da elaboração desta pesquisa, principalmente no início, iluminando meus passos e sustentando minhas idéias e planos, dando todo o suporte necessário para a realização desta.

À professora Margarida M. Barros por me acolher no laboratório AquaNutri.

Ao professor Pedro M. Padilha, que se dispôs totalmente ao auxílio das análises no laboratório de química, bem como toda a equipe do laboratório que colaboraram para esta pesquisa, de modo especial ao Jose Cavalcante.

Aos meus colegas de pós graduação, pelos momentos de estudo, de descontração bem como os exemplos de superação, obrigada a cada um de vocês! Especialmente aos colegas e amigos do laboratório AquaNutri, Carol, Eric, Guilherme (Cachara), Igor, Jakeline, Mariucha, Pedro, Rafael, Rafael (Coxinha) e Renan, todos sempre dispostos a me ajudar. Obrigada pessoal!

À professora Dra. Laura S. O. Nakaghi e o aluno Nivaldo Ferreira do Nascimento, ambos do CAUNESP – Jaboticabal, que viabilizaram a diafanização dos peixes deste estudo. Muito obrigada pela ajuda e parceria!

Aos meus pais, pelo apoio em todos os momentos, pelos abraços e palavras durante as dificuldades passadas. Obrigada pela minha educação e pelas cobranças realizadas diariamente, pois sem essa insistente rigidez, as coisas poderiam ter tomado rumos diferentes! A saudade de vocês me estimulou a fazer mais e melhor, justificando e tirando proveito da distância nestes três anos longe de vocês.

Ao meu namorado Samir Moura Kadri, pelo apoio, ajuda, paciência e compreensão no decorrer do meu doutorado, pela confiança na minha capacidade e pelo auxílio nas análises de expressão gênica, bem como na redação desta pesquisa.

Aos meus avós paternos Ana e Serafim Costa, e os maternos Amália e Vicente Michelin, que não estão mais nesta esfera da vida, mas acredito que estavam acompanhando de perto a elaboração deste trabalho e espero que, de onde estejam, se sintam orgulhosos de mim.

E a você, leitor deste trabalho. Muito obrigado a todos que de alguma forma acrescentaram importância neste estudo.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	01
1 INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Espécie Estudada.....	02
1.2 Aspectos Nutricionais de Peixes Cultivados.....	03
1.2.1 Minerais.....	04
1.2.1.1 Fósforo.....	05
1.2.1.1 Exigência de fósforo para peixes.....	06
1.2.1.3 Disponibilidade de fósforo.....	07
1.3 Anomalias esqueléticas em peixes.....	08
1.3.1 Deformidades Craniais.....	09
1.3.2 Deformidades Vertebrais e Espinhais.....	10
1.4 Expressão Gênica.....	10
1.5 Proteínas Dependentes da Vitamina K.....	11
1.5.1 Osteocalcina.....	12
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO 2 EXIGÊNCIA DIETÁRIA DE FÓSFORO PARA ZEBRAFISH	
(<i>Danio rerio</i>).....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
<i>Animais.....</i>	24
<i>Experimento 1.....</i>	24
<i>Dietas.....</i>	25
<i>Experimento 2.....</i>	25
<i>Análises Químicas e Bromatológicas.....</i>	26
<i>Parâmetros de Desempenho Produtivo.....</i>	27
<i>Análises Histológicas.....</i>	27
<i>Deformidades.....</i>	28
<i>Análise Estatística.....</i>	28

RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 3 ANOMALIAS ESQUELÉTICAS EM ZEBRAFISH ALIMENTA-	
DOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE FÓSFORO.....	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
INTRODUÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
<i>Animais.....</i>	<i>53</i>
<i>Experimento.....</i>	<i>53</i>
<i>Dietas.....</i>	<i>54</i>
<i>Diapfanização.....</i>	<i>54</i>
<i>Deformidades esqueléticas.....</i>	<i>55</i>
<i>Avaliação da expressão gênica.....</i>	<i>55</i>
<i>Estatística.....</i>	<i>57</i>
RESULTADOS.....	57
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CAPÍTULO 4.....	77
IMPLICAÇÕES.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Composition of six experimental diets for zebrafish.....	37
Table 2. Whole-body composition of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels ¹	38
Table 3. Percentage of fishes with bone malformations: cranial, craniofacial, lordosis, scoliosis, caudal fin insertion (CFI), exophthalmia and all previous (AP) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.....	39
Table 4. Bone tissue thickness in the medial head (MH) and spine end (SE) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.....	40

CAPÍTULO 3

Table 1. Composition of six experimental diets for zebrafish.....	67
Table 2. Oligonucleotides sequences used and details.....	68
Table 3. Percentage of fishes with vertebral anomalies: parallelism absence between neural and haemal spines, partial fusion neural and haemal spines, spines absence fusion, intervertebral spacing normal and vertebral compression of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.....	69
Table 3. Chi-square test for craniofacial anomaly of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.....	70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figure 1. Performance of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. A – Feed conversion (FC); B – Specific growth rate (SGR); C - Growth (G) e D - Length (L).....	41
Figure 2. Percentage of fishes with vertebral deformities: lordosis, scoliosis, spine end (SE) and all previous (AP) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.....	42
Figure 3. Percentage of fishes with cranial, craniofacial and exophthalmia deformities of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.....	44
Figure 4. Bone tissue thickness in the medial head (MH) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels (microns). A – T1; B – T2; C – T3; D – T4 %; E – T5 %; F – T6%. Scale 250µm.....	46
Figure 5. Bone tissue thickness in the spine end (SE) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels (microns). A – T1; B – T2; C – T3; D – T4 %; E – T5 %; F – T6%. Scale 250µm.....	47

CAPÍTULO 3

Figure 1. Vertebrae and spines anomalies of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. 1A – the arrow show the partial fusion in neural spines; 1B – partial fusion in haemal spines; 2 – neural spine absence fusion; 3 – parallelism absence between neural and haemal spines; 4 – normal spine end; 5 – spine end anomaly (the track represent the estimated normality); 6 – ankylosis. Scale 500µm.....	71
Figure 2. Scoliosis and lordosis intensity boxplot of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. Medians with different superscript letter are significantly different (Kruskal Wallis test, $P < 0.0001$).....	72
Figure 3. Skeletal anomaly. A – lordosis; B – scoliosis. The track represent the estimated normality. Scale 500µm.....	73
Figure 4. Craniofacial anomaly. A – normal head; B – lower mandible larger than upper mandible. Scale 500µm.....	74

Figure 5. Anchylosis and anormal spine end (SE) boxplot of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. Medians with different superscript letter are significantly different (Kruskal Wallis test, anchylosis ($P \leq 0.0001$) e SE ($P \leq 0.003$)).	75
Figure 6. Relative osteocalcin (Oc) gene expression (RGE) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.	76

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécie Estudada

Nativo das bacias hidrográficas do Ganges e Brahmaputra, localizadas no nordeste da Índia (SPENCE et al., 2007a), o zebrafish (*Danio rerio*) pertence à família Cyprinidae (NELSON, 1994), tem como habitat águas dulcícolas e lênticas (FANG, 2001), como áreas de várzea. Tem vida média de 42 meses, com relatos de indivíduos de 66 meses de idade (GERHARD et al., 2002; KISHI et al., 2003).

Em condições laboratoriais (28,5 °C e 14h claro e 10h escuro), o zebrafish possui rápido desenvolvimento, sendo que a embriogênese ocorre 24h após a fertilização (DAHLM, 2002), a eclosão das larvas entre 2-3 dias após a fertilização, e a transição da fase larval para juvenil ocorre em cerca de 30 dias (KIMMEL et al., 1995). Atinge a maturidade sexual a partir de 10 semanas após a eclosão (EATON; FARLEY, 1974a), e sob condições favoráveis sua desova é parcelada (EATON; FARLEY, 1974b). Assim, a alta capacidade reprodutiva e o curto intervalo de geração são características vantajosas para seu uso laboratorial sobre outras espécies de peixes que possuem intervalo longo, como algumas espécies de salmonídeos, que pode ser de 2 a 4 anos (WEGRZYN; ORTUBAY, 2009).

Esse peixe é estudado desde o início do século XIX, quando foi descrito por Francis Hamilton (SPENCE et al., 2007a), pesquisa que originou o livro "*An Account of the Fishes Found in the River Ganges*", que descreve aspectos particulares de seu habitat e principais alimentos ingeridos.

De hábito alimentar onívoro, a base da alimentação natural do zebrafish consiste de zooplâncton e insetos, sendo comumente encontrados em estudos de conteúdo estomacal o fitoplâncton, algas filamentosas e escamas de peixes (MCCLURE et al., 2006; SPENCE et al., 2007b).

Quanto ao trato digestório, seu intestino é longo e não possui estômago verdadeiro (ULLOA et al., 2011), o que reduz a ação enzimática na digestão do alimento. A ausência da digestão na fase ácida pode afetar negativamente a disponibilidade dos nutrientes contidos no alimento, reduzindo seu valor biológico (NRC, 2011).

1 É atualmente um dos modelos biológicos mais utilizados em estudos em
2 toxicologia, neurobiologia e genética molecular (WHIPPS et al., 2015), devido à ampla
3 variedade de ferramentas moleculares e informações disponíveis para sua análise
4 genômica (JOHNSTON et al., 2008). Propõe-se também que este seja utilizado como
5 organismo modelo para estudos de nutrição e crescimento em peixes, por reduzir custos,
6 tempo e espaço necessários para os testes (RIBAS; PIFERRER, 2013). Dentre as
7 características que a promove uma das espécies mais promissoras para uso em biotérios,
8 destacam-se o tamanho dos animais, desenvolvimento rápido com larvas transparentes e
9 sua alta produção de ovos (BIGA; GOETZ, 2006).

10 Apesar de seu crescente uso como animal de biotério e peixe ornamental,
11 poucos estudos são realizados para determinar a exigência nutricional do zebrafish
12 (LAWRENCE, 2007), não havendo dieta balanceada para a espécie. A maioria das
13 pesquisas não relatam a composição da dieta fornecida, e em grande parte os alimentos
14 fornecidos são dietas de peixes de corte ou ração comercial para peixes ornamentais
15 (ULLOA et al., 2011), ambos podendo fornecer em excesso ou deficiência os nutrientes
16 e a energia.

18 **1.2 Aspectos Nutricionais de Peixes Cultivados**

20 Pela restrição ao alimento natural, a qualidade da dieta é fundamental para os
21 animais cultivados. Este fato faz da alimentação um dos fatores de maior importância na
22 administração das criações, influenciando a taxa de crescimento, sanidade e qualidade
23 do organismo cultivado (NRC, 2011). Deste modo, pesquisas têm sido desenvolvidas a
24 fim de melhor definir a exigência nutricional das espécies de interesse econômico,
25 visando a melhor assimilação dos nutrientes, refletindo em menores custos de produção,
26 maior lucratividade e mitigação de impactos ambientais. Além disso, para o melhor
27 entendimento das exigências nutricionais dos peixes ornamentais, estudos devem ser
28 realizados para cada fase da vida: larval, juvenil e adulta, de acordo com a espécie
29 estudada (LAWRENCE, 2007).

30 A elaboração da dieta adequada a ser fornecida deve visar a máxima produção,
31 sendo que seus nutrientes e energia devem atender à exigência nutricional dos animais
32 sem deficiência ou excesso, não acarretem em custos adicionais e danos desnecessários

ao ambiente. Como outros setores da cadeia animal, a piscicultura ornamental tem sua expansão atrelada a otimização dos sistemas de produção e ao emprego de tecnologias específicas, como por exemplo, o conhecimento das exigências nutricionais de cada espécie para formulação de dietas balanceadas aos animais de cultivo (ZUANON et al., 2006). Para tal, devem-se considerar dois aspectos importantes, o de que a alimentação é responsável pelo desenvolvimento adequado e pela saúde do animal, e o excesso de nutrientes pelo fornecimento de dieta desbalanceada prejudica a qualidade da água e o desempenho produtivo dos peixes.

Informações consideradas como básicas para a nutrição animal, como a exigência de proteína, ainda são escassas para a maior parte dos peixes ornamentais de produção (SALES; JANSSENS, 2003). Esta falta de conhecimento provoca o uso de rações formuladas para peixes de corte no cultivo de espécies ornamentais, não considerando que estas são, em grande parte, cultivadas sob outros sistemas de produção e possuem exigências nutricionais diferentes. Pode-se utilizar rações de aquarismo, porém o uso desses alimentos disponíveis no mercado aumentam o custo de cultivo, podendo inviabilizar economicamente a atividade.

1.2.1 Minerais

Os seres vivos necessitam de aproximadamente 30 elementos naturais para sua manutenção e desenvolvimento, sendo que 96% do peso corporal animal é proveniente do carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, assim estes são exigidos em altas concentrações (McDOWELL, 1992). Já os minerais cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), cloro (Cl) e enxofre (S) representam 2,72% do peso corporal animal (HALVER, 1991; LALL, 2002).

Os peixes são capazes de absorver alguns minerais tanto das dietas quanto da água onde se encontram (LALL, 2002; NRC, 2011). O Ca, Mg, Na, K, ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co) e selênio (Se) são absorvidos pelos peixes diretamente quando dissolvidos na água, podendo atender assim suas exigências nutricionais (LALL, 1989). Já a absorção de P, cloro (Cl), S, manganês (Mn) e iodo (I) é oriunda, efetivamente, das dietas (WATANABE et al., 1997) ou proveniente de sua alimentação natural, uma vez que a quantidade disponível na água não é suficiente e sua utilização

1 pelos peixes é limitada (NRC, 2011). Os minerais são essenciais na formação da
2 estrutura esquelética, na manutenção dos sistemas coloidais e na regulação do equilíbrio
3 ácido-base, além de serem componentes de hormônios, enzimas e ativadores
4 enzimáticos (LALL, 2002).

5 Um fator importante da fisiologia de minerais é a interação existente entre eles
6 (FRACALOSS; CYRINO, 2013). Por possuírem propriedades físicas e químicas
7 semelhantes, os minerais competem por sítios de ligação em moléculas transportadoras
8 no sangue, de armazenamento em tecidos e em enzimas (NRC, 2011). Assim, o excesso
9 de um poderá prejudicar a utilização do outro, reduzindo sua absorção e disponibilidade,
10 e quando o mineral depende de outro para ser disponibilizado, a deficiência deste
11 acarretará na baixa funcionalidade do outro.

12

13 1.2.1.1 Fósforo

14

15 O P é um macromineral fundamental, e juntamente com o Ca são os principais
16 constituintes da porção inorgânica da dieta (NRC, 2011). Está presente nos animais na
17 sua forma orgânica e inorgânica, podendo estar ligado à proteínas e outros componentes
18 celulares. É componente essencial para a formação de coenzimas, fosfolipídios e ácidos
19 nucleicos, e atua diretamente na transferência de energia por meio da quebra do ATP
20 para os processos de metabolismo e contração muscular, além de compor a estrutura de
21 tecidos duros, como ossos, dentes e escamas (HARDY; GATLIN, 2002), e de tecidos
22 moles, onde é componente estrutural e de material genético (LALL, 2002).

23 A quantidade de P a ser adicionada em dietas para peixes está intimamente
24 relacionada com a constituição do trato gastrointestinal da espécie e da fonte de P
25 utilizada (STEFFENS, 1987). Devido à baixa produção de suco gástrico das carpas
26 (*Cyprinus carpio*), a disponibilidade do P presente no fosfato tricálcico é muito baixa
27 quando comparada com outras espécies de peixes, como por exemplo a truta arco-íris
28 (SATO et al., 1992). Desse modo, espécies sem estômago funcional absorvem de
29 forma mais ineficiente os fosfatos de baixa solubilidade, como é o caso do zebrafish.

30 A eficiência na retenção de P é influenciada pela quantidade ingerida do
31 mineral, diminuindo a retenção com sua maior ingestão (BUREAU; CHO, 1999),
32 refletindo em aumento do custo de produção e redução da qualidade de água de cultivo.

Além disso, o metabolismo de muitos minerais pelos peixes é influenciado pela concentração dietética e a concentração de íons dissolvidos no meio aquático, uma vez que estes podem influenciar sua osmoregulação, regulação iônica e o equilíbrio ácido-base (MOYLE; CECHE, 2000). Sua regulação pelos peixes é considerada como mais crítica e complexa se comparada à do cálcio havendo as etapas de absorção, armazenamento, mobilização e conservação do mesmo (LALL, 2002).

Na aquicultura o P age como regulador de consumo, relacionando-se à eficiência alimentar (MCDOWELL, 1992). Dietas deficientes em P podem proporcionar graves consequências em termos de desempenho reduzido e deformidades ósseas (NRC, 2011), bem como mortalidade e redução na qualidade de carcaça (WALDROUP, 1999).

Atualmente a maior parte das dietas para peixes são formuladas com base em ingredientes de origem vegetal, devendo-se atentar a presença do ácido fítico nestes alimentos.

Na fase de maturação dos vegetais ocorre a translocação do P presente no solo, na forma de ácido fítico, para as sementes. O ácido fítico ou fitato possui um grupo ortofosfato em sua molécula que é altamente ionizado, formando facilmente complexos com cátions, alguns aminoácidos e, ainda, com moléculas conjugadas de glicose, especialmente a do amido (DESHPANDE; CHERYAN, 1984).

Desse modo, parte do P é indisponível para os peixes, sendo necessária a adição de fitase, enzima que melhora a disponibilidade de P de alguns alimentos vegetais (GONÇALVES et al., 2007), ou adicionar outro ingrediente que forneça o mineral.

Quando em excesso o P é poluente ambiental, podendo influenciar não só o crescimento dos peixes como também afetar a disponibilidade de zinco (Zn) e manganês (Mn), alterando a concentração destes minerais no corpo e nas vértebras (PORN-NGAM et al., 1993; SATOH et al., 1997; SATOH, 2007). Um dos métodos mais econômicos e eficientes para diminuir a ação poluente do P na atividade é ajustar o consumo à real exigência dos animais nas diferentes fases de vida (LELLIS et al., 2004).

1.2.1.1 Exigência de fósforo para peixes

1 Os registros mais antigos de estudos referentes a exigência de P pelos peixes
2 relatam que no século XIX um pesquisador alemão chamado Knauth adicionou o
3 fosfato de cálcio a duas dietas testes para carpas na fase adulta, uma composta por
4 farinha de carne e farinha de milho, e a outra por farinha de carne e farinha de arroz, de
5 forma que fossem menos proteicas e mais energéticas do que as dietas utilizadas na
6 época para carpas juvenis. O pesquisador adicionou o mineral acreditando que a
7 redução de ingredientes proteicos por energéticos provocasse a diminuição dos teores de
8 Ca e P das dietas teste (FORBES; KEITH, 1914).

9 Desde então, estudos foram realizados objetivando avaliar o nível adequado de
10 suplementação de P para mais de 40 espécies de peixes, resultando em mais de 60
11 estudos publicados (PRABHU et al., 2013), sendo este o mineral essencial mais
12 estudado. Porém, estas pesquisas possuem variabilidade quanto a exigência nutricional,
13 uma vez que as conclusões se baseiam em diferentes parâmetros, e alguns relatam seus
14 resultados baseados em P total, não considerando a disponibilidade da fonte mineral
15 utilizada para a espécie estudada.

16 Com base nesses estudos, a suplementação de P em níveis adequados para cada
17 espécie de peixe é de grande importância, pois permite otimizar o crescimento e a
18 mineralização óssea, e concomitantemente reduzir a contaminação ambiental pelo
19 excesso do mineral nas dietas.

20

21 1.2.1.2 Disponibilidade de Fósforo

22

23 A eficiência de utilização dos minerais pelos peixes refere-se não somente a
24 análises químicas de seu conteúdo total na dieta, mas também da real efetividade
25 biológica do mineral. Diversos são os fatores que influenciam a disponibilidade dos
26 minerais, dentre os quais destacam-se o nível de inclusão, sua forma química, o
27 tamanho das partículas, as interações com outros nutrientes, presença de substâncias
28 inibidoras e/ou quelantes, o estado fisiológico e patológico do peixe, composição
29 química da água de cultivo, processamento da dieta e a espécie de peixe estudada
30 (ULLREY, 1995; LALL, 2002; NRC, 2011).

31 Assim, a disponibilidade dos minerais determina a eficiência do seu
32 aproveitamento pelos peixes, possibilitando a formulação de dietas que atendam com

1 maior precisão suas exigências nutricionais e proporcione menores impactos ambientais.
2 Diversas são as consequências da falta ou excesso de minerais, como por exemplo: a
3 suplementação excessiva dos minerais Ca e P causam a redução da disponibilidade de
4 Zn e catarata em juvenis de salmonídeos (RICHARDSON et al., 1986). Por outro lado,
5 dietas com restrição de P reduzem a concentração de Mg e Ca total no corpo e sinais
6 clínicos nos peixes de anorexia, letargia, coloração escura e redução no crescimento
7 (SHEARER; HARDY, 1987).

8

9 **1.3 Anomalias Esqueléticas em Peixes**

10

11 O esqueleto é uma reserva de Ca, P e outros íons que são disponibilizados para
12 o sangue e outros fluídos celulares (LALL, 2002). Devido à função dos minerais no
13 desenvolvimento ósseo, o autor ainda afirma que seu fornecimento abaixo da exigência
14 nutricional influencia negativamente o metabolismo ósseo, podendo originar
15 deformidades em diversas regiões do corpo dos peixes.

16 O Ca e o P estão intimamente relacionados com o desenvolvimento e
17 manutenção do sistema esquelético, bem como a estabilidade e dureza vertebral (LALL;
18 LEWIS-MC CREA, 2007). De acordo com os autores, apesar das concentrações
19 corporais se manterem estáveis, a regulação do P é considerada mais crítica se
20 comparada ao do cálcio devido à sua absorção, estocagem, mobilidade e conservação,
21 tanto em peixes de água doce como os marinhos.

22 As principais estruturas ósseas dos peixes são a cabeça e a coluna vertebral,
23 formada por vértebras, que por sua vez são estruturadas em espinhas neurais
24 (dorsalmente) e espinhas hemais (ventralmente) (MOREIRA et al., 2001).

25 Estudos referentes à incidência de anomalias esqueléticas em teleósteos
26 atribuem essas deformidades à diversos fatores, uma vez que é alta a variabilidade de
27 espécies, condições de cultivo e fases de desenvolvimento (BOGLIONE, 2013). Dentre
28 as possíveis causas, as mais comuns são condições abióticas desfavoráveis, alimentação
29 inadequada e fatores genéticos (LEPRÉVOST; SIRE, 2014), resultando em piora do
30 bem-estar animal, baixas taxas de crescimento, baixa resistência ao estresse e agentes
31 patógenos, bem como aumento do custo de produção (BOGLIONE et al., 2013).

Como a ingestão de P dietético é a principal fonte do mineral para a mineralização óssea, dietas deficientes do mineral podem ocasionar anomalias esqueléticas: avaliando a ocorrência de deformidade em zebrafish cultivados, Ferreri et al. (2000) constataram algum tipo de deformidade na região caudal em 100% dos animais, fornecimento de dietas deficientes de P para carpa (OGINO; TAKEDA, 1976; OGINO et al., 1979), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (OGINO et al., 1979), peixe branco europeu (*Coregonus lavaretus*) (VIELMA et al., 2002), arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) (ROY; LALL, 2003), e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (VIELMA; LALL, 1998; FJELLDAL et al., 2012), espécie que em cultivo pode apresentar deformidades em cerca de 17% dos peixes (SULLIVAN et al. 2007).

1.3.1 Deformidades Craniais

As deformidades craniais são muito comuns e ocorrem em grande parte das espécies de peixes cultivados (ARGÜELLO-GUEVARA et al., 2014), podendo acarretar danos fisiológicos e morfológicos, os quais podem elevar a taxa de mortalidade no cultivo ocasionando prejuízo econômico ao produtor.

A ontogenia das deformidades craniais pode estar relacionada à diversos fatores, podendo ter influência de mais de um fator na mesma anomalia para diferentes espécies de peixes, o mesmo fator pode provocar diferentes anomalias em diferentes espécies, a mesma anomalia na mesma espécie pode ser provocada por fatores diferentes, a maior sensibilidade de algumas espécies propicia o surgimento de deformidades, um fator causal específico pode ser compensado por outro, maior incidência de deformidades em diferentes áreas do corpo entre as espécie, o mesmo fator causal pode provocar deformidades em alguns elementos esqueléticos específicos porém não acometer todos os ossos do mesmo tipo e ossificação do mesmo indivíduo (BOGLIONE et al., 2013).

A deficiência mineral é uma das principais causas desta deformidade óssea (GEORGAKOPOULOU et al., 2007; VERHAEGEN et al., 2007; IZQUIERDO et al., 2010), principalmente pela relação Ca:P com o desenvolvimento e manutenção do sistema esquelético (LALL; LEWIS-MC CREA, 2007). Ainda não está esclarecido o

processo que provoca deformidades, porém estudos demonstram que se inicia, em sua maioria, na fase larval de desenvolvimento (MATSUOKA, 2003).

As deformidades craniais se manifestam em diferentes formas (COBCROFT et al., 2004). Uma delas é a má formação das mandíbulas, sendo que a primeira descrita foi a denominada *pinched*, caracterizada pelos pesquisadores como mandíbula apertada e posição dos arcos alterada (FRASER; de NYS, 2005). Outro tipo de má formação mandibular corresponde ao encurtamento da mandíbula superior (MATSUOKA, 2003), provocando o não fechamento correto da boca do peixe. Avaliando a influência de deformidades bucais em carpa comum, Kocour et al. (2006) observaram a incapacidade dos peixes acometidos em cortar os alimentos, constatando redução na ingestão de alimento e consequentemente efeito negativo no crescimento.

As deformidades bucais encontradas em menor frequência são a mordida em cruz, boca em forma de ventosa (BARAHONA-FERNANDES, 1982) e a síndrome da boca aberta (COBCROFT et al., 2001).

1.3.2 Deformidades Vertebrais e Espinhais

Um complexo de distúrbios ósseos acomete a coluna vertebral e suas espinhas. Das anomalias vertebrais destacam-se a compressão vertebral, o espaçamento entre as vértebras, espinhas hemais e neurais com fusão parcial (ROY; LALL, 2003) e composição anormal das espinhas vertebrais (fusão e paralelismo).

As anomalias na coluna vertebral mais notadas são as curvaturas: a lordose, devido ao desenvolvimento de ossos moles e pouco mineralizados (BAEVERFJORD et al., 1998), a compressão vertebral que resulta em escoliose; e a cifose (LALL; LEWIS-MC CREA, 2007). As espinhas são comumente afetadas devido ao baixo conteúdo mineral, fazendo esses tecidos ósseos frágeis e finos, e também pela constante exigência muscular dessa região para movimentos natatórios (SAKAMOTO; YONE, 1978)

1.4 Expressão Gênica

Como algumas deformidades são irreversíveis, se faz necessário o diagnóstico da deficiência antes dos sinais ósseos da baixa mineralização. Assim, a análise

molecular permite, por meio do uso de ferramentas de expressão genética, determinar tendências específicas e consistentes referente ao tratamento das anomalias, neste caso, referentes à influência dos diferentes níveis de P na expressão dos genes avaliados.

Dentre as proteínas relacionadas com a mineralização óssea, a osteocalcina (γ -ácido carboxiglutâmico - Bgp), é muito importante devido à sua função de atuar diretamente na inibição da calcificação dos ossos (ROY et al., 2001) e como reguladora da reabsorção óssea (HARADA; RODAN, 2003). É codificada pelo gene Oc, disponível na base de dados do GenBank com o código de acesso: NM_001083857. O gene que codifica a Oc já foi estudado no zebrafish (GAVAIA et al., 2006), sendo que sua sequência é considerada homóloga entre humanos e peixes (CANCELA et al., 1995; PINTO et al., 2001), o que faz do zebrafish um bom modelo para o estudo desta proteína.

1.5 Proteínas Dependentes da Vitamina K

Diversas proteínas dependentes da vitamina K (PDVK) já foram descritas, e na sua maioria estão associadas à estrutura óssea, à homeostase do cálcio e vistas como necessárias para a coagulação sanguínea (NELSESTUEN et al., 2000; BENZAKOUR, 2008; COUTU et al., 2008;). Tendo seu nome originário de sua principal função, regular a coagulação normal do sangue, as PDVK são proteínas secretoras encontradas na matriz extracelular ou nos fluidos corporais (BENZAKOUR, 2008).

As PDVK encontram-se em vários tecidos dos vertebrados, sendo encontradas apenas no osso duas proteínas Gla de extrema relevância: a proteína Gla da matriz (Mgp) e a osteocalcina (Oc ou proteína Gla do osso - Bgp) (NELSESTUEN et al., 2000).

Uma base fraca é carboxilada e após a oxigenação de KH^2 , se forma uma base forte intermediária (Figura 1). A base forte desprotona o γ -carbono à substrato Glu para gerar um carbanião intermediário, o qual posteriormente reage com CO_2 para formar o Gla (RISHAVY, 2004).

Após o processo de pós-tradução, os resíduos de ácido glutâmico (Glu) são convertidos em ácido γ -carboxiglutâmico, por meio da γ -carboxilase que utiliza a energia da oxigenação da vitamina K (PRICE et al., 1983; BERKNER, 2000;

BERKNER, 2005). Estes resíduos de proteína Gla têm a capacidade de se ligar ao cálcio, atuando como reguladores da deposição deste mineral (BERKNER, 2005).

Ainda há existência de outras proteínas dependentes da vitamina K, como por exemplo a proteína produzida pelo gene 6 (*gas 6*), relacionada ao controle de crescimento; as proteínas Gla ricas em prolina 1 e 2 com função na transdução de sinais, e a proteína Z, com função desconhecida (BERKNER, 2000). Ainda segundo a autora, a enzima carboxilase também pode ser considerada uma proteína dependente de vitamina K.

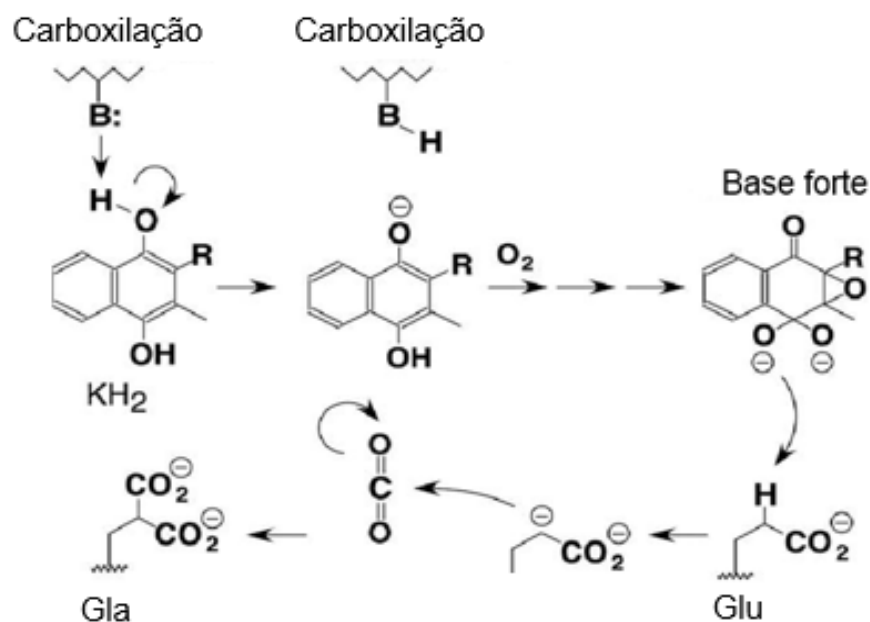


Figura 1. Reação de carboxilação dependente de vitamina K.

Fonte: Adaptado de Rishavy (2004).

1.5.1 Osteocalcina

A osteocalcina (BGP ou Oc) é a proteína não colágena mais abundante no osso, correspondendo à cerca de 60% do total das proteínas não colágenas em carpas (ROY et al., 2001), e que, segundo os autores, é a que mais exerce influência nas propriedades ósseas de carpas.

Devido à sua função, é considerada proteína específica de osso e está intimamente relacionada com a concentração de Ca e P, (ROY et al., 2001), apesar de já

ter sido encontrada no plasma sanguíneo e no rim (HAUSCHKA; REID, 1978; PRICE et al., 1981).

A Oc tem importante função quanto à qualidade do mineral depositado, sendo essencial para a correta maturação mineral do osso (BOSKEY et al., 1998). Funciona também como marcador de osteoblastos, uma vez que está associada a este tipo celular e é seu local de expressão (BOIVIN et al., 1990). Pode ainda, exercer a função de recrutar os osteoclastos, por meio do processo de quimioatração, regulando a deposição e manutenção de minerais no osso, aumentando a formação óssea e reduzindo a reabsorção óssea quando em quantidade abaixo do normal (ROY et al., 2001).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGÜELLO-GUEVARA, W.; BOHÓRQUEZ-CRUZ, M.; SILVA, A. Malformaciones craneales en larvas y juveniles de peces cultivados. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v.42, n.5, p. 950-962, 2014.
- BAEVERFJORD, G.; ÅSGÅRD, T.; SHEARER, K.D. Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and post-smolts. **Aquaculture Nutrition**, v.4, p. 1-11, 1998
- BARAHONA-FERNANDES, M.H. Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Types, prevalence and effect on fish survival. **Journal of Fish Biology**, v.21, p. 239-249, 1982.
- BENZAKOUR, O. Vitamin K-dependent proteins: functions in blood coagulation and beyond. **Thrombosis and Haemostasis**, v.100, p. 527-529, 2008.
- BERKNER, K.L. The vitamin K-dependent carboxylase. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 1877-1880, 2000.
- BERKNER, K.L. The vitamin K-dependent carboxylase. **Annual Review of Nutrition**, v.25, p. 127-149, 2005.
- BIGA, P.R.; GOETZ, F.W. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.291, n.5, p. 1327-1337, 2006.
- BOGLIONE C.; GISBERT E.; GAVAIA P.; WITTEN P.E.; MOREN M.; FONTAGNÉ S.; KOUMOUNDOUROS G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. **Aquaculture**, v.5, p. 121-167, 2013.
- BOIVIN, G.; MOREL, G.; LIAN, J.B.; ANTHOINE-TERRIER, C.; DUBOIS, P.M.; MEUNIER, P.J. Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. **Virchows Archive**, v.417, p. 505-512, 1990.
- BOSKEY, A.L.; GADALETA, S.; GUNDBERG, C.; DOTY, S.B.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of

- 1 osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. **Bone**,
2 v.23, p. 187-196, 1998.
- 3 BUREAU, D.P.; CHO, C.Y. Phosphorus utilization by rainbow trout (*Oncorhynchus*
4 *mykiss*): estimation of dissolved phosphorus waste output. **Aquaculture**,
5 Amsterdam, v.179, n.1-4, p. 27-140, 1999.
- 6 CANCELA, M.L.; OHRESSER, M.C.P.; REIA, J.P.; VIEGAS, C.S.B.;
7 WILLIAMSON, M.K.; PRINCE, P.A. Matrix Gla protein in xenopus laevis:
8 molecular cloning, tissue distribution, and evolutionary considerations. **Journal of**
9 **bone and mineral research**, v.16, n.9, p. 1611-1621, 2001.
- 10 COBCROFT, J.M.; PANKHURST, P.M.; SADLER, J.; HART, P.R. Jaw development
11 and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. **Aquaculture**, v.199 p.
12 267-282, 2001.
- 13 COBCROFT, J.M.; PANKHURST, P.M.; POORTENAR, C.; HICKMAN, B.; TAIT,
14 M.J. Jaw malformation in cultured yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. **New**
15 **Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v.38, p. 67-71, 2004
- 16 COUTU, D.L.; WU, J.H.; MONETTE, A.; RIVARD, G.E.; BLOSTEIN, M.D.;
17 GALIPEAU, J. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent
18 proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. **J Biol Chem**, v.283, p. 17991-
19 18001, 2008.
- 20 DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model
21 organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, v.8, p. 329-345, 2006.
- 22 DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M. Effects of phytate, divalent cations and their
23 implications on alpha-amylase activity. **Journal of Food Science**, v.49, p. 516-519,
24 1984.
- 25 EATON, R.; FARLEY, R. D. Growth and the reduction of depensation of zebrafish,
26 *danio rerio*, reared in the laboratory. **Copeia**, n.1, p. 204-209, 1974a.
- 27 EATON, R.; FARLEY, R.D. Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachy*
28 *danio rerio*, in the laboratory. **Copeia**, n.1, p. 195-204, 1974b.
- 29 FANG, F. Phylogeny and species diversity of the South and Southeast Asian cyprinid
30 genus *Danio* Hamilton (Teleostei, *Cyprinidae*). PhD Thesis, Stockholm University,
31 Stockholm, Sweden. 2001.
- 32 FERRERI, F.; NICOLAIS, C.; BOGLIONE, C.; BERTOLINI, B. Skeletal
33 characterization of wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters.
34 **Journal of Fish Biology**, v.56, n.1, p. 1115-1128, 2000.
- 49 FJELLDAL, P.G.; HANSEN, T.; ALBREKTSEN, S. Inadequate phosphorus nutrition
50 in juvenile Atlantic salmon has a negative effect on long-term bone health.
51 **Aquaculture**, v.334-337, p. 117-123, 2012.
- 52 FORBES E.B.; KEITH M.H. Phosphorus Compounds in Animal Metabolism.
53 Technical Series Bulletin, n. 5, Ohio Agricultural Experiment Station, Wooster, OH,
54 764p., 1914.
- 55 FRACALOSS, D.M.; CYRINO, J.E.P. 2013. Nutriaqua: nutrição e alimentação de
56 espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de
57 Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis.
- 58 FRASER, M.R.; DE NYS, R. The morphology and occurrence of jaw and operculum
59 deformities in cultured barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. **Aquaculture**, v.250, p.
60 496-503, 2005.
- 61 GAVAIA, P.J.; SIMES, D.C.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; VIEGAS, C.S.; PINTO, J.P.;
62 KELSH, R.N.; SARASQUETE, M.C.; CANCELA, M.L. Osteocalcin and matrix Gla

- 1 protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*):
2 comparative gene and protein expression during larval development through
3 adulthood. **Gene Expression Patterns**, v.6, p. 637-652, 2006.
- 4 GEORGAKOPOULOU, E.; ANGELOPOULOU, A.; KASPIRIS, P.; DIVANACH, P.;
5 KOUMOUNDOUROS, G. Temperature effects on cranial deformities in European
6 sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). **Journal of Applied Ichthyology**, v.23, p. 99-
7 103, 2007.
- 8 GERHARD, G.S.; KAUFFMAN, E.J.; WANG, X.; STEWART, R.; MOORE, J.L.;
9 KASALES, C.J.; DEMIDENKO, E.; CHENG, K.C. Life spans and senescent
10 phenotypes of zebrafish (*Danio rerio*). **Experimental Gerontology**, v.37, p. 1055-
11 1068, 2002.
- 12 GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; PADILHA, P.M.; BARROS, M.M.
13 Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação da
14 enzima fitase para tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.5, p.
15 1473-1480, 2007.
- 16 HALVER, J.E. **Fish nutrition and aquaculture diets** - Fish nutrition consultancy
17 report. FAO. Seattle, Washington. 1991, 24p.
- 18 HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone
19 mass. **Nature**, v.423, p. 349-355, 2003.
- 20 HARDY, R.W.; GATLIN III, D.M. Nutritional strategies to reduce nutrient losses in
21 intensive aquaculture. J.R. Tomasso (Ed.), **Aquaculture and the Environment in**
22 **the United States**, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 155-165, 2002.
- 23 HAUSCHKA, P.V.; REID, M.L. Vitamin D dependence of a calcium-binding protein
24 containing gamma-carboxyglutamic acid in chicken bone. **Journal of Biological**
25 **Chemistry**, v.253, p. 9063-9068, 1978.
- 26 IZQUIERDO, M.S.; SOCORRO, J.; ROO, J. Studies on the appearance of skeletal
27 anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional
28 quality of live preys. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p. 320-326, 2010.
- 29 JOHNSTON, I.; MACQUEEN, D.; WATABE, S. Molecular biotechnology of
30 development and growth in fish muscle. In: Tsukamoto, K.; Kawamura, T.;
31 Takeuchi, T.; Beard, T.D.; Kaiser, M. (eds) Fisheries for global welfare and
32 environment. 5th World Fisheries Congress, Scotland, p. 241-262, 2008.
- 33 KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING,
34 T.F. Stages of Embryonic-Development of the Zebrafish. **Developmental**
35 **Dynamics**, v.203, p. 253-310, 1995.
- 36 KISHI S.; UCHIYAMA J.; BAUGHMAN A.M.; GOTO, T.; LIN, M.C.; TSAI, S.B.
37 The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence.
38 **Experimental Gerontology**, v.38, n.7, p. 777-786, 2003.
- 39 KOCOUR, M.; LINHART, O., VANDEPUTTE, M. Mouth and fin deformities in
40 common carp: is there a genetic basis? **Aquaculture Research**, v.37, p.419-
41 422, 2006
- 42 LALL, S.P. The minerals. In: HALVER, J.E. (ed.) Fish nutrition, 2^aed., Academic Press
43 Inc., New York, p. 219-257, 2002.
- 44 LALL, S.P.; LEWIS-McCREA, L.M. Role of nutrients in skeletal metabolism and
45 pathology in fish - an overview. **Aquaculture**, v.267, p. 3-19, 2007.
- 46 LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**,
47 v.269, p. 1-20, 2007.

- 1 LELLIS, W.A.; BARROWS, F.T.; HARDY, R.W. Effects of phase-feeding dietary
2 phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout
3 *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.242, p. 607-616, 2004.
- 4 LEPRÉVOST, A.; SIRE, J.Y. Architecture, mineralization and development of the axial
5 skeleton in Acipenseriformes, and occurrences of axial anomalies in rearing
6 conditions; can current knowledge in teleost fish help? **Journal of Applied**
7 **Ichthyology**, v.30, p. 767-776, 2014.
- 8 McCLURE, M.M.; MCINTYRE, P.B.; MCCUNE, A.R. Notes on the natural diet and
9 habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of**
10 **Fish Biology**, n.69, p. 553-570, 2006.
- 11 MATSUOKA, M. Comparison of meristic variations and bone abnormalities between
12 wild and laboratory-reared red sea bream. **Japan Agricultural Research Quarterly**,
13 v.37, n.1, p. 21-30, 2003.
- 14 McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. Academic Press, Inc.
15 1992. p. 368-370.
- 16 MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S.
17 **Fundamentos na moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. 200p.
- 18 MOYLE, P.B.; CECH, Jr. Hydromineral balance in Fishes: An Introduction to
19 Ichthyology. Upper Saddle River, NJ:Prentice-Hall, Inc., p. 79-96, 2000.
- 20 NELSESTUEN, G.L.; SHAH, A.M.; HARVEY, S.B. C. Vitamin K-dependent proteins.
21 **Vitamins and Hormones**, v.58, p. 355-389, 2000.
- 22 NELSON, J.S. Fishes of the world. 3rd edn. Wiley, New York, 1994.
- 23 NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**.
24 Washington, D.C: The National Academy Press, 2011, 376p.
- 25 OGINO, C.; TAKEDA, H. Requirements of rainbow trout for dietary calcium and
26 phosphorus. **Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.44, p. 1019-1022,
27 1978.
- 28 OGINO, C.B.; TAKEUCHI, L.; TAKEDA, H.; WATANABE, T. Availability of dietary
29 phosphorus in carp and rainbow trout. **Bulletin of Japanese Society of Scientific**
30 **Fisheries**, v.45, p. 1527-1579, 1979.
- 31 PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
32 PCR. **Nucleic Acids Res** (2001) v.29, n.9, 45p, 2001.
- 33 PINTO, J.P.; OHRESSER, M.C.; CANCELA, M.L. Cloning of the bone Gla protein
34 gene from the teleost fish *Sparus aurata*. Evidence for overall conservation in gene
35 organization and bone-specific expression from fish to man. **Gene**, v.270, p. 77-91,
36 2001.
- 37 PORN-NGAM, N.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Effect of the ratio
38 of phosphorus to calcium on zinc availability to rainbow trout in high phosphorus
39 diets. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.59, p. 2065-2070, 1993.
- 40 PRABHU, P.A.J.; SCHRAMA, J.W.; KAUSHIK, S.J. Quantifying dietary phosphorus
41 requirement of fish - a meta-analytic approach. **Aquaculture Nutrition**, v.19, p.
42 233-249, 2013.
- 43 PRICE, P.A.; WILLIAMSON, M.K.; LOTHINGER, J.W. Origin of the vitamin K-
44 dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone.
45 **Journal of Biological Chemistry**, v.256, p. 12760-12766, 1981.
- 46 PRICE, P.A.; URIST, M.R.; OTAWARA, Y. Matrix Gla protein, a new gamma-
47 carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix

- 1 of bone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.117, p. 765-
2 771, 1983.
- 3 RIBAS, L.; PIFERRER, F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with
4 emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**,
5 v.5, n.1, p. 1-32, 2013.
- 6 RICHARDSON, W.D.; ROBERTS, B.L.; SMITH, A.E. Nuclear localization signals in
7 polyoma virus large-T. **Cell**, v.44, p. 77-85, 1986.
- 8 RISHAVY, M.A. A new model for vitamin K-dependent carboxylation: The catalytic
9 base that deprotonates vitamin K hydroquinone is not Cys but an activated amine.
10 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
11 **America**, v.101, n.38, p. 13732-13737, 2004.
- 12 ROY, M.E.; NISHIMOTO, S.K.; RHO, J.Y.; BHATTACHARYA, S.K.; LIN, J.S.;
13 PHARR, G.M. Correlations between osteocalcin content, degree of mineralization,
14 and mechanical properties of *C. Carpio* rib bone. **John Wiley & Sons**, v.54, n.4, p.
15 547-553, 2001.
- 16 ROY, P.K.; LALL, S.P. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock
17 (*Melanogrammus aeglefinus* L.). **Aquaculture**, v.221, p.451-468, 2003.
- 18 SAKAMOTO, S.; YONE, Y. Effect of dietary phosphorus level on chemical
19 composition of red sea bream. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of**
20 **Fish**, v.44, p. 227-229, 1978.
- 21 SALES, J.; JANSSENS, G.P.J. Nutrient requirements of ornamental fish. **Aquatic**
22 **Living Resources**, Cambridge, v.16, n.6, p. 533-540, 2003.
- 23 SATOH, S. Minerals. In: Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin III, D.M. (Eds.). Dietary
24 Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish. CABI Publishing,
25 Oxfordshire, UK, p. 74-85, 2007.
- 26 SATOH, S.; IZUME, K.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Effect of supplemental
27 tricalcium phosphate on zinc and manganese availability to common carp. **Nippon**
28 **Suisan Gakkaishi**, v.58, p. 539-545, 1992.
- 29 SATOH, S.; PORN-NGAM, N.; SASAKI, T.; ISHIDA, R.; TAKEUCHI, T.;
30 WATANABE, T. Effect of deboning of white fish meal on the zinc availability to
31 rainbow trout. **Suisanzoshoku**, v.45, p. 267-273, 1997.
- 32 SHEARER, K.D.; HARDY, R.W. Phosphorus deficiency in rainbow trout fed a diet
33 containing deboned fillet scrap. **The Progressive Fish Culturist**, v.49, n.3, p. 192-
34 197. 1987.
- 35 SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and
36 ecology of the zebrafish, (*Danio rerio*). **Biological Reviews**, v.83, p. 13-34, 2007a.
- 37 SPENCE, R.; FATEMA, M.K.; ELLIS, S.; AHMED, Z.F.; SMITH, C. The diet, growth
38 and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. **Journal of Fish**
39 **Biology**, v.71, p. 304-309, 2007b.
- 40 STEFFENS, W. Principios Fundamentales de la alimentacion de los peces. Zaragoza:
41 Editora Acribia S.A, 1987.
- 42 SULLIVAN, M.; HAMMOND, G.; ROBERTS, R.J.; MANCHESTER, N.J. Spinal
43 deformation in commercially cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a clinical and
44 radiological study. **Journal of Fish Diseases**, v.30, n.12, p. 745-752, 2007.
- 45 ULLOA, P.E.; ITURRA, P.; NEIRA, R.; ARANEDA, C. Zebrafish as a model
46 organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional
47 genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**.
48 v.21, n.4, p. 649-666. 2011.

- 1 ULLREY, D.E. Fish. **In:** Pond, W.G.; Church, D.C.; Pond, K.R. Basic animal nutrition
2 and feeding. New York: J.W.S. Editor, p. 547-565. 1995.
- 3 VERHAEGEN, Y.; ADRIAENS, D.; DE WOLF, T.; DHERT, P.; SORGELOOS, P.
4 Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a qualitative and
5 quantitative analysis using geometric morphometrics. **Aquaculture**, v.268, p.156-
6 168, 2007.
- 7 VIELMA, J.; KOSKELA, J.; RUOHONEN, K. Growth, bone mineralization, and heat
8 and low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) fed with
9 graded levels of phosphorus. **Aquaculture**, v.212, p. 321-333, 2002.
- 10 VIELMA; LALL. Control of phosphorus homeostasis of Atlantic salmon (*Salmo salar*)
11 in fresh water. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.19, p. 83-93, 1998.
- 12 WALDROUP, P.W. Nutritional Approaches to Reducing Phosphorus Excretion by
13 Poultry. **Poultry Science**, v.78, p. 683-691, 1998.
- 14 WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace mineral in fish nutrition.
15 **Aquaculture**. v.151, p. 185-207. 1997.
- 16 WEGRZYN, D.; ORTUBAY, S. **Salmonidos en patagonia**, Mar del plata, Argentina,
17 v.1, 164p. 2009.
- 18 WHIPPS, C.M.; MURRAY, K.N.; KENT, M.L. Occurrence of a Myxozoan Parasite
19 Myxidium streisingeri n. sp. in Laboratory Zebrafish *Danio rerio*. **Journal of**
20 **Parasitology**, v.101, n.1, p.86-90.
- 21 ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; BALBINO, E.M.; SARAIVA, A.; QUADROS, M.;
22 FONTANARI, R.L. Níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de acará-
23 bandeira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.5, p. 1893-1896, 2006.

CAPÍTULO 2

Este artigo foi elaborado de acordo com as normas do periódico Zebrafish.

EXIGÊNCIA DIETÁRIA DE FÓSFORO PARA ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

RESUMO: O ensaio de crescimento foi realizado para estimar a disponibilidade de fósforo (P) do fosfato bicálcico, a exigência de fósforo e os sinais externos de deficiência em dietas para zebrafish (*Danio rerio*) em aquários de 15 L. Foram utilizadas seis dietas semipurificadas para conterem os níveis graduais de (0,35, 0,65, 0,95, 1,25, 1,55 e 1,85%) de fósforo total por 8 semanas. A dieta basal (T1), contendo 0,35% de fósforo total, não foi suplementada com fonte mineral de fósforo, e as cinco dietas experimentais foram formuladas com inclusão crescente de fosfato bicálcico. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições, utilizando 450 alevinos (peso médio inicial de $0,0079 \pm 0,0003$ g e idade de 31 dias pós-eclosão). Os peixes foram alimentados 6 vezes ao dia, e mantidos em temperatura constante de 28 ± 1 °C, o pH e as concentrações de amônia e oxigênio dissolvido foram de $6,8 \pm 0,32$ mg L⁻¹, $0,06 \pm 0,01$ mg L⁻¹ e $6,5 \pm 0,3$, respectivamente. A disponibilidade de fósforo do fosfato bicálcico foi de 53,84%. A conversão alimentar (FC), a taxa de crescimento específico (SGR), o crescimento (G) e o comprimento final (L) tiveram correlação positiva com o nível de fósforo na dieta ($p > 0,01$). A eficiência na retenção de fósforo foi maior nos peixes alimentados com as dietas com 0,35 e 0,65% de fósforo. As análises de composição corporal dos peixes mostraram que o fósforo, cálcio, magnésio, matéria seca e lipídeos foram significativamente afetados pela concentração de fósforo nas dietas ($p < 0,01$), porém, não significativo para a concentração corporal de manganês, zinco e cobre entre os tratamentos. Sinais da deficiência de fósforo foram caracterizados pelo menor crescimento, baixa apetite, aumento da concentração corporal de lipídeos, aparecimento de sinais externos de deformidades esqueléticas (cranial, lordose e escoliose), redução da mineralização óssea (espessura do tecido ósseo). Pode-se concluir que o melhor nível de fósforo foi de 1,55 % para os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: deformidades, disponibilidade de fósforo, mineralização óssea, nutrição, peixes ornamentais

DIETARY PHOSPHORUS REQUIREMENT OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

ABSTRACT: The growth assay was performed to estimate the dicalcium phosphate phosphorus (P) availability, the phosphorus requirement and external deficiency signs in diet of zebrafish (*Danio rerio*) allocated in 15 L aquarium . Six semipurified diets were used with graded total phosphorus levels (0.35, 0.65, 0.95, 1.25, 1.55 and 1.85%) for 8 weeks. The basal diet (T1), with 0.35% total phosphorus was not supplemented with phosphorous mineral source, and all diets were formulated with inorganic phosphate inclusion increasing. For the experiment 450 zebrafish fingerlings were used (0.0079 ± 0.0003 g average weight with 31 days post-hatching), distributed in a completely randomized design experiment with five replications. The fish were fed six times a day at 28 ± 1 °C, 6.8 ± 0 , 32 pH, 0.06 ± 0.01 mg L⁻¹ ammonia concentration and 6.5 ± 0.3 mg L⁻¹ dissolved oxygen. Dicalcium phosphate phosphorus availability was 53.84%. Feed Conversion (FC), Specific Growth Rate (SGR), Growth (G) and the final Length (L) had a positive correlation with phosphorus diet levels ($p > 0.01$). The phosphorus retention efficiency was higher in fish fed 0.35 and 0.65% phosphorus diets. The fish body composition analyzes showed that phosphorus, calcium, magnesium, dry matter and lipids were significantly affected by phosphorus diets concentration ($p > 0.01$), however, not significant for body manganese, zinc and copper concentration among treatments. Phosphorus deficiency signs were characterized by lower growth, low appetite, increased body lipid contents, external appearance of skeletal deformity (cranial, lordosis and scoliosis), mineralization bone reduction (bone tissue thickness). It can be concluded that the better phosphorus level was 1.55% for all parameters evaluated.

Keywords: bone mineralization, deformities, nutrition, ornamental fish, phosphorus availability

1 INTRODUÇÃO

2
3 O zebrafish (*Danio rerio*) é um dos modelos biológicos mais utilizados para
4 estudos em toxicologia, neurobiologia e genética molecular (WHIPPS et al., 2015),
5 além de ser considerado como modelo para estudos de nutrição e crescimento em peixes
6 (ULLOA et al., 2011) devido ao seu rápido desenvolvimento (DAHM, 2002), alta
7 capacidade reprodutiva (WEGRZYN e ORTUBAY, 2009), desenvolvimento larval
8 transparente (BIGA e GOETZ, 2006) e ampla variedade de ferramentas moleculares e
9 informações disponíveis para análise genômica (JOHNSTON et al., 2008).

10 Apesar de sua importância, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos quanto à
11 sua exigência nutricional, criando uma lacuna quanto a informações nutricionais para
12 utilização em pesquisas com esta espécie (ULLOA et al., 2011).

13 Devido à restrição de alimento natural em condições laboratoriais, os nutrientes
14 e a energia devem ser providos inteiramente pela dieta fornecida (NRC, 2011). Dentre
15 os componentes de uma dieta balanceada os minerais são considerados como essenciais
16 para o crescimento e metabolismo, dos quais o cálcio (Ca) e o fósforo (P) são os
17 principais constituintes da porção inorgânica da dieta (NRC, 2011).

18 Considerado como um dos minerais mais importantes devido suas funções na
19 formação de coenzimas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, o P atua também na
20 transferência de energia por meio da quebra do ATP. É componente de tecidos duros,
21 como ossos, dentes e escamas (NRC, 2011), e moles, onde tem função estrutural e
22 também na composição do material genético (LALL, 2002).

23 Estudos foram realizados objetivando avaliar o nível adequado de
24 suplementação de fósforo para mais de 40 espécies de peixes (PRABHU et al. 2013),
25 sendo este o mineral essencial mais estudado. Redução do crescimento, da ingestão de
26 alimento e da mineralização óssea, letargia, e aumento da deposição de gordura corporal
27 e de deformidades ósseas (OGINO e TAKEDA, 1978; WATANABE et al., 1997;
28 WALDROUP, 1999; ROY e LALL, 2003; SHAO et al., 2008; ARGÜELLO-
29 GUEVARA et al., 2014), são os sinais mais frequentes causados pela sua deficiência.

30 Além da quantidade balanceada deve-se avaliar a quantidade de P disponível
31 ao peixe, considerando que seu aproveitamento não é baseado em valores brutos da
32 dieta, mas sim em seu valor biológico (LALL, 2002), ferramenta que permite, por meio

da seleção de alimentos com mais P disponível, reduzir o fósforo excretado no ambiente, uma das principais causas de contaminação da água (NRC, 2011).

Diante disso, este estudo visou determinar a exigência nutricional de P para zebrafish, avaliando a disponibilidade de fosforo do fosfato bicálcico, desempenho zootécnico e frequência de deformidades ósseas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O processo reprodutivo de zebrafish (*Danio rerio*) foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri. Iniciou-se a alimentação das larvas no dia 4 pós-eclosão com base em gema de ovo cozida e microvermes (*Panagrellus redivivus*), e após 10 dias, complementou-se esta alimentação com náuplios de artemia salina, até o dia 30 pós-eclosão.

Experimento 1

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, FMVZ – Unesp, Câmpus de Botucatu. Foram utilizados 450 alevinos de zebrafish, com peso médio de $0,0079 \pm 0,0003\text{g}$ e idade de 31 dias pós-eclosão, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis repetições, sendo cada unidade experimental um aquário de 15 L de volume alojando 15 indivíduos.

Os aquários foram abastecidos por sistema de recirculação de água, provido de filtro físico e biológico, sendo mantida a temperatura constante em 28 °C. O nível de pH e as concentrações de amônia e oxigênio dissolvido foram de $6,8 \pm 0,32$, $0,06 \pm 0,01\text{ mg L}^{-1}$ e $6,5 \pm 0,3\text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, aferidos semanalmente com a sonda multiparâmetro YSI 556® (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA).

Ao final do período experimental de 8 semanas, os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, para esvaziamento do trato gastrointestinal. Após este procedimento, os

animais foram coletados e insensibilizados em imersão com água e óleo de cravo (50 mL.L⁻¹) para serem posteriormente pesados e medidos.

Dietas

As dietas (isoprotéicas e isoenergéticas) foram formuladas com base numa ração referência semipurificada (Tabela 1), segundo o Instituto de Nutrição Americano (INA, 1977), com base na proteína da albumina e da gelatina, formulada para conter 40% de proteína bruta (PB) e 3.500 kcal de energia bruta (EB), sendo adicionados 100 g.kg⁻¹ de farinha de vísceras de aves como palatilizante. As dietas foram elaboradas para conterem: 0,35 (T1); 0,65 (T2); 0,95 (T3); 1,25 (T4); 1,55 (T5) e 1,85% (T6) de fósforo total, baseado na exigência da carpa de 0,7-0,9% P total (NRC, 2011).

O arraçoamento foi realizado seis vezes ao dia, até a saciedade aparente dos peixes, nos seguintes horários: 8:30, 10:00, 11:30, 14:00, 15:30, 17:00h.

Para confecção das dietas, após pesagem e homogeneização dos ingredientes, foi adicionada água à 45°C, na proporção de 12% sobre seu peso total, e o óleo, de acordo com a formulação das dietas e em seguida, homogeneizada novamente e desidratada em estufa de ventilação forçada (55°C), durante o período de 24h. As dietas foram mantidas à 5°C durante 2h, e em seguida trituradas e classificadas em três granulometrias diferentes: pó, 0,42mm e 0,71mm, e foram fornecidas de 1-15, 16-45 e 46-60 dias, respectivamente.

Experimento 2

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, FMVZ – Unesp, Câmpus de Botucatu, objetivando determinar a disponibilidade de P do fosfato bicálcico. Foram utilizados 100 indivíduos machos e adultos, com peso médio de $0,285 \pm 0,012$ g, distribuídos em uma gaiola alojada em um aquário com capacidade para 40 L de água, dotado de aeração e filtro individual.

A água do aquário foi mantida a temperatura de 28 °C, por meio de aquecedor de 100W acoplado à um termostato. A temperatura foi medida duas vezes ao dia (às 8:00 e às 14:00 horas).

Para a determinação da disponibilidade de fósforo do fosfato bicálcico utilizou-se a formulação das dietas T1 e T6, adicionando óxido de cromo como marcador (5g.kg⁻¹). O arraçoamento foi realizado seis vezes ao dia, até a saciedade aparente dos peixes.

As coletas de fezes foram realizadas pelo sistema Guelph modificado, de acordo com a metodologia descrita por Pezzato et al. (2002). As fezes foram colhidas por meio de um sifão coletor, por gravidade. Após o período de coleta de fezes (14 dias), as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48h, moídas e encaminhadas para análise. O coeficiente de disponibilidade aparente de fósforo nas dietas experimentais foi determinado segundo Nose (1960).

$$CDA_p (\%) = 100 - \left[100 \left(\frac{\%Cr_2O_{3r}}{\%Cr_2O_{3f}} \right) \times \left(\frac{\%Pf}{\%Pr} \right) \right]$$

%Cr₂O_{3r}: Porcentagem de cromo na ração, %Cr₂O_{3f}: Porcentagem de cromo nas fezes, %P_f: Porcentagem de fósforo nas fezes, %P_r: Porcentagem de fósforo na ração.

Análises Químicas e Bromatológica

A determinação das concentrações dos minerais fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn) e manganês (Mn) de nove animais por unidade experimental foram realizadas no Laboratório de Química da Unesp, Botucatu. As amostras foram submetidas a digestão ácida, e a quantificações de P foi realizada segundo Markzent (1976), de cálcio, cobre, crômio, manganês, magnésio e zinco foram feitas por espectrometria de absorção atômica em chama utilizando equipamento Shimadzu AA-6800 e de acordo com as condições descritas no manual do fabricante (Cookbook Shimadzu – Operation manual: Atomic Absorption Spectrophotometer AA-6800, SHIMADZU, 2000).

A análise bromatológica das dietas e dos animais foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ- Unesp, Botucatu. Foram determinados os níveis de matéria seca (MS%), matéria mineral (MM%) e extrato etéreo (EE%), segundo metodologia de Weende, proteína

1 bruta (PB%) pelo método de Kjeldahl e fibra bruta (FB%) pelo método de Van Soest
2 (AOAC, 2000).

3

4 *Parâmetros de Desempenho Produtivo*

5

6 Os parâmetros de desempenho produtivo avaliados foram: ganho de peso,
7 conversão alimentar e taxa de crescimento específico, sendo estes valores, obtidos
8 respectivamente pelas seguintes equações:

9

10 $WG = PF - PI$

11 $WG = \text{ganho de peso (g)}; PF = \text{peso final (g)}; PI = \text{peso inicial (g)}.$

12

13 $FC = AF/GP$

14 $FC = \text{conversão alimentar}; AF = \text{quantidade de alimento fornecido (g)}; GP = \text{ganho de}$
15 $\text{peso (g)}.$

16

17 $SGR = ((\ln PF - \ln PI) / \text{tempo (dias)}) \times 100$

18 $SGR = \text{taxa de crescimento específico}; PF = \text{peso final (g)}; PI = \text{peso inicial (g)}.$

19

20 $PER (\%) = [(PF \times FF) - (PI \times FI)] / CR \times F$

21 $PER = \text{Taxa de eficiência de retenção de nutrientes no ganho em peso (\%)}; PF = \text{peso}$
22 $\text{médio final (g)}; FF = \text{porcentagem média de nutriente corporal final (\%)}; PI = \text{peso}$
23 $\text{médio inicial (g)}; FI = \text{porcentagem de nutriente corporal inicial (\%)}; CR = \text{consumo de}$
24 $\text{ração}; F = \text{porcentagem do nutriente na dieta (\%)}.$

25

26 *Análises Histológicas*

27

28 Fixou-se 12 animais por tratamento em formol a 10% para confecção de
29 lâminas histológicas de dois cortes transversais, secção inicial da cabeça e secção final
30 da coluna vertebral. Para a confecção das lâminas histológicas, o material foi submetido
31 à fixação em formalina 10% tamponada. Após 48 horas as amostras foram lavadas em
32 água corrente e imersas no álcool etílico 70% onde permaneceram até o momento do

processamento. Os fragmentos foram então submetidos a desidratação, diafanização e emblocamento em parafina. Posteriormente realizou-se cortes de 4 µm em micrótomo automático (Leica^R). Em seguida procedeu-se a desparafinização, reidratação e coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina, conforme protocolo histotécnico padrão.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico LEICA, modelo DMLB, equipado com câmera acoplada LEICA. As lentes de aumento utilizadas foram de aumento de 40x. As medidas de espessura óssea foram obtidas pelo software de análise de imagens LEICA QWin Plus.

Deformidades

Foi quantificado o número de indivíduos, em porcentagem, que apresentaram deformidades ósseas de acordo com a classificação de Ferreri et al. (2000).

Análise Estatística

Os parâmetros de desempenho produtivo, composição química e bromatológica e de espessura óssea da secção medial da cabeça e da secção final da espinha animais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em caso de diferença significativa, complementadas com análise de regressão polinomial pelo software Minitab 16 e/ou teste de Tukey, em nível de 5% de significância. (MINITAB, 2000).

Para as variáveis deformidades corporais foi empregado o teste de qui-quadrado de Pearson, em nível de 5% de significância (AYRES et al., 2000).

RESULTADOS

A disponibilidade aparente de fósforo (P) do fosfato bicálcico para o zebrafish foi de 53,84%, resultando em um aproveitamento de fósforo de aproximadamente a metade contida no ingrediente.

Observa-se melhora da FC e aumento da SGR, G e L conforme o aumento da suplementação de fósforo na dieta ($p < 0,01$), sendo os melhores índices obtidos pelos

1 peixes do T6 (Figura 1-A, Figura 1-B, Figura 1-C e Figura 1-D, respectivamente). Os
2 valores obtidos para a PER foram de: 0,53; 0,45; 0,36; 0,36; 0,35; 0,35. As dietas que
3 apresentaram as melhores taxas de eficiência na retenção de P foram os níveis de 0,35 e
4 0,65 de fósforo, cerca de 34% e 15% melhores, respectivamente, se comparadas as
5 outras dietas. Pela regressão quadrática obteve-se o valor ótimo de fósforo de 2,35%
6 para SGR e de 4,87% para G.

7 Os dados da composição mineral e bromatológica da carcaça dos animais estão
8 apresentados na Tabela 2. A concentração corporal dos níveis de P, Ca e Mg
9 aumentaram conforme a adição de P nas dietas ($p < 0,01$), enquanto o Mn, Zn e Cu não
10 apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, constatando-se que os níveis
11 de P utilizados não foram acima da exigência.

12 A matéria seca e o extrato etéreo corporal foram inversamente proporcionais ao
13 P nas dietas, enquanto a concentração de proteína bruta foi proporcional ao aumento de
14 P nas dietas.

15 Os primeiros sinais de deficiência de P nos animais do T1 e T2 foram
16 observados aos 20 dias. Inicialmente com letargia, escurecimento do corpo e baixa
17 ingestão de alimento, observou-se em seguida a mortalidade de um animal em cada um
18 destes tratamentos ($p > 0,05$), não havendo mais mortalidades após este período.

19 Os animais apresentaram diversos tipos de deformidades ósseas, sendo as
20 regiões cranial, craniofacial e da inserção da nadadeira caudal as mais afetadas pela
21 deficiência de P, acometendo cerca de metade dos animais do T1 e T2, seguida pela
22 lordose com 27% de animais deformados, Figuras 2 e 3. Menos severa, a escoliose foi
23 observada em pouco mais de 1% dos animais dos tratamentos T1 e T2.

24 Devido a deficiência de fósforo estar relacionada às deformidades ósseas, os
25 tratamentos T5 e T6 reduziram os casos de deformidades ósseas, Tabela 3.

26 Observou-se correlação positiva entre o nível de P e a espessura do tecido
27 ósseo da secção medial da cabeça (MHS) e da secção final da coluna vertebral (SES),
28 Figuras 4 e 5, resultando em maior espessura dos tecidos ósseos da secção medial da
29 cabeça e da secção final da coluna vertebral nos peixes do T5 e T6. A secção final da
30 coluna vertebral mostrou-se mais sensível à quantidade de P ofertada na dieta, uma vez
31 que a menor espessura foi observada nos animais do T1 e T2, aproximadamente 70%
32 menor se comparada aos peixes do T5 e T6 (Tabela 4).

1 DISCUSSÃO

2
3 A disponibilidade aparente do fosfato bicálcico (53,84%) obtida neste estudo
4 foi inferior aos valores descritos para diversas espécies de peixes. Para alevinos de
5 tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a disponibilidade foi de 74,23% (MIRANDA et
6 al., 2000), para o bagre-do-canal de 82,0% (*Ictalurus punctatus*) (LI e ROBINSON,
7 1996) e para truta arco-íris (*Rainbow trout*) de 71,0% (OGINO et al., 1979). Entretanto
8 para carpa comum (*Cyprinus carpio*) a disponibilidade relatada é de 46,0% (OGINO et
9 al., 1979), disponibilidade menor do que para outras famílias de peixes.

10 A baixa disponibilidade pode estar relacionada à ausência de estômago em
11 espécies de ciprinídeos, característica que pode reduzir a ação de enzimas durante a
12 digestão e consequentemente sua disponibilidade para absorção, como foi observado
13 para a carpa comum, espécie que também não possui estômago nem secreção de ácido
14 gástrico, admitindo-se a influência da acidez gástrica na disponibilidade de P (WOOD e
15 SERFATY LACROSNIERE, 1992).

16 Os dados da taxa de eficiência na retenção de P estão em consenso com Lellisa
17 et al. (2004), que obtiveram relação direta entre a diminuição na eficiência de retenção
18 de P com o aumento do fornecimento do mineral, atribuindo este resultado ao possível
19 desenvolvimento de mecanismos que aumentem o aproveitamento do nutriente
20 fornecido em quantidade abaixo da exigência.

21 Além disso, foi observado piora do desempenho zootécnico, aumento da
22 deposição de gordura, baixa mineralização óssea, letargia e ocorrência de deformidades
23 ósseas em peixes alimentados com baixa concentração dietética de P. Tais resultados
24 corroboram com os apresentados por ROY e LALL, 2003; FJELLDAL et al., 2007;
25 SHAO et al., 2008 e GRINI et al., 2011, sendo estas as principais consequências da
26 deficiência de P em peixes (LALL, 2002).

27 A piora da conversão alimentar (FC) dos peixes alimentados com dietas
28 contendo baixa concentração de P confirmam os resultados descritos por Vielma e Lall
29 (1998) para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e por Roy e Lall (2003) que obtiveram
30 piora da conversão alimentar para a arinca (*Melanogrammus aeglefinus* L.) alimentadas
31 com dietas contendo 0,42% e 0,62% de P. Este resultado pode ter sido ocasionado

1 devido o fósforo ser um elemento essencial, que por sua vez afeta a eficiência alimentar
2 (SHEARER, 1995).

3 O baixo P nas dietas também influenciou o crescimento dos peixes,
4 corroborando com outros estudos que constataram níveis prejudiciais ao crescimento
5 abaixo de 0,65% de P para European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (OLIVA-TELES
6 e PIMENTEL-RODRIGUES, 2004), 0,74% para garoupa (*Epinephelus marginatus*)
7 (CHENG et al., 2005), 0,70% para grande corvina amarela (*Pseudosciaena crocea*)
8 (MAI et al., 2006) e 0,72% para arinca (ROY e LALL, 2003). Diferente do observado
9 nesse estudo, Fjellidal et al. (2012) não constataram redução no crescimento de salmão
10 do Atlântico alimentados com dietas deficientes de P, devido à capacidade da espécie de
11 atender à exigência metabólica não apenas pela reserva do tecido ósseo como também
12 das escamas.

13 A concentração de macro e micro-minerais corporais estão próximos ao
14 encontrado por Kaushik et al. (2011) para o zebrafish, e por Tacon et al. (1984) para
15 carpa comum. Além disso, o efeito negativo nas concentrações de P, Ca e Mg nos
16 peixes alimentados com dietas deficientes de P também foi observado em perca
17 prateada (*Bidyanus bidyanus*) (YANG et al., 2006), black seabream (*Sparus*
18 *macrocephalus*) (SHAO et al., 2008) e carpa comum (TACON et al., 1984).

19 A relação Ca:P foi de ~1,4:1 diferente aos resultados obtidos para a carpa de
20 ~2:1 (TACON et al., 1984), enquanto Kaushik et al. (2011) obtiveram relação ~1:1,
21 próximo ao obtido neste estudo.

22 A influência do P corpóreo nas concentrações de Mn, Cu e Zn é devida ao
23 excesso de P reduzir a absorção destes minerais devido à competição por sítios de
24 absorção no intestino (ROY e LALL, 2003), e ao seu uso metabólico estar atrelado ao
25 Zn e Mn (LALL, 2002). Assim, pode-se sugerir que o fornecimento de P não foi em
26 excesso, uma vez que não alterou a composição corporal destes minerais.

27 A concentração de EE e a PB foi semelhante ao encontrado por Kaushik et al.
28 (2011), que reportaram ~10% para EE e ~16% para PB avaliando quatro dietas testes
29 com fontes diferentes de proteína e uma dieta comercial na alimentação do zebrafish.

30 A redução da deposição de gordura na carcaça dos peixes com o aumento de P
31 na dieta confirma os resultados obtidos por Furuya et al. (2008) com tilápia-do-Nilo,
32 Shao et al. (2008) com black seabream, Mai et al. (2006) com a grande corvina amarela

1 e Roy e Lall (2003) com arinca. Esses autores observaram redução na concentração de
2 lipídios na carcaça quando as dietas possuíram nível adequado do mineral. Esta redução
3 está relacionada à inibição da β -oxidação dos lipídios, aumentando sua concentração
4 corporal. A absorção mitocondrial dos lipídios necessita de ATP, processo que pode ser
5 inibido pela insuficiência de fosfato inorgânico, resultando em menor utilização de
6 lipídios como fonte de energia (ROY e LALL, 2003).

7 Os animais do T1 e T2 apresentaram letargia e baixa ingestão de alimento,
8 comportamento também relatado por Roy e Lall (2003) avaliando arincas alimentadas
9 com 0,42% fósforo na dieta. Segundo os autores essas características expressam a
10 deficiência do mineral.

11 Sinais externos de deformidades ósseas em peixes alimentados com dietas
12 deficientes de P foram observados em diversas espécies, como a carpa comum e truta
13 arco-íris (OGINO et al., 1979), peixe branco europeu (*Coregonus lavaretus* L.)
14 (VIELMA et al., 2002), arinca (ROY e LALL, 2003), e salmão do Atlântico
15 (FJELLDAL et al., 2012). Em semelhança aos resultados obtidos neste estudo, Ferreri
16 et al. (2000) relatou alta incidência de deformidade na região caudal em zebrafish, 86%
17 dos indivíduos selvagens e 100% dos cultivados apresentaram deformidade nesta
18 região.

19 As deformidades cranial, craniofacial e exoftalmia estão intimamente ligadas
20 ao nível de P da dieta, apresentado correlação negativa. Os animais do T1 apresentaram
21 a maior incidência destas deformidades. Este fato também foi reportado por Ogino e
22 Takeda (1978) em carpas alimentadas com níveis de P abaixo da exigência.

23 A menor espessura do tecido ósseo da secção medial da cabeça (MHS) e da
24 secção final da coluna vertebral (SES) nos animais alimentados com dietas deficientes
25 de P (T1, T2, T3 e T4) pode ser devido ao fato da mineralização óssea e o crescimento
26 esquelético estarem relacionados à concentração de P corporal (FERRERI et al., 2000),
27 que uma vez alimentados com P abaixo da exigência reduz seu acúmulo e
28 consequentemente a espessura do tecido ósseo.

29
30
31
32

1 **CONCLUSÃO**

2

3 A disponibilidade aparente de P do fosfato bicálcico para o zebrafish foi de
4 53,84%. O melhor nível de fósforo total em dietas para zebrafish foi de 1,55 %, com
5 melhores resultados no desempenho produtivo e na mineralização óssea, apresentando
6 menor incidência de deformidades.

7

8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC-Association of Official Analytical Chemists: Methods of Analysis. Washington, USA, 2000.
2. Argüello-Guevara W, Bohórquez-Cruz M, Silva A. Malformaciones craneales en larvas y juveniles de peces cultivados. Latin American Journal of Aquatic Research, 2014;42;950-962.
3. Ayres M, Ayres JrM, Ayres DL, Santos AS. Bioestat 2.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil. Mato grosso, Brazil, 2000.
4. Biga PR, Goetz FW. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2006;291;1327-1337.
5. Cheng AC, Wu JD, Yang SD, Liou CH. Dietary phosphorus requirement of juvenile malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*). Journal of the Fisheries Society of Taiwan, 2005;32;41-52.
6. Cho CY, Slinger SJ, Bayley HS. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. Comparative Biochemistry and Physiology, 1982;73;25-41.
7. Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. Marine Biotechnology, 2006;8;329-345.
8. Ferreri F, Nicolais C, Boglione C, Bertolini B. Skeletal characterization of wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters. Journal of Fish Biology, 2000;56;1115-1128.
9. Fjelldal PG, Hansen T, Albrektsen S. Inadequate phosphorus nutrition in juvenile Atlantic salmon has a negative effect on long-term bone health. Aquaculture, 2012;334-337;117-123.
10. Fjelldal PG, Nordgarden U, Hansen T. The mineral content affects vertebral morphology in underyearling smolt of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 2007;270;231-239.
11. Furuya WM, Fujii KM, Santos LD, Silva TSC, Silva LCR, Michelato M. Exigência de fósforo disponível para tilápia-do-nilo (35 a 100 g). Revista Brasileira de Zootecnia, 2008;37;961-966.
12. Grini A, Hansen T, Berg A, Wargelius A, Fjelldal PG. The effect of water temperature on vertebral deformities and vaccine-induced abdominal lesions in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Fish Diseases, 2011;34;531-546.
13. INA. Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. Journal Nutrition, 1997;107;1340-1348.
14. Johnston I, Macqueen D, Watabe S: Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle. In Fisheries for global welfare and environment. Tsukamoto K, Kawamura T, Takeuchi T, Beard TD, Kaiser M, (eds), p.241-262 5th World Fisheries Congress, Scotland, 2008.
15. Kaushik S, Georga I, Koumoundouros G. Growth and body composition of zebrafish (*Danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: toward implications on nutrient requirements. Zebrafish, 2011;8;87-95.

- 1 16. Lall SP: The minerals. In Fish nutrition. Halver JE, (ed), p.219-257 2ed.
2 Academic Press Inc, New York, USA, 2002.
- 3 17. Lellisa WA, Barrowsb FT, Hardyc RW. Effects of phase-feeding dietary
4 phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout
5 *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 2004;242;607-616.
- 6 18. Li MH, Robinson EH. Phosphorus availability of common feedstuffs to channel
7 cat- fish *Ictalurus punctatus* as measured by weight gain and bone
8 mineralization. Journal of the World Aquaculture Society, 1996;27;297-302.
- 9 19. Mai K, Zhang L, Ai Q, Duan Q, Xu W, Zhang C, Liufu Z, Tan B. Dietary
10 phosphorus requirement of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* R.
11 Aquaculture, 2006;251;346-353.
- 12 20. Markzent Z: Spectrophotometric determination of elements, Ellis Howood,
13 Chichester, England, 1976.
- 14 21. MINITAB®: Statistical Software version 16. State College, PA: Minitab Inc,
15 2010.
- 16 22. Miranda EC, Pezzato AC, Pezzato LE, Furuya WM. Disponibilidade aparente de
17 fósforo em ingredientes pela tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta
18 Scientiarum, 2000;22;669-675.
- 19 23. NRC - National Research Council: Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.
20 The National Academy Press, Washington, USA, 2011.
- 21 24. Ogino CB, Takeda H. Requirements of rainbow trout for dietary calcium and
22 phosphorus. Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries, 1978;44;1019-
23 1022.
- 24 25. Ogino CB, Takeuchi L, Takeda H, Watanabe T. Availability of dietary
25 phosphorus in carp and rainbow trout. Bulletin of Japanese Society of Scientific
26 Fisheries, 1979;45;1527-1579.
- 27 26. Oliva-Teles A.; Pimentel-Rodrigues, A. Phosphorus requirement of European
28 sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. Aquaculture Research,
29 2004;35;636-642.
- 30 27. Pezzato LE, Miranda EC, Barros MM, Pinto LGQ, Furuya WM, Pezzato AC.
31 Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis*
32 *niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia, 2002;31;1595-1604.
- 33 28. Prabhu PAJ, Schrama JW, Kaushik SJ. Quantifying dietary phosphorus
34 requirement of fish - a meta-analytic approach. Aquaculture Nutrition,
35 2013;19;233-249.
- 36 29. Roy PK, Lall SP. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock
37 (*Melanogrammus aeglefinus* L.). Aquaculture, 2003;221;451-468.
- 38 30. Sá MVC, Pezzato LE, Barros MM, Magalhães Padilha PM. Relative
39 bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile
40 tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. Aquaculture Nutrition, 2005;11;273-
41 281.
- 42 31. Shearer K D. The use of factorial modeling to determine the dietary
43 requirements for essential elements in fishes. Aquaculture, 1995;133; 57-72.
- 44 32. Shao Q, Ma J, Xu Z, Hu W, Xu J, Xie S. Dietary phosphorus requirement of
45 juvenile black seabream, *Sparus macrocephalus*. Aquaculture, 2008;277;92-100.
- 46 33. Tacon AGJ, Knox D, Cowey CB. Effect of different dietary levels of salt-
47 mixtures on growth and body-composition in carp. Bulletin of the Japanese
48 Society of Scientific Fisheries, 1984;50;1217-1222.

- 1 34. Ulloa PE, Iturra P, Neira R, Araneda C. Zebrafish as a model organism for
2 nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics
3 applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*,
4 2011;21;649-666.
- 5 35. Vielma J, Koskela J, Ruohonen K. Growth, bone mineralization, and heat and
6 low oxygen tolerance in European whitefish (*Coregonus lavaretus L.*) fed with
7 graded levels of phosphorus. *Aquaculture*, 2002;212;321-333.
- 8 36. Vielma J; Lall SP. Control of phosphorus homeostasis of Atlantic salmon
9 (*Salmo salar*) in fresh water. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998;19;83-93.
- 10 37. Waldroup PW. Nutritional Approaches to Reducing Phosphorus Excretion by
11 Poultry. *Poultry Science*, 1998;78;683-691.
- 12 38. Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace mineral in fish nutrition. *Aquaculture*,
13 1997;151;185-207.
- 14 39. Wegrzyn D, Ortubay S. Salmonidos en patagonia, Mar del plata, Argentina, 1,
15 164p. 2009.
- 16 40. Whipps CM, Murray KN, Kent ML. Occurrence of a Myxozoan Parasite
17 *Myxidium streisingeri* n. sp. in Laboratory Zebrafish *Danio rerio*. *Journal of*
18 *Parasitology*, 2015; 101; 86-90.
- 19 41. Wood RJ, Serfaty-Lacroisniere C. Gastric acidity, atrophic gastritis, and calcium
20 absorption. *Nutrition Reviews*, 1992;50;33-40.
- 21 42. Yang SD, Lin TS, Liu FG, Liou CH. Influence of dietary phosphorus levels on
22 growth, metabolic response and body composition of juvenile silver perch
23 (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 2006;253;592-601.
- 24

1 Table 1. Composition of six zebrafish experimental diets.

Ingredients (%)	Diets					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Albumin	34.74	34.76	34.79	34.81	34.83	34.85
Poultry Viscera Meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Gelatin	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Starch	38.95	36.01	33.11	30.21	27.31	24.42
Soy Oil	2.64	3.51	4.36	5.21	6.07	6.92
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Dicalcium Phosphate	0.00	2.05	4.07	6.10	8.12	10.14
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
NaCl	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Premix ^a	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin C ^b	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
<i>Chemical Composition*</i>						
Crude protein %	40.13	40.07	40.00	40.08	40.01	40.10
Crude lipid %	4.53	5.39	6.24	7.09	7.93	8.78
Total phosphorus (%)	0.34	0.67	0.93	1.26	1.55	1.81
Available Phosphorus ^c	0.18	0.36	0.50	0.68	0.83	0.97
Ca/P ratio (%)	2.03	2.25	2.32	2.34	2.37	2.38
Energy (kcal ⁻¹)	3.493	3.494	3.506	3.506	3.508	3.493

2 ^a Premix vitamin - mineral premix (composition by kg product): vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000
3 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg;
4 vit. B12 = 4.800 mg; folic acid = 1.200 mg; calcium pantotenate = 12.000 mg; vit. C = 48.000 g; biotin =
5 48 mg; choline = 65.000 mg; niacin = 24.000 mg, iron = 10.000 mg; cooper = 600 mg; manganese =
6 4.000 mg; iodine = 20 mg; cobalt = 2 mg e selenium = 20 mg.

7 ^b Vitamin C: calcium salt, 2- ascorbic acid monophosphate, 35% active principle.

8 ^c The values were calculated based on the T1 and T6 diets digestibility (53.84%).

9 *Analyzed composition diets.

10

1 Table 2. Whole-body composition of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus
 2 levels¹.

Composition*	Diets					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
P (g.kg ⁻¹)	16.65 ^e	18.53 ^{de}	20.8 ^{cd}	21.83 ^{bc}	23.42 ^{ab}	24.82 ^a
Ca (g.kg ⁻¹)	21.48 ^c	25.53 ^b	26.41 ^b	27.81 ^b	33.53 ^a	34.80 ^a
Mg (g.kg ⁻¹)	0.85 ^c	0.83 ^c	0.89 ^c	1.01 ^b	1.07 ^{ab}	1.17 ^a
Mn (mg.kg ⁻¹)	0.60 ^a	0.40 ^a	0.50 ^a	0.50 ^a	0.50 ^a	0.40 ^a
Zn (mg.kg ⁻¹)	120.00 ^a	110.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	110.00 ^a	120.00 ^a
Cu (mg.kg ⁻¹)	3.15 ^a	3.00 ^a	3.23 ^a	2.82 ^a	2.08 ^a	2.92 ^a
MS	23.16 ^{ab}	25.79 ^a	24.19 ^{ab}	21.43 ^b	21.15 ^b	20.66 ^b
EE	22.61 ^a	18.09 ^a	15.85 ^b	21.03 ^b	11.04 ^c	11.35 ^c
PB	16.07 ^{cd}	16.13 ^{bcd}	15.81 ^d	17.06 ^{ab}	17.06 ^{abc}	17.99 ^a

3 *Value in the same row with different superscript letters are significantly different (Tukey's multiple-
 4 range test, P<0.01).

5 ¹ Results showed was based on dry matter (%).

6

- 1 Table 3. Percentage of fishes with bone malformations: cranial, craniofacial, lordosis,
 2 scoliosis, spin end (SE), exophthalmia and all previous (AP) of zebrafish fed diets
 3 varying dietary phosphorus levels.

Deformities (%)	Diets					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Cranial	45.2	28.8	27.4	14.6	0.0	0.0
Craniofacial	45.2	28.8	21.9	12.0	2.6	1.3
Lordosis	27.4	12.3	9.6	4.0	0.0	0.0
Scoliosis	1.3	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
SE	50.7	38.3	34.2	25.3	0.0	0.0
Exophthalmia	13.7	6.8	5.4	4.0	0.0	0.0
AP	15.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0

4

1 Table 4. Bone tissue thickness in the medial head (MHS) and spine end (SES) of
 2 zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.

Thickness (μm)	Diets					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
MHS	3.73 ^c	3.63 ^c	3.93 ^c	5.58 ^b	9.22 ^a	9.95 ^a
SES	4.87 ^d	4.53 ^d	6.25 ^c	9.06 ^b	14.73 ^a	15.50 ^a

3 *Value in the same row with different superscript letters are significantly different (Tukey's multiple-
 4 range test, $P < 0.01$.
 5

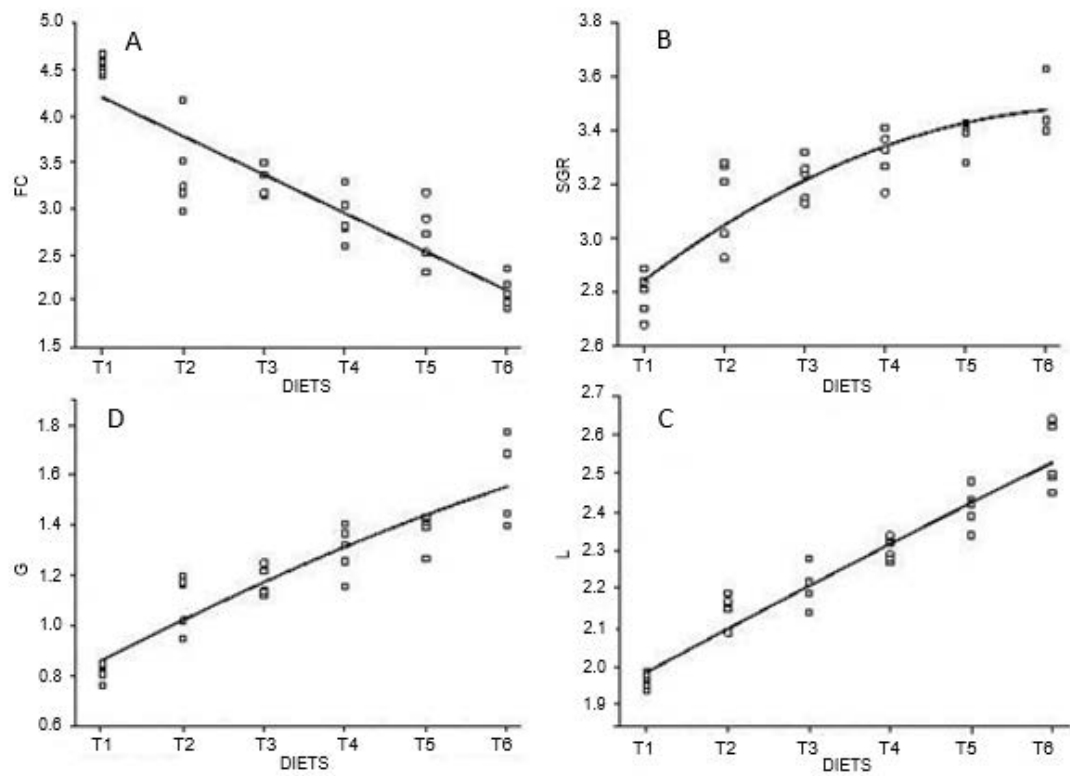


Figure 1. Performance of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. A – Feed conversion (FC); B – Specific growth rate (SGR); C - Growth (G) e D - Length (L).

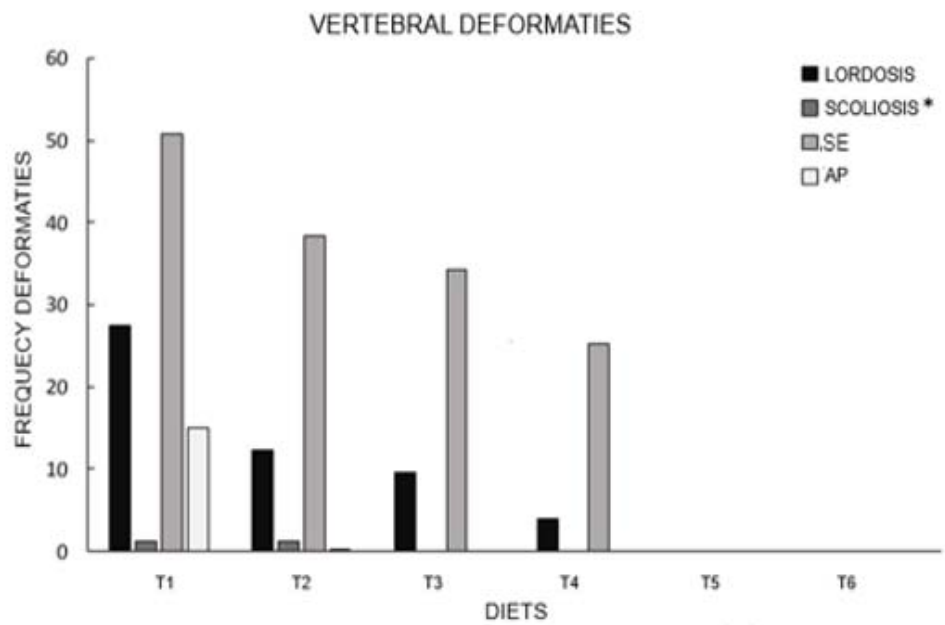


Figure 2. Percentage of fishes with vertebral deformities: lordosis, scoliosis, spine end (SE) and all previous (AP) of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.

Chi-square test results:

LORDOSIS

Diets (%)	T1	T2	T3	T4	T5
T1	x	<0.02	<0.01	<0.01	<0.01
T2		x	ns	ns	<0.01
T3			x	ns	<0.01
T4				x	ns
T5					x
T6					

SPIN END

Diets (%)	T1	T2	T3	T4
T1	x	ns	<0.04	<0.01
T2		x	ns	ns
T3			x	ns
T4				x
T5				
T6				

1 ALL PREVIOUS

Diets (%)	T1	T2	T3	T4
T1	x	<0.01	<0.01	ns
T2		x	ns	ns
T3			x	ns
T4				x
T5				
T6				

2

3

4

5

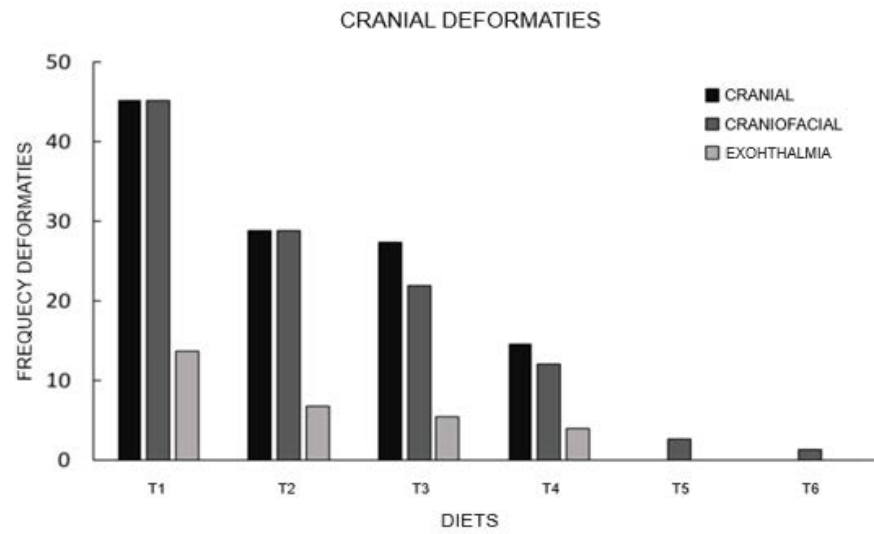


Figure 3. Percentage of fishes with cranial, craniofacial and exophthalmia deformities of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels.

Chi-square test results:

CRANIAL

Diets (%)	T1	T2	T3	T4
T1	x	<0.04	<0.02	<0.01
T2		x	ns	<0.03
T3			x	<0.05
T4				x
T5				
T6				

CRANIOFACIAL

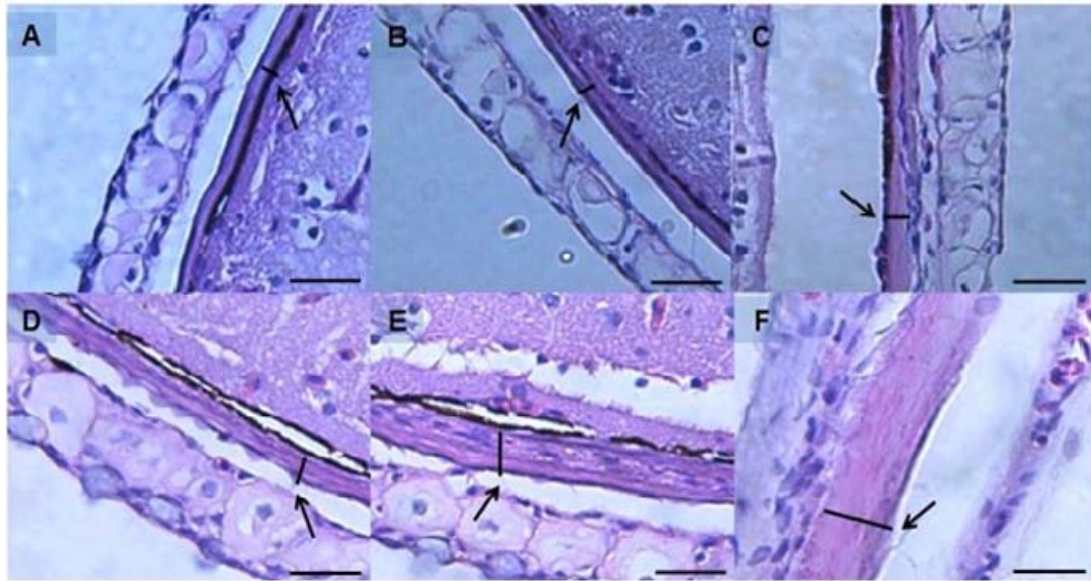
Diets (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T1	x	<0.04	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
T2		x	ns	<0.01	<0.01	<0.01
T3			x	ns	<0.01	<0.01
T4				x	<0.02	<0.01
T5					x	ns
T6						x

1 EXOPHTHALMIA

Diets (%)	T1	T2	T3	T4	T5
T1	x	ns	ns	<0.03	<0.01
T2		x	ns	ns	<0.02
T3			x	ns	<0.04
T4				x	ns
T5					x
T6					

2

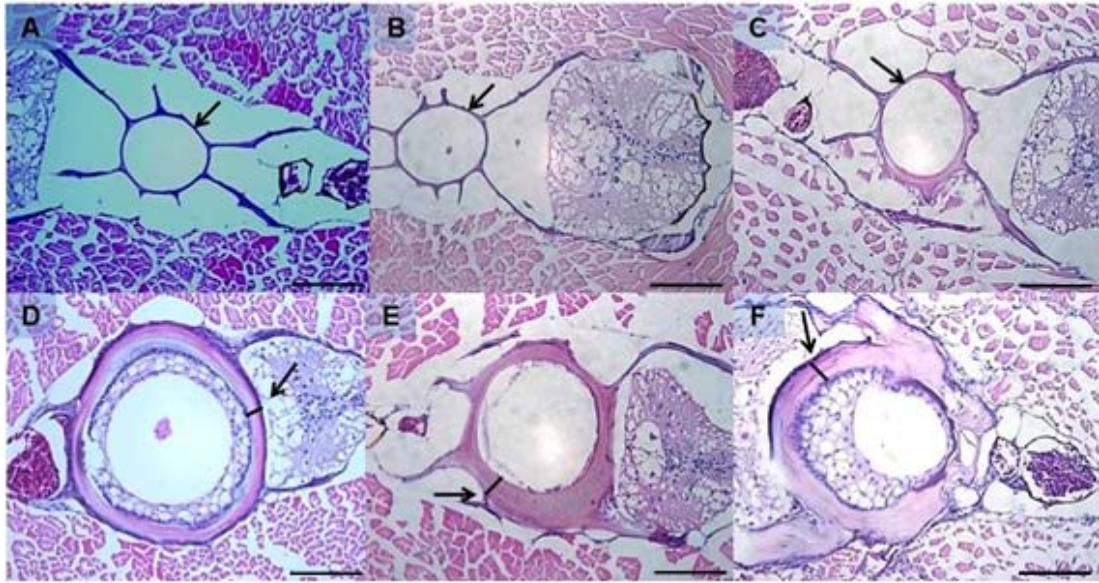
3



1

2 Figure 4. Bone tissue thickness into Medial Head Section (MHS) of zebrafish fed diets varying
3 dietary phosphorus levels (microns). A – T1; B – T2; C – T3; D – T4; E – T5; F – T6. Scale
4 250µm.

5



1

2 Figure 5. Bone tissue thickness in the Spine End Section (SES) of zebrafish fed diets varying
3 dietary phosphorus levels (microns). A – T1; B – T2; C – T3; D – T4; E – T5; F – T6. Scale
4 250µm.

5

CAPÍTULO 3

Este artigo foi elaborado de acordo com as normas do periódico

Journal of Fish Diseases

ANOMALIAS ESQUELÉTICAS EM ZEBRAFISH ALIMENTADOS COM NÍVEIS DE FÓSFORO

RESUMO: Este estudo teve como objetivo descrever as anomalias esqueléticas em zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas suplementadas com níveis de fósforo. Foram utilizados 450 alevinos de zebrafish (peso médio inicial de $0,0079 \pm 0,0003\text{g}$ e idade de 31 dias pós-eclosão), distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os peixes foram alimentados 6 vezes ao dia à temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, o pH e as concentrações de amônia e oxigênio dissolvido foram de $6,8 \pm 0,32$, $0,06 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$ e $6,5 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Após o período experimental de 8 semanas, os peixes foram diafanizados para possibilitar avaliar internamente as deformidades ósseas (craniais e vertebrais). A ocorrência de fusão parcial das espinhas neurais e hemais, ausência de fusão nas espinhas, ausência de paralelismo entre as espinhas neurais e hemais, normalidade do espaçamento intervertebral, compressão vertebral, intensidade das deformidades: escoliose, lordose, anquilose e inserção da nadadeira caudal, e as deformidades craniofaciais foram inversamente proporcionais ao aumento do P dietético. Não foi observada influência na mortalidade pelas dietas avaliadas. A concentração de P dietético é fator crítico na ocorrência de anomalias esqueléticas em zebrafish, e a concentração de 1,55% de P total na dieta reduziu significativamente a ocorrência de deformidades esqueléticas. Pode-se concluir que a inclusão de 1,55% de fósforo total nas dietas reduz a incidência de anomalias esqueléticas e está intimamente ligada à mineralização óssea, influenciada pela expressão do gene da osteocalcina.

Palavras-chave: *Danio rerio*, deformidade óssea, diafanização, fósforo

SKELETAL ANORMALIES IN ZEBRAFISH FEED WITH DIFFERENT PHOSPHORUS LEVELS

ABSTRACT: The aims of this study were to describe skeletal abnormalities in zebrafish (*Danio rerio*) fed by different phosphorus diets levels. For the experiment 450 zebrafish fingerlings were used (0.0079 ± 0.0003 g average weight with 31 days after hatching), distributed in a completely randomized design experiment with five replications. The fish were fed six times a day at 28 ± 1 °C , 6.8 ± 0 , 32 pH, 0.06 ± 0.01 mg L⁻¹ ammonia concentration and 6.5 ± 0.3 mg L⁻¹ dissolved oxygen. After 8-week experiment, fish were diaphanized to evaluate bone deformities (cranial and spinal). The partial neural and hemal fusion spines occurrence, spines fusions absence, parallelism absence between neural and hemal spines, intervertebral normal spacing, vertebral compression, deformities intensity: scoliosis, lordosis, ankylosis and fin caudal insertion, and craniofacial deformities were proportional inversely to P dietary increase. There was no fish mortality in all treatments. It was found that the dietary phosphorus concentration is critical factor in the zebrafish skeletal abnormalities occurrence, and 1.55% of P concentration in the diet reduces significantly skeletal deformities occurrence. It can be concluded that 1.55% total phosphorus inclusion in the diet reduces skeletal abnormalities incidence and is closely related with bone mineralization, influenced by osteocalcin gene expression.

Keywords: bone deformity, *danio rerio*, diaphanization, phosphorus

1 INTRODUÇÃO

2

3 O zebrafish (*Danio rerio*) é considerado um dos modelos biológicos mais
4 utilizados para estudos em toxicologia, neurobiologia e genética molecular, devido ao
5 seu rápido desenvolvimento (Dahm 2002), alta capacidade reprodutiva (Wegrzyn &
6 Ortubay 2009), desenvolvimento larval transparente (Biga & Goetz 2006) e ampla
7 variedade de ferramentas moleculares e informações disponíveis para análise genômica
8 (Johnston *et al.* 2008); além de ser considerado como modelo para estudos de nutrição e
9 crescimento em peixes (Ulloa *et al.* 2011).

10 Apesar de sua importância para pesquisa existem poucos estudos das
11 exigências nutricionais do zebrafish (Westerfield 2000, Robison *et al.* 2008). Uma vez
12 confinados em laboratórios para pesquisa, o zebrafish deve atender sua exigência
13 nutricional e energética por meio do alimento fornecido. Estas dietas devem ser
14 balanceadas e fornecer a quantidade necessária de minerais, devido à sua importância
15 no metabolismo dos peixes (Lall 2002, NRC 2011).

16 O fósforo é um macromineral essencial, que junto ao cálcio são os principais
17 constituintes da porção inorgânica da dieta (NRC 2011). Atua na formação de
18 coenzimas, fosfolipídios, ácidos nucleicos e na transferência de energia por meio da
19 quebra do ATP para os processos de metabolismo e contração muscular, além de
20 compor a estrutura de tecidos duros, como ossos, dentes e escamas (Hardy & Gatlin III
21 2002), e de tecidos moles, onde é componente estrutural e de material genético (Lall
22 2002).

23 O tecido ósseo é a reserva de cálcio, fósforo e outros íons que são
24 disponibilizados para o sangue e outros fluídos celulares (Lall 2002). A principal

1 estrutura óssea dos peixes é a coluna vertebral, também chamada de esqueleto axial
2 (Leprévost & Sire 2014). Ela está segmentda em vértebras, que por sua vez são
3 estruturadas em espinhas neurais (dorsalmente) e espinhas hemais (ventralmente)
4 (Moreira *et al.* 2001).

5 Deformidades esqueléticas em teleósteos são estudadas há bastante tempo,
6 porém suas causas ainda são pouco claras por serem oriundas de diversos parâmetros,
7 como a qualidade de água, genética dos animais e alimento fornecido (Leprévost & Sire
8 2014). Neste sentido, sem atribuir à causas específicas, Ferreri *et al.* (2000) compararam
9 zebrafish selvagem e de cultivo, constatando deformidades na região caudal em 86% e
10 100% dos animais avaliados, respectivamente.

11 Devido à diversas dessas deformidades serem irreversíveis, se faz necessário o
12 diagnóstico da deficiência antes dos sinais da baixa mineralização óssea, como as
13 deformidades. Assim, com o advento de diversas técnicas moleculares, como a de PCR
14 em tempo real, podem ser úteis para determinar tendências específicas e consistentes
15 referentes a influência do nível de P dietético na mineralização óssea.

16 Dentre as proteínas relacionadas à mineralização óssea, a osteocalcina (BGP ou
17 Oc) é de suma importância por atuar diretamente na inibição da calcificação de ossos
18 (Price 1990), por regular a reabsorção óssea (Harada & Rodan 2003).

19 Tendo em vista a importância da nutrição adequada de animais de biotério,
20 uma vez que as dietas deficientes podem influenciar nos resultados obtidos em estudos
21 que utilizam modelos biológicos, este estudo teve por objetivo avaliar a influência de
22 níveis de fósforo em deformidades esqueléticas e na expressão relativa do gene
23 codificador da proteína Oc em zebrafish.

24

1 MATERIAL E MÉTODOS

2

3 *Animais*

4

5 O processo reprodutivo foi realizado na FMVZ - Unesp, Laboratório de
6 Pesquisa em Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri, Câmpus de Botucatu.
7 Passados quatro dias de eclosão dos ovos, iniciou-se a alimentação com gema de ovo
8 cozida e microvermes (*Panagrellus redivivus*), e após 10 dias, complementou-se esta
9 alimentação com náuplios de artemia salina, até o dia 30 pós-eclosão.

10

11 *Experimento*

12

13 O experimento foi realizado na FMVZ - Unesp, Laboratório de Pesquisa em
14 Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri, Câmpus de Botucatu. Foram utilizados
15 450 alevinos de zebrafish com idade de 31 pós eclosão, peso médio de $0,0079 \pm$
16 $0,0003\text{g}$, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos
17 e seis repetições, sendo cada unidade experimental um aquário alojando 15 indivíduos.
18 Para tal foram utilizados 30 aquários de 15 L de volume, com temperatura constante em
19 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, considerada a ideal para a espécie (Westerfield 2000).

20 Os aquários foram abastecidos por sistema de recirculação de água, provido de
21 filtro físico e biológico para reduzir as impurezas e os níveis de amônia, sendo mantida
22 a temperatura constante em $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. O nível de pH e as concentrações de amônia e
23 oxigênio dissolvido foram de $6,8 \pm 0,32$, $0,06 \pm 0,01\text{ mg L}^{-1}$ e $6,5 \pm 0,3\text{ mg L}^{-1}$,
24 respectivamente, aferidos semanalmente com a sonda multi probe YSI 556® (YSI

1 Environmental, Yellow Spring, OH, USA). Ao final do experimento, os animais foram
2 coletados e insensibilizados com óleo de cravo (50 mL.L⁻¹) e, posteriormente, abatidos
3 em superdose de benzocaína e fixados em formol a 5% por 10 dias para posterior
4 diafanização.

5

6 *Dietas*

7

8 As dietas (isoprotéicas e isoenergéticas) foram formuladas com base numa
9 ração referência, denominada de semipurificada (Tabela 1), segundo o Instituto de
10 Nutrição Americano (Ina 1977), formulada para conter 40% de proteína bruta (PB) e
11 3.500 kcal de energia digestível (ED) (Sá *et al.* 2005), sendo adicionados 10g.kg⁻¹ de
12 farinha de peixe como palatilizante. As dietas foram elaboradas para conterem: 0,35
13 (T1); 0,65 (T2); 0,95 (T3); 1,25 (T4); 1,55 (T5) e 1,85% (T6) de fósforo total, baseado
14 na exigência da carpa de 0,7-0,9% P total (NRC 2011).

15

16 *Diafanização*

17

18 A diafanização foi baseada em protocolo adaptado de Pontthoff (1984). Dois
19 peixes por unidade experimental conservados em formol foram lavados em água
20 destilada (24 horas) para retirada do excesso de fixador, sendo então desidratados em
21 duas baterias de álcool (50% e 95%) por 24 horas cada.

22 Para coloração da cartilagem, os peixes foram imersos em solução de azul de
23 alcian (30% de azul de alcian diluído em 60% álcool absoluto e 40 % ácido acético) por
24 24 horas. Os animais foram transferidos para solução saturada de Borato (5 horas),
25 solução de branqueamento (2hs, 3% H₂O₂ em KOH 2%) e solução de clareamento (7

1 horas, 35% de borato saturado e 65% de H₂O₂ destilada). Logo após, os exemplares
2 foram imersos em solução para coloração dos ossos (Alizarina 2% em solução de KOH
3 2%) por 24 horas, sendo então transferidos para solução de preservação I (24 horas,
4 Glicerina 30% + KOH 2%), solução de preservação II (24 horas, Glicerina 60% + KOH
5 2%) e finalmente a solução de manutenção (Glicerina + Timol).

6

7 *Deformidades esqueléticas*

8

9 A severidade das anomalias esqueléticas foi definida em escala numérica
10 crescente, de um a seis, um para animais que apresentavam menor e 6 para maior grau
11 de severidade. A anomalia craniofacial corresponde ao alongamento da mandíbula
12 inferior em relação à superior, denominada prognatismo.

13

14 *Avaliação da expressão gênica*

15

16 Para o estudo da expressão gênica foram coletados dois indivíduos de cada
17 unidade experimental, totalizando 10 animais por tratamento. Após a colheita as
18 amostras foram imediatamente armazenadas em freezer -80° C.

19 Para a extração de RNA, as amostras foram maceradas individualmente com o
20 auxílio de cadinho e pistilho de cerâmica previamente autoclavados e descontaminados
21 com RNase AWAY® (Thermo Fisher Scientific) em nitrogênio líquido, a fim de manter
22 a integridade das amostras para a extração de RNA de qualidade. A extração do RNA
23 foi feita pelo método TRIzol, utilizando-se para cada amostra 500 µl de TRIzol (GIBCO
24 BRL), para romper as células e liberar seu conteúdo. O produto da extração foi

1 visualizado em gel de agarose 1%, e quantificados com o aparelho NanoDrop
2 (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, todas as amostras foram armazenadas a -
3 80°C até a síntese de cDNA.

4 Após o tratamento do RNA com DNase, o cDNA foi sintetizado utilizando
5 uma solução de oligo dT (N=18) 0,75 mM, oligos aleatórios (N=8) 0,15 mM, dNTP
6 0,75 mM e 11 µl RNA tratado com DNase na etapa anterior, sendo então incubada a
7 65°C por 5 minutos e depois colocada no gelo por 1 minuto. A esta preparação
8 adicionou-se tampão 1x, DTT 0,005 M, RNase out 40 U e 100 U da enzima super
9 script III. Essa preparação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15
10 minutos para inativar a enzima.

11 A mineralização óssea foi avaliada pela expressão do gene Oc. Como controle
12 interno para as reações de Real Time PCR foi utilizado o gene *ef1α* (Tabela 2)
13 previamente descritos por Tang *et al.* (2007).

14 As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho ABI 7300
15 (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied
16 Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50°C por 2 minutos;
17 um ciclo a 94°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e
18 60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95°C por 15
19 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos. A determinação da expressão
20 dos genes foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real
21 (Real-time PCR), em triplicatas. Em cada reação foi feito um controle negativo
22 constituído da mistura de reagentes e água.

23 Para calcular a eficiência dos oligonucleotídeos, foram feitas quatro diluições
24 das amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. A eficiência (E) foi calculada pela

1 fórmula: $E=10^{(-1/\text{inclinação})}$. A quantificação relativa (R) dos genes foi determinada de
 2 acordo com Pfaffl (2001), na qual o crossing point é definido como o ponto em que a
 3 fluorescência detectada está acima da fluorescência de fundo. Para o cálculo da
 4 expressão relativa de Oc, o valor de crossing point dos peixes do T6 foi utilizado como
 5 controle, de acordo a seguinte fórmula:

6

$$7 \quad R = \frac{E_{\text{alvo}} \Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}{\Delta CP_{\text{endógeno}} (\text{controle} - \text{amostra}) E_{\text{endógeno}}}$$

9

10 *Estatística*

11

12 Os parâmetros de ausência de paralelismo entre espinhas neurais e hemais,
 13 fusão parcial das espinhas neurais, fusão parcial das espinhas hemais, ausência de fusão
 14 das espinhas, normalidade do espaçamento intervertebral, compressão vertebral e
 15 expressão relativa do gene codificador da proteína osteocalcina foram submetidos à
 16 análise de variância (ANOVA), e em caso de diferença significativa, complementadas
 17 com o teste de Kruskal Wallis a 5% de significância.

18 Para a anomalia craniofacial foi empregado o teste de qui-quadrado de Pearson,
 19 (Ayres *et al.* 2000).

20

21 **RESULTADOS**

22

23 A fusão parcial das espinhas neurais e hemais, Figuras 1-A e 1-B, foi mais
 24 observada nos animais do T1, T2 e T4, e ausente no T5 e T6 ($P \leq 0,0001$). A redução da

1 ausência de fusão nas espinhas nos peixes foi proporcional ao aumento do P nas dietas,
2 sendo que os peixes do T6 não apresentaram esta deformidade nas espinhas, Tabela 3.

3 A ausência de paralelismo entre as espinhas neurais e hemais foi mais crítica
4 nos peixes do T1, não observando nenhum caso da deformidade ($P \leq 0,0001$) nos peixes
5 do T6.

6 A normalidade do espaçamento intervertebral foi observada nos animais do T4,
7 T5 e T6 ($P \leq 0,0001$). Houve maior ocorrência de vértebras espaçadas nos peixes do T1,
8 correspondendo à 80% do total das vértebras. Os tratamentos T2 e T3 possuíram maior
9 número de indivíduos com vértebras comprimidas ($P \leq 0,0001$), deformidade ausente
10 nos animais do T6.

11 A intensidade das deformidades escoliose e lordose foram mais severas nos
12 animais dos tratamentos T1, T2, T3 e T4, ($P \leq 0,0001$), com escore variando de 1 a 3
13 para a escoliose, e de 2 a 4 para lordose, Figura 2. Os animais do T5 e T6 apresentaram
14 menor intensidade de escoliose e lordose, não diferindo entre si ($P \leq 0,0001$).

15 A deformidade craniofacial também foi observada em maior severidade nos
16 animais do T1, T2, T3 e T4, diferindo estatisticamente do T5 e T6, os quais não
17 apresentaram diferença entre si, Tabela 4.

18 As intensidades das deformidades anquilose e inserção da nadadeira caudal
19 (SE) foram inversamente proporcionais ao aumento do P dietético, sendo que a
20 intensidade da anquilose foi maior nos indivíduos do T1 e T2, enquanto a intensidade da
21 SE foi maior no T1, Figura 5.

22 Observou-se que a expressão relativa do gene codificador da proteína Oc teve
23 correlação negativa ao nível de fósforo ofertado pela dieta, Figura 6.

24

1 **DISCUSSÃO**

2

3 As deformidades esqueléticas observadas neste estudo foram os principais
4 sinais morfológicos encontrados em diversas pesquisas com peixes alimentados com
5 dietas deficientes de P (Borlongan & Satoh 2001, Lall 2002, Sugiura, Hardy & Roberts
6 2004, Oliva-teles & Rodrigues-Pimentel 2004). Estes resultados estão intimamente
7 ligados à nutrição devido ao seu efeito no desenvolvimento esquelético estando
8 relacionada com as malformações ósseas (Kamler *et al.* 2008, Tocher *et al.* 2008).
9 Desse modo, o fator responsável pela alta ocorrência de deformidades ósseas em peixes
10 alimentados com dietas deficientes de P é a baixa mineralização óssea provocada pela
11 falha na deposição do mineral no osso ou pela reabsorção óssea (Kaushik 2001).

12 Devido à função de suporte para o corpo, o esqueleto dos peixes é submetido à
13 fortes tensões mecânicas durante a natação, fato determinante na grande importância da
14 nadadeira caudal e das vértebras (Leprévost & Sire 2014), sendo estas as regiões ósseas
15 mais afetadas pela concentração de P dietético, uma vez que influenciam a direção e a
16 intensidade do impulso. Este fato justifica também o alto grau de anomalia nestas
17 regiões, uma vez que demandam maior concentração de P para a mineralização e
18 reposição mineral provocada pelos desgastes ósseos.

19 A maior incidência de anomalias vertebrais nos animais dos tratamentos T1, T2
20 e T3 (dietas com P insuficiente) confirmam a influência do P na baixa mineralização
21 óssea. Apesar dos animais do T1 e T2 terem o maior número de espinhas com fusão
22 parcial, e esta deformidade ser uma das mais severas por afetarem o corpo vertebral
23 (Boglione *et al.* 2013b), esta deformidade não exerce nenhum dano externo ao animal
24 segundo os autores, pois suas funções são de proteção da medula espinhal e de suporte à
25 musculatura dorsal, não ocasionando prejuízos à natação e estrutura óssea.

1 A combinação entre o maior espaçamento intervertebral e a compressão das
2 vértebras dos animais alimentados com as dietas contendo menores níveis de P podem
3 estar relacionadas à esforços mecânicos da coluna vertebral, devido a necessidade
4 biológica de crescimento do peixe (Boglione *et al.* 2013b). Uma vez alimentado com
5 dieta deficiente de P para o desenvolvimento adequado da espinha vertebral, o
6 organismo pode utilizar o artifício de espaçar as vértebras como forma de compensação
7 deste déficit e ao mesmo tempo permite o crescimento constante do peixe. Esta
8 deformidade também foi observada por Fjellidal *et al.* (2007) em estudo com salmão do
9 Atlântico, no qual os autores relatam que o maior espaçamento intervertebral reduz o
10 suporte mecânico da bexiga natatória e, como ação compensatória, o peixe utiliza
11 excessivamente as nadadeiras, combinação que provocou anomalias no eixo da coluna,
12 como lordose e escoliose. Assim, esta pode ter sido a causa da maior severidade da
13 lordose e escoliose observada nos animais do T1, T2, T3 e T4 neste estudo.

14 Semelhante ao observado neste estudo, os sinais de deficiência de P observados
15 em arinca (*Melanogrammus aeglefinus*) foram nas vértebras e próxima à região caudal
16 (Yang *et al.* 2006), área mais afetada pela baixa ingestão do mineral.

17 A deformidade craniofacial, Figura 4, foi observada com maior frequência nos
18 animais alimentados com dietas deficientes de P (T1, T2, T3 e T4), além de reduzir o
19 valor comercial dos peixes, também diminui a ingestão de alimento, reduzindo o
20 crescimento e o peso corporal (Pittman *et al.* 1989), danos que aumentam os custos de
21 peixes cultivados e, quando utilizado como modelo biológico, podem influenciar os
22 resultados das pesquisas.

23 A influência da mineralização óssea nas deformidades na região caudal dos
24 peixes, como anquilose e SE, pode ocorrer devido às vértebras dessa região estarem em

1 constante desgaste, além disso são maiores e mais mineralizadas, uma vez que possuem
2 maior resistência mecânica (Fjelldal *et al.* 2006), e pertencerem à região da musculatura
3 responsável pela força propulsora.

4 Pelo fato dos nutrientes utilizados em dietas influenciarem o metabolismo, suas
5 concentrações também controlam a expressão gênica (Panserat & Kaushik, 2010), uma
6 vez que ambas são respostas fisiológicas. Assim, o nível de P das dietas pode afetar
7 diretamente o desenvolvimento esquelético pela influência na expressão relativa de
8 genes específicos, como o Oc.

9 A expressão negativa da Oc nos peixes com maior P (T4 e T5) se comparado
10 aos demais (T1, T2 e T3), podendo ter relação com a maior mineralização óssea nestes
11 indivíduos, devido à sua associação ao processo de deposição mineral nos ossos, uma
12 vez que quando expressa de maneira negativa em roedores ocorre o aumento da massa
13 óssea e melhora da qualidade funcional do tecido ósseo (Ducy *et al.* 1996), concluindo
14 que a Oc é regulador negativo na formação óssea. Resultado semelhante foi obtido por
15 (Hofbauer & Heufelder, 1997) em roedores, que relatam aumento da densidade óssea e
16 qualidade funcional do osso com baixa expressão da Oc.

17 Poucas são as informações sobre as consequências das anomalias esqueléticas
18 em peixes, mas em geral, resultam em efeitos negativos no bem-estar animal,
19 performance biológica, qualidade do produto e custos de produção (Boglione *et al.*
20 2013a, Boglione *et al.* 2013b). Como o uso do zebrafish se restringe à aquariofilistas e
21 animal de biotério em pesquisas laboratoriais, as anomalias esqueléticas causadas por
22 dietas deficientes de P podem não só reduzir seu valor comercial, mas principalmente
23 influenciar os resultados de estudos que utilizem o zebrafish como modelo biológico.

24

1 **CONCLUSÃO**

2

3 A concentração de P na dieta é fator crítico na ocorrência de anomalias
4 esqueléticas de zebrafish, sugerindo-se a concentração dietética de 1,55% de P total para
5 a adequada mineralização óssea com base nas deformidades ósseas. A expressão
6 relativa do gene Oc foi influenciado pelo nível de P dietético, e sua expressão teve
7 efeito negativo na mineralização óssea.

8

9

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

3 Ayres M., Ayres Jr M., Ayres D.L. & Santos A.S. (2000) Bioestat 2.0. In: *Aplicações*
 4 *Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. pp. 259. Sociedade Civil,
 5 Mato grosso, Brazil.

6 Biga PR., Goetz FW. (2006) Zebrafish and giant danio as models for muscle growth:
 7 determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis.
 8 *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative*
 9 *Physiology*, **291**, 1327-1337.

10 Boglione C., Gavaia P., Koumoundouros G., Gisbert E., Moren M., Fontagné S. &
 11 Witten P.E. (2013a) Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles.
 12 Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Aquaculture* **5**, 99-120.

13 Boglione C., Gisbert E., Gavaia P., Witten P.E., Moren M., Fontagné S. &
 14 Koumoundouros G. (2013b) Skeletal anomalies in reared European fish larvae and
 15 juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Aquaculture* **5**,
 16 121-167.

17 Borlongan I.G. & Satoh S. (2001) Dietary phosphorus requirement of juvenile
 18 milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal). *Aquaculture Research* **32**, 26-32.

19 Dahm R. & Geisler R. (2006) Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model
 20 organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, **8**, 329-345.

21 Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J.,
 22 Goldstein S., Gundberg C., Bradley A., Karsenty G. (1996) Increased bone formation
 23 in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**, 448-452.

24 Ferreri F., Nicolais C., Boglione C. & Bertolini B. (2000) Skeletal characterization of
 25 wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters. *Journal of Fish*
 26 *Biology* **56**, 1115-1128.

27 Fjelldal P.G., Lock, E.J., Grotmol, S., Totland, G.K., Nordgarden, U., Flik, G., Hansen,
 28 T., 2006. Impact of smolt production strategy on vertebral growth and
 29 mineralization during smoltification and the early seawater phase in Atlantic salmon
 30 (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture* **261**, 715–728.

- 1 Fjelldal P.G., Hansen T. & Berg A.E. (2007) A radiological study on the development
2 of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*
3 **273**, 721-728.
- 4 Harada S. & Rodan G.A. (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone
5 mass. *Nature* **423**, 349-355.
- 6 Hardy R.W. & Gatlin D.M. Nutritional strategies to reduce nutrient losses in intensive
7 aquaculture. (2002) *Aquaculture and the Environment in the United States*, World
8 *Aquaculture Society*, 155-165.
- 9 Hofbauer L.C. & Heufelder A.E. Increase bone formation in osteocalcin deficient mice.
10 (1997) *European Journal of Endocrinology* **136**, 586-587.
- 11 INA. (1997) Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards
12 for nutritional studies. *Journal Nutrition* **107**, 1340-1348.
- 13 Johnston I., Macqueen D. & Watabe, S. (2008) Molecular biotechnology of
14 development and growth in fish muscle. In: Fisheries for global welfare and
15 environment. (ed. by Tsukamoto K., Kawamura T., Takeuchi T., Beard T.D., Kaiser
16 M.), pp.241-262, 5th World Fisheries Congress, Scotland.
- 17 Kamler E., Wolnicki J., Kaminski R. & Sikorska J. (2008) Fatty acid composition,
18 growth and morphological deformities in juvenile cyprinid, *Scardinius*
19 *erythrophthalmus* fed formulated diet supplemented with natural food. *Aquaculture*
20 **278**, 69-76.
- 21 Kaushik, S.J. (2001) Mineral nutrition. In: Nutrition and Feeding of Fish and
22 Crustaceans (ed. by Guillaume J., Kaushik S.J., Bergot P., Métailler R.), pp.169-181.
23 Praxis Publishing, Chichester, UK.
- 24 Lall, S.P. (2002) The minerals. In: Fish Nutrition (ed. by Halver J.E., Hardy R.W.),
25 pp.260-308. Academic Press, San Diego, USA.
- 26 Leprévost B. A. & Sire J.Y. (2014) Architecture, mineralization and development of the
27 axial skeleton in Acipenseriformes, and occurrences of axial anomalies in rearing
28 conditions; can current knowledge in teleost fish help? *Journal of Applied*
29 *Ichthyology* **30**, 767-776.
- 30 Moreira H.L.M., Vargas L., Ribeiro R.P. & Zimmermann S. (2001) Fundamentos na
31 moderna aquicultura, pp. 200. Canoas: ULBRA.

- 1 NRC - National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp,
2 pp.376. The National Academy Press, Washington, DC.
- 3 Oliva-Teles A. & Pimentel-Rodrigues, A. (2004) Phosphorus requirement of European
4 sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *Aquaculture Research* **35**, 636-642.
- 5 Panserat S & Kaushik S.J. (2010) Regulation of gene expression by nutritional factors
6 in fish. *Aquaculture Research* **41**, 751-762.
- 7 Pittman K., Skiftesvik A.B. & Harboe T. (1989) Effect of temperature on growth rates
8 and organogenesis in the larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Rapports*
9 *et procès-verbaux des réunions / Conseil permanent international pour l'exploration*
10 *de la mer* **191**, 421-430.
- 11 Potthoff T. (1984) Clearing and staining techniques. In: Ontogeny and sytematics of
12 fishes. (ed. by Moser H.G., Richards W.J., Cohen D.M., Fahay M.P., Kendall Jr.
13 A.W., Richardson S.L.), pp.35-37. The American Society of Ichthyologists and
14 Herpetologists, Special Publication, Allen Press, Lawrence, KS.
- 15 Price P.A. (1990) Vitamin K-dependent bone proteins. In: Vitamin K-Dependent
16 Proteins and Their Metabolic roles (ed. by Saito H., Suttie, J.W.), pp. 49-70,
17 Elsevier, New York.
- 18 Robinson E.H., Rawles S.D., Brown P.B., Yette H.E. & Greene W. (2008) Dietary
19 calcium requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, reared in calcium-free
20 water. *Aquaculture* **53**, 263-270.
- 21 Sá M.V.C., Pezzato L.E.; Barros M.M. & Magalhães Padilha P.M. (2005) Relative
22 bioavailabilty of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia
23 *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **11**, 273-281.
- 24 Sugiura S.H., Hardy R.W. & Roberts R.J. (2004) The pathology of phosphorus
25 deficiency in fish-a review. *Journal of Fish Diseases* **27**, 255-265.
- 26 Tang R., Dodd A., Lai D., McNabb W.C. & Love D.R. (2007) Validation of zebrafish
27 (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta*
28 *Biochimica and Biophysica Sinica* **39**, 384-390.
- 29 Tocher D.R., Bendiksen E.A., Campbell P.J. & Bell J.G. (2008) The role of
30 phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* **280**, 21-34.

- 1 Ulloa P.E., Iturra, P., Neira, R. & Araneda C. (2011) Zebrafish as a model organism for
2 nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to
3 aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **21**, 649-666.
- 4 Wegrzyn D. & Ortubay S. (2009) Salmonidos en patagonia, Mar del plata, Argentina, 1,
5 164p.
- 6 Westerfield M. (2000) The Zebrafish book: A Guide for the Laboratory Use of
7 Zebrafish (*Danio rerio*), pp.232. University of Oregon Press, Eugene, Oregon.
- 8 Yang S.D., Lin T.S., Liu F.G. & Liou C.H. (2006) Influence of dietary phosphorus
9 levels on growth, metabolic response and body composition of juvenile silver perch
10 (*Bidyanus bidyanus*). *Fisheries Research* **253**, 592-601.
- 11
- 12

1 Table 1. Composition of six experimental diets for zebrafish.

Ingredients (%)	Diets					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Albumin	34.74	34.76	34.79	34.81	34.83	34.85
Poultry Viscera Meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Gelatin	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Starch	38.95	36.01	33.11	30.21	27.31	24.42
Soy oil	2.64	3.51	4.36	5.21	6.07	6.92
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Dicalcium phosphate	0.00	2.05	4.07	6.10	8.12	10.14
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
NaCl	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Premix ^a	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin C ^b	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
<i>Chemical Composition*</i>						
Crude Protein %	40.13	40.07	40.00	40.08	40.01	40.10
Crude Lipid %	4.53	5.39	6.24	7.09	7.93	8.78
Total Phosphorus (%)	0.34	0.67	0.93	1.26	1.55	1.81
Available Phosphorus ^c	0.18	0.36	0.50	0.68	0.83	0.97
Ca/P ratio (%)	2.03	2.25	2.32	2.34	2.37	2.38
Energy (kcal ⁻¹)	3.493	3.494	3.506	3.506	3.508	3.493

^a Premix vitamin - mineral premix (composition by kg product): vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; folic acid = 1.200 mg; calcium pantotenate = 12.000 mg; vit. C = 48.000 g; biotin = 48 mg; choline = 65.000 mg; niacin = 24.000 mg; iron = 10.000 mg; cooper = 600 mg; manganese = 4.000 mg; iodine = 20 mg; cobalt = 2 mg e selenium = 20 mg.

^b Vitamin C: calcium salt, 2- ascorbic acid monophosphate, 35% active principle.

^c The values were calculated based on the T1 and T6 diets digestibility (53.84%).

*Analyzed composition diets.

10

11

12

13

14

15

16

1 Table 2. Oligonucleotides sequences used and details.

2

Gene	Gene bank access number	Primers sequence 5'-3'	Amplification (pb)	Ta (°C) ^a	EE (%) ^b
<i>Oc</i>	NM_001083857	CTGCCTGATGA CTGTGTGTGTG AGCG GGCGGCATGAT TCCAGACG	220	61	87.4
<i>ef1α</i>	NM_131263	ACGCCCTCCTG GCTTTCACCC TGGGACGAAGG CAACACTGGC	217	61	115.0

3 ^aTa optimal annealing temperature specific to each oligonucleotide.

4 ^b Measuring the efficiency of the reaction Real Time PCR (calculated trough the standard curve).

5

6

7

8

9

10

11

1 Table 3. Percentage of fishes with vertebral anomalies: parallelism absence between neural and haemal spines, partial fusion neural and
 2 haemal spines, spines absence fusion, intervertebral spacing normal and vertebral compression of zebrafish fed diets varying dietary
 3 phosphorus levels.

4

Anomalies	Diets					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Parallelism absence between neural and haemal spines	51.5 ^a	52.0 ^a	43.0 ^a	39.0 ^{ab}	5.5 ^{bc}	0.0 ^c
Partial fusion neural spines	10.0 ^a	9.0 ^a	6.0 ^a	10.0 ^a	3.0 ^c	0.0 ^c
Partial fusion haemal spines	10.0 ^a	10.0 ^a	8.5 ^b	19.5 ^a	3.0 ^c	0.0 ^c
Spines fusion absence	35.0 ^{ab}	70.0 ^a	61.5 ^a	16.0 ^b	6.0 ^{bc}	0.0 ^c
Intervertebral normal spacing	20.0 ^c	56.5 ^b	54.0 ^b	100.0 ^a	100.0 ^a	100.0 ^a
Vertebral compression	10.0 ^{bc}	32.5 ^a	21.0 ^a	14.0 ^b	6.0 ^{bc}	0.0 ^c

5

*Value in the same row with different superscript letters are significantly different (Kruskal Wallis test, $P < 0.0001$).

1 Table 4. Chi-square test for craniofacial anomaly of zebrafish fed diets varying dietary
 2 phosphorus levels.

3

Diets (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6
T1	x	ns	ns	ns	0.0004*	0.0027*
T2		x	ns	ns	0.0004*	0.0027*
T3			x	ns	0.0117*	0.0019*
T4				x	0.0117*	0.0019*
T5					x	ns
T6						x

4 *Values evaluated in pairs different statistically to the chi-square test ($P < 0.05$).

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

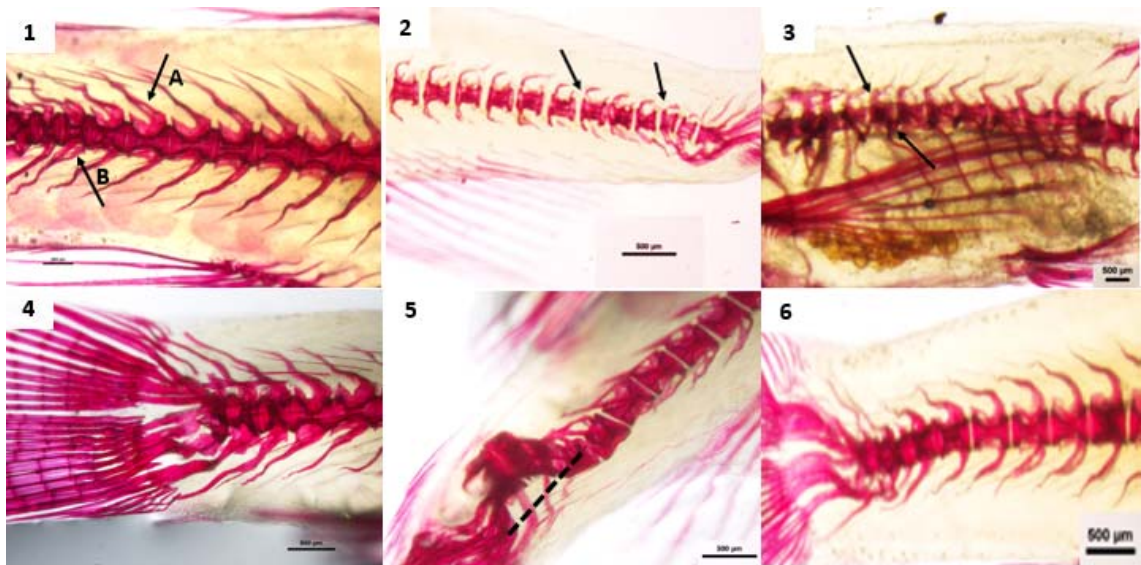


Figure 1. Vertebral and spinal anomalies of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. 1A – arrow show the partial fusion in neural spines; 1B – arrow show the partial fusion in haemal spines; 2 – arrows shows the neural spine absence fusion; 3 – arrows shows the parallelism absence between neural and haemal spines; 4 – normal spine end; 5 – spine end anomaly (the track represent the estimated normality); 6 – ankylosis. Scale 500μm.

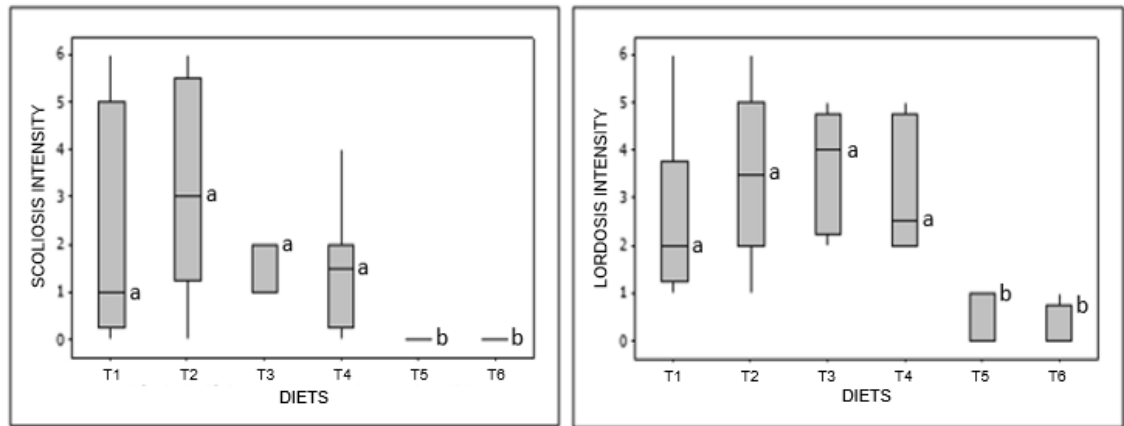
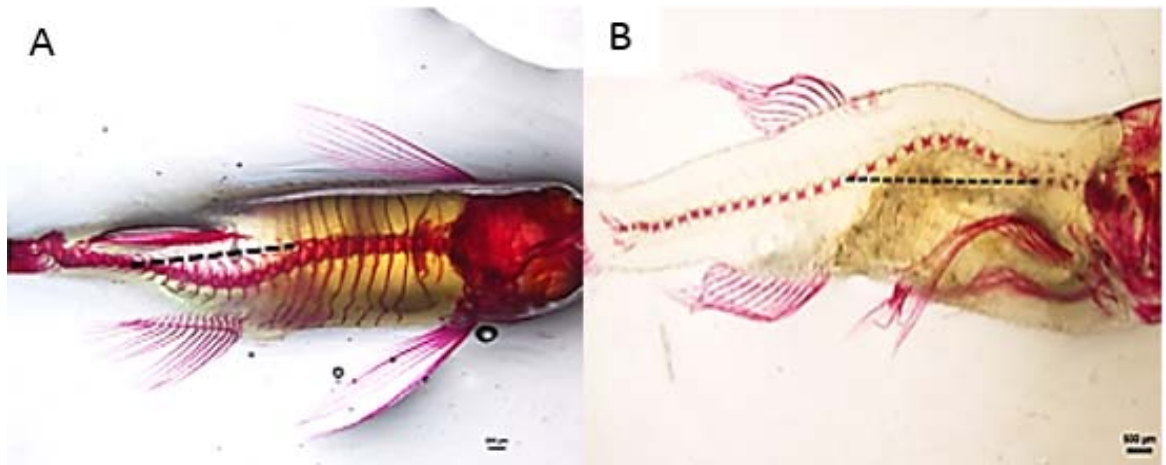
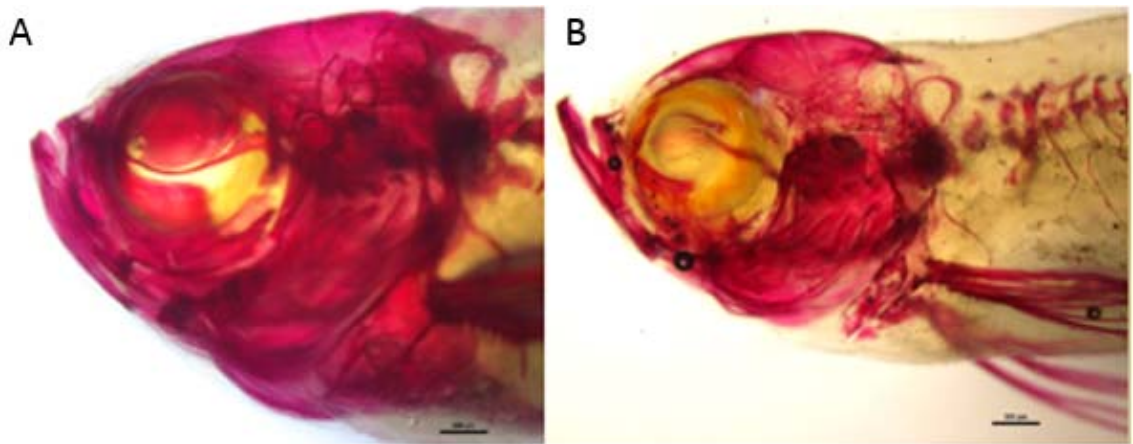


Figure 2. Scoliosis and lordosis intensity boxplot of zebrafish fed diets varying dietary phosphorus levels. Medians with different superscript letter are significantly different (Kruskal Wallis test, $P < 0.0001$).

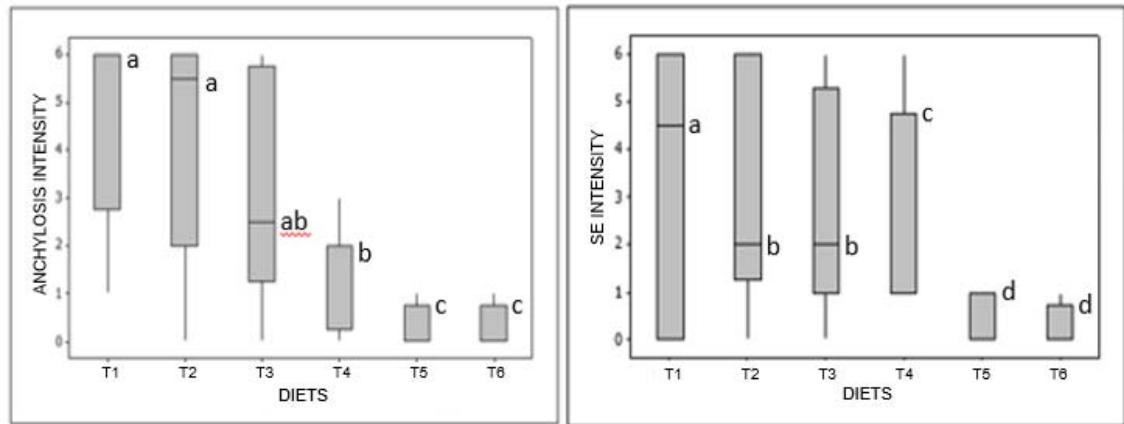


1
2
3
4
5

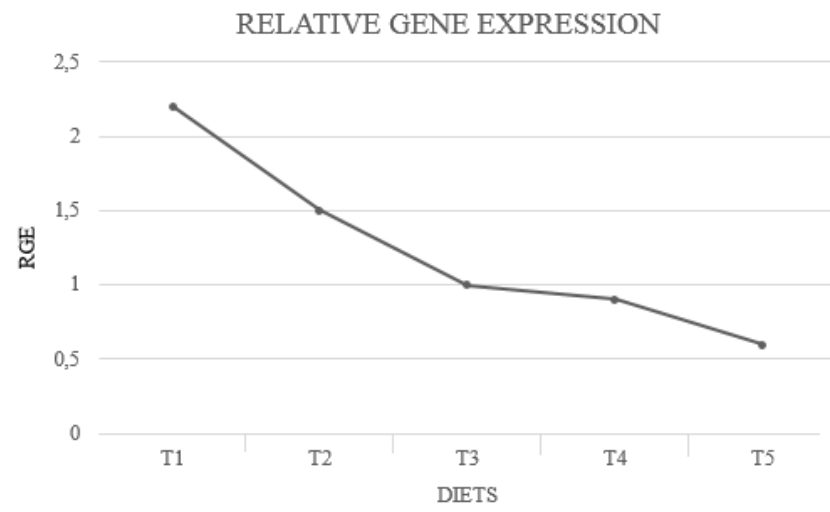
Figure 3. Skeletal anomalies. A – lordosis; B – scoliosis. The track represent the estimated normality. Scale 500μm.



1
2 Figure 4. Craniofacial anomaly. A – normal head; B – lower mandible larger than upper
3 mandible. Scale 500µm.
4
5
6



1
2 Figure 5. Anchylosis and Anormal Spine End (ASE) boxplot of zebrafish fed diets
3 varying dietary phosphorus levels. Medians with different superscript letter are
4 significantly different (Kruskal Wallis test, anchylosis ($P \leq 0.0001$) e ASE ($P \leq 0.003$)).
5



1

2 Figure 6. Relative osteocalcin (Oc) gene expression (RGE) of zebrafish fed diets
3 varying dietary phosphorus levels.

4

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

Apesar de sua grande importância como modelo biológico em estudos para peixes bem como para seres humanos, o zebrafish não possui uma dieta balanceada para ser utilizada como alimentação padrão para zebrafish de biotérios. Ainda neste sentido, organismos alimentados com dietas deficientes de nutrientes e minerais podem apresentar alterações metabólicas que podem influenciar positiva ou negativamente as pesquisas que utilizam o zebrafish, como por exemplo, atribuir anomalias craniais à certa doença que, na realidade, podem estar sendo causadas por deficiência de algum nutriente ou mineral.

Devido à certas anomalias serem reversíveis, sugere-se estudos avaliando a substituição de dietas deficientes em P por dietas com nível de P adequado na alimentação de zebrafish, objetivando avaliar o período adequado desta substituição, bem como sua influência na ocorrência de deformidades ósseas.

Devido à grande disponibilidade de informações de expressão gênica do zebrafish e seu uso crescente como animal de biotério, acredita-se também que este seja um importante para estudos utilizando-o como modelo para teleósteos nas áreas “ômicas” da biologia, principalmente na área da nutrigenômica, que tem como objetivo avaliar a influência dos alimentos fornecidos aos animais na expressão relativa de genes específicos à função destes alimentos.

É recomendável também a realização de mais pesquisas para que se possa elaborar uma dieta completa e com dados específicos da exigência nutricional do zebrafish, que assim poderá ser assumida como padrão para uso em laboratórios nacionais e internacionais, semelhante ao programa alimentar de outro modelo biológico, os roedores.