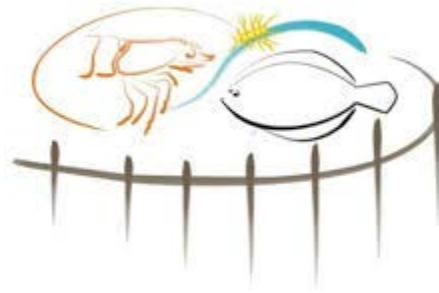




1
2
3
4
5

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



Efeito da restrição alimentar e jejum na atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) em juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Juan Rafael Buitrago Ramírez

Rio Grande, RS

2018

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Efeito da restrição alimentar e jejum na atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) em juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Juan Rafael Buitrago Ramírez

Orientador: Dr. Luís Alberto Romano

Co orientadora: Dra. Virgínia Fonseca Pedrosa

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande -FURG

Rio Grande, RS

Fevereiro, 2018

Ata de Aprovação

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

ÍNDICE

94		
95	Dedicatória	8
96	Agradecimentos	9
97	Resumo geral	10
98	General Abstract	12
99	Introdução	14
100	Fosforilação oxidativa	16
101	ETS	16
102	Biomarcadores	17
103	Biomarcadores para a avaliação do estado metabólico	17
104	Índice Hepatosomático (IHS)	18
105	Hemoglobina	18
106	Glicose no sangue	18
107	Método para análise da atividade do ETS	19
108	Outros métodos para a avaliação da respiração celular	20
109	Crescimento	21
110	Objetivos	23
111	Objetivo Geral	23
112	Objetivos específicos	23
113	Referências	24
114	Avaliação do efeito da restrição alimentar e jejum sobre a atividade do ETS e	
115	crescimento do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	35
116	Resumo	35
117	Abstract	36
118	1 Introdução	36
119	2 Material e Métodos	38
120	2.1 Delineamento experimental	38
121	2.2 Análises de ETS	39
122	2.3 Estatísticas	40
123	3 Resultados	40
124	3.1 Crescimento dos animais	40
125	3.2 Parâmetros Sanguíneos	42
126	3.3 Análises de ETS	42

127	4	Discussão	45
128	5	Referências	47
129		Anexo 1	50
130			
131		Índice de Tabelas	
132		Tabela 1 Composição proximal do alimento fornecido.....	39
133		Tabela 2 Parâmetros zootécnicos e sanguíneos avaliados.....	41
134		Tabela 3 Análise multivariada de correlações de Sperman entre as atividades do	
135		ETS e as variáveis avaliadas.	42
136		Tabela 4 Correlações de Sperman para TCE.	43
137		Tabela 5 Parâmetros do modelo matemático para a predição da TCE.....	43
138		Tabela 6 Análise de Variância do modelo matemático da TCE.....	45
139		Tabela 7 Estatísticos de ajuste do modelo.....	45
140			
141		Índice de figuras	
142		Figura 1 Gráfico do modelo.....	44
143			
144			
145			
146			
147			
148			
149			
150			
151			
152			
153			
154			
155			
156			

157

158

159

160

Dedicatória

161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190

Todas as pessoas que incondicionalmente me apoiaram.

191 **Agradecimentos**

192

193

194 Agradeço ao Brasil, a CAPES, a FURG, a Estação Marinha de Aquacultura e a todas
195 as pessoas que dia a dia contribuem para a ciência crescer, desde o cidadão com
196 seus impostos até o professor com sua entrega diária e luta.

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216 **Resumo geral**

217 A finalidade deste trabalho é testar a aplicabilidade de uma ferramenta normalmente
218 utilizada na ecologia de ambientes aquáticos na bioenergética dentro da área da
219 aquicultura, por meio da qual foi testada a atividade do sistema transportador de
220 elétrons (ETS) em órgãos alvo da espécie *Piaractus mesopotamicus* submetidos a
221 diferentes condições alimentares. O estudo é baseado na hipótese de que a
222 atividade do ETS ou a combinação das atividades do ETS de diferentes órgãos alvo
223 podem ser avaliadas como um biomarcador celular, com capacidade de descrever
224 ou prever parâmetros zootécnicos. O método de avaliação da atividade da ETS
225 foi desenvolvido para medir a ação enzimática do ETS quantificando por colorimetria
226 a oxidação do NADH e NADPH e redução do cloreto de 2-(p-iodofenil)-3-(p-
227 nitrofenil)-5-fenil tetrazolium (INT). O experimento foi desenhado para avaliar o
228 efeito de diferentes regimes alimentares no metabolismo do pacu, sob quatro
229 tratamentos: jejum, consumo ad libitum, outros dois de restrição alimentar com taxa
230 de arraçoamento de 0,6% e 1 % do peso vivo/dia. Cada tratamento teve o mínimo
231 de quatro réplicas, máximo seis (peixes) mantidos em tanques de 100 L de volume
232 útil. Os animais foram pesados ($102 \pm 9,5$ g) e depois mantidos 15 dias em
233 aclimatação. Foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração Supra Anzol de
234 ouro 24 ® registrando-se o consumo diário a partir do qual determinou-se as taxas
235 de restrição alimentar. Após aclimatação, estimou-se o peso médio inicial ($115,5$
236 $\pm 10,4$ g) e distribuiu-se aleatoriamente os peixes nas unidades experimentais dentre
237 os tratamentos. O ensaio teve duração de 15 dias, com acompanhamento diário
238 do consumo e a qualidade de água. Ao final do experimento os peixes foram
239 pesados para depois tomar amostras de sangue para as análises de glicose e
240 hemoglobina e por fim serem eutanasiados com o objetivo de extrair os órgãos
241 alvo que foram utilizados nas análises da atividade do ETS em fígado, rim, músculo
242 e brânquias. Foi observada a redução da glicemia no jejum e similaridade dentre
243 os demais tratamentos. A concentração de hemoglobina não diferiu entre os
244 tratamentos. Para a atividade do ETS só foi possível observar influência dos
245 tratamentos no fígado e rim. Já nos parâmetros zootécnicos avaliados (ganho de
246 peso, consumo alimentar, conversão alimentar e taxa de crescimento específico)

247 foram encontradas em todos diferenças explicadas pelos tratamentos
248 experimentais, pelo qual optou-se pela taxa de crescimento específico (TCE) como
249 variável resposta para a exemplificar a funcionalidade dos índices de ETS no fígado
250 e rim, para a predição da TCE por meio do modelagem matemática dos dados,
251 tendo em conta que o limitado número de dados não consegue formar um modelo
252 de grande robustez. No entanto, o modelo conseguiu valores do R2 ajustado de 78
253 %, sugerindo que a atividade da ETS do fígado e rim apresentaram um potencial
254 para a descrição e predição do crescimento do pacu.

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271 **General Abstract**

272 The purpose of this work is to test the applicability of a tool normally used in the
273 ecology of aquatic environments in bioenergetics within the aquaculture area,
274 through which the activity of the electron transport system (ETS) in target organs of
275 the species *Piaractus mesopotamicus* different food conditions. The study is based
276 on the hypothesis that ETS activity or the combination of ETS activities of different
277 target organs can be evaluated as a cellular biomarker, with the ability to describe
278 or predict zootechnical parameters. The method of evaluation of ETS activity was
279 developed to measure the enzymatic action of ETS by quantifying by colorimetry the
280 oxidation of NADH and NADPH and reduction of 2- (p-iodophenyl) -3- (p-nitrophenyl)
281 -5-phenyl chloride tetrazolium (INT). The experiment was designed to evaluate the
282 effect of different dietary regimes on pacu metabolism under four treatments: fasting,
283 *ad libitum* intake, and two other food restriction with 0.6% and 1% live weight / day
284 dietary intake. Each treatment had a minimum of four replicates, maximum six (fish)
285 kept in tanks of 100 L of useful volume. The animals were weighed (102 ± 9.5 g) and
286 then maintained for 15 days in acclimation. Daily *ad libitum* with Supra Anzol de ouro
287 24 ® were fed daily, recording the daily intake from which the food restriction rates
288 were determined. After acclimatization, the initial mean weight (115.5 ± 10.4 g) was
289 estimated and the fish were randomly distributed in the experimental units among
290 the treatments. The trial lasted 15 days, with daily monitoring of consumption and
291 water quality. At the end of the experiment the fish were weighed and then blood
292 samples were taken for glucose and hemoglobin analyzes and finally euthanized to
293 extract the target organs that were used in the analysis of ETS activity in liver, kidney,
294 muscle and gills. It was observed the reduction of fasting glucose and similarity
295 among the other treatments. Hemoglobin concentration did not differ between
296 treatments. For the ETS activity, it was only possible to observe influence of the
297 treatments in the liver and kidney. In the zootechnical parameters evaluated (weight
298 gain, food consumption, feed conversion and specific growth rate) were found in all
299 differences explained by the experimental treatments, whereby the specific growth
300 rate (SGR) was chosen as the response variable to exemplify the functionality of the
301 ETS indexes in the liver and kidney for the prediction of SGR by means of the

302 mathematical modeling of the data, taking into account that the limited number of
303 data can not form a model of great robustness. However, the model achieved
304 adjusted R^2 values of 78%, suggesting that liver and kidney ETS activity presented
305 a potential for the description and prediction of pacu growth.

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326 **Introdução**

327 A produção aquícola atualmente é uma das indústrias com maior potencial para a
328 alimentação do mundo devido ao fato de ser muito mais eficiente para a utilização
329 da terra comparada com outras atividades pecuárias, além disso os sistemas de
330 produção atuais permitem cultivar organismos aquáticos em uma grande
331 diversidade de zonas, nas quais outras produções não poderiam subsistir e, no caso
332 da aquicultura marinha, sem uma grande demanda de água, mas com a
333 desvantagem de ter uma forte dependência de recursos pesqueiros para a
334 alimentação da maioria das espécies cultivadas (Lucas e Southgate, 2012).

335 No Brasil, uma das espécies de grande potencial para a produção é o pacu
336 (*Piaractus mesopotamicus*), que devido a seus hábitos alimentares onívoros
337 apresenta grandes facilidades para alimentação e cultivo em geral, com uma baixa
338 dependência por alimentos de origem animal como farinha e óleo de peixe, o qual
339 faz dela uma espécie interessante para o cultivo e a pesquisa em áreas como a
340 nutrição (Abimorad et al., 2007; Bechara et al., 2005; Favero et al., 2017).

341 Existe uma grande variedade de ferramentas experimentais para a avaliação do
342 comportamento produtivo e reprodutivo dos animais de produção, a seleção de uma
343 ou outra depende de fatores como a biologia e nicho ecológico que ocupa a espécie
344 a estudar. Dentro da biologia um dos fatores mais importantes é o estudo dos
345 processos metabólicos que levam ao sucesso na criação dos animais em meios
346 controlados (Lucas, 1996).

347 O metabolismo é o conjunto de vias bioquímicas que determinam a transformação
348 de elementos exógenos como o alimento em energia e compostos necessários para
349 a vida do animal. Em produção de animais aquáticos, os fatores que determinam a
350 eficiência na sobrevivência e crescimento ocupam um campo de estudo
351 multidisciplinar que abrange conhecimentos em nutrição, química, engenharia, etc.
352 Com o fim de adaptar os sistemas de cultivo aos requerimentos biológicos da
353 espécie cultivada, são priorizadas variáveis como a qualidade da água, a densidade
354 de estocagem, a qualidade e quantidade de alimento dentre outros. O controle
355 dessas variáveis otimiza a viabilidade operativa e econômica da fazenda, por

356 exemplo na utilização de racionamento de alimento, o impacto econômico por maus
357 manejos ou pouco conhecimento dos requerimentos nutricionais da espécie criada,
358 podem significar redução do retorno econômico da fazenda tendo em conta que o
359 alimento representa a maior parte dos custos de produção na aquicultura(Oliva-
360 Teles, 2012).

361 O alimento é a fonte de energia para os processos metabólicos do animal. A
362 maneira como esses processos acontecem é estudada pela bioenergética, que no
363 caso de animais de criação tenta prever o comportamento produtivo tendo em
364 conta o ingresso de energia e as perdas, a causa da ineficiência natural nos
365 fenômenos de transformação da matéria. A bioenergética desde o ponto de vista
366 dos indivíduos pode ser dividida em bioenergética de organismos e bioenergética
367 celular, a primeira estuda os fenômenos que envolvem o aproveitamento das
368 matérias nutritivas no meio (natural ou produtivo) para crescimento, reprodução e
369 atividades de rotina como o nado, esses estudos se baseiam em análises de
370 balanço de massas, entendendo o indivíduo como um sistema de entradas como:
371 alimento, íons, O₂ e calor, saídas como: fezes, amônia, ureia, CO₂, calor e produtos
372 como: biomassa, reservas energéticas, movimento, gametas e vitelo. Para o caso
373 da bioenergética celular se tem em conta os processos que servem de suporte da
374 bioenergética de organismos como: respiração celular, organização e
375 funcionamento de tecidos e órgãos, função enzimática catabólica e anabólica e
376 atividade de compartimentos e membranas (Tytler e Calow, 1985).

377 Há uma grande quantidade de reações que acontecem tanto num animal quanto
378 numa célula, as quais obtém da oxidação de compostos de carbono a energia
379 suficiente para se manter, utilizando como organela intermediária a mitocôndria
380 (Berg et al., 2002), esta é a encarregada de utilizar a energia armazenada nos
381 enlaces de compostos orgânicos para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), que
382 é a molécula que acompanha a ocorrência de uma grande variedade de processos.
383 Para a síntese de ATP, a mitocôndria precisa se apoiar em dois grandes
384 mecanismos metabólicos: o ciclo de Krebs que acontece na matriz mitocondrial e a
385 fosforilação oxidativa. O primeiro tem como principal função produção de

386 carregadores energéticos (NADH e FADH₂) que tem por destino a fosforilação
387 oxidativa, da qual depende a maior parte da produção de ATP (Berg et al., 2002).

388 **Fosforilação oxidativa**

389 Os carregadores fornecidos pelo ciclo de Krebs, mas também da glicólise e da
390 oxidação de ácidos graxos chegam à membrana interna da mitocôndria, onde
391 transferem um par de elétrons ao oxigênio pela ação de uma variedade de enzimas
392 carregadoras de elétrons num processo energético altamente favorável, onde uma
393 grande quantidade de energia é liberada para a produção de ATP (Berg et al., 2002).

394 Nesse processo de transferência de elétrons acontece um bombeio de prótons fora
395 da matriz mitocondrial, o que cria um potencial de gradiente entre os lados da
396 membrana interna cuja função é acoplar a oxidação e fosforilação da adenosina
397 trifosfato (ADP), sendo a fosforilação oxidativa a parte final de uma série de reações
398 agrupadas dentro do conceito de respiração celular, que começa com a oxidação
399 de fontes de carbono no ciclo de Krebs para a liberação de prótons que serão
400 carregados pelos nucleotídeos NAD⁺ e FAD, os quais criarão na membrana interna
401 uma força móbil de elétrons (EMF) que darão início a uma força móvel de prótons
402 (PMF), que finalmente será convertida num potencial de fosforilação para síntese
403 de ATP. A transformação de EMF para PMF depende de três enzimas condutoras
404 de elétrons, as quais fazem parte do sistema transportador de elétrons (ETS):
405 NADH-oxidoreductase, citocromo c oxidoreductase e a citocromo c oxidase (Cooper,
406 2000).

407 **ETS**

408 O ETS é então um grupo de complexos enzimáticos que tem como função o
409 transporte de elétrons na membrana interna da mitocôndria, de um lugar de maior
410 concentração energética para um lugar de menor concentração. O ETS é composto
411 por quatro complexos carregadores de elétrons e um quinto que tem como função
412 a síntese de ATP. Os elétrons que vem do NADH entram pelo complexo I onde são
413 transferidos à flavina mononucleotídeo e depois a um carregador de ferro-enzofre
414 que leva os elétrons até a Coenzima- Q (ou ubiquinona), a qual transporta os
415 elétrons até o complexo III, onde são transportados desde a citocromo *b* para a

416 citocromo *c*. A citocromo *c* é uma proteína periférica à membrana interna da
417 mitocôndria que tem como função levar os elétrons até o complexo IV (citocromo
418 oxidase) onde passam para ser transferidos ao oxigênio (Cooper, 2000).

419 Para o caso do FADH₂, este difere do NADH pela entrada ao ETS a qual acontece
420 no complexo II onde não existe uma grande liberação de energia, sendo os
421 complexos III e IV os que mais aportam para a síntese de ATP nesta situação
422 (Alberts et al., 2002).

423 A passagem de elétrons de um complexo para outro desenvolve a energia
424 necessária para bombear prótons do interior da mitocôndria até o exterior da
425 membrana interna, com os elétrons se concentrando na parte interna de membrana
426 mitocondrial quando saem pelo complexo IV, este fenômeno cria uma diferença de
427 gradiente dentro e fora da membrana que dá início a formação do PMF, entendida
428 como a força que conduz os prótons através da membrana interna da mitocôndria
429 pelo gradiente eletroquímico obtido no bombeio de prótons durante o transporte de
430 elétrons. O caminho desses prótons de volta à mitocôndria é o evento final e
431 necessário para produção de ATP, onde a ATPsintetase conduz os prótons pela
432 membrana e utiliza sua força motora para a fosforilação final do ADP (Alberts et al.,
433 2002).

434 **Biomarcadores**

435 Um biomarcador é um parâmetro que é objetivamente medido ou avaliado como
436 indicador de processos biológicos normais ou patológicos (glicose em sangue, o
437 IHS, e hemoglobina) ou à resposta de uma intervenção terapêutica (NRC, 1987).
438 Nesse contexto, a finalidade dessa pesquisa é estabelecer a atividade do ETS como
439 uma varável representativa do comportamento zootécnico do peixe Pacu.

440

441 **Biomarcadores para a avaliação do estado metabólico**

442 Existem parâmetros fisiológicos de comprovada sensibilidade à mudanças na
443 capacidade metabólica do animal, os quais podem servir como ferramentas para a
444 criação de padrões fisiológicos que estabeleçam critérios para determinar a a

445 variação fisiológica da condição metabólica de um peixe como promotor direto ou
446 indireto desta. Alguns deles são:

447 **Índice Hepatosomático (IHS)**

448 Tendo em conta que o fígado é o órgão de maior importância para a estocagem de
449 reservas energéticas do peixe é evidente que a relação entre o peso do fígado e o
450 peso vivo do indivíduo pode ser uma referência do estado fisiológico deste, embora
451 de maneira indireta, a facilidade para a estimação do IHS confira uma importância
452 razoável para tal, quando se deseja avaliar características metabólicas de grupos
453 experimentais (Chellappa et al., 1995; Lunger et al., 2006).

454 Porém, já tem sido comprovado que sendo o IHS representativo do estado
455 energético do peixe, sua capacidade preditora do comportamento metabólico do
456 animal é deficiente em comparação com outros índices como o conteúdo de
457 glicogênio ou lipídios no fígado, os quais significam processos mais dispendiosos
458 para sua avaliação (Al-Ghais, 2013; Chellappa et al., 1995).

459 **Hemoglobina**

460 A hemoglobina é uma proteína contida pelos eritrócitos cuja função principal é o
461 carregamento do oxigênio requerido pelas células para função metabólica destas,
462 principalmente em processos de oxidação de nutrientes para a obtenção de energia
463 (Fanelli et al., 1964).

464 Existem reportes de variações na concentração da hemoglobina em função da
465 alimentação préviados indivíduos, onde em alguns casos foi possível evidenciar
466 uma diminuição na concentração de hemoglobina em animais como tartarugas
467 (Fromm, 2014), *Pagrus major* (Sakamoto e Yone, 1978) ou *Hoplitis*
468 *malabaricus* (Sakamoto e Yone, 1978) submetidos a jejum, mas ainda assim, a
469 utilização das concentrações de hemoglobina como indicador metabólico do animal
470 não tem sido muito difundida na pesquisa.

471 **Glicose no sangue**

472 A glicose é uma das principais fontes de energia para um grande número de tecidos
473 em uma grande diversidade de animais. Entretanto, muitos peixes possuem a

474 chamada “intolerância” à glicose, que é representada como uma baixa capacidade
475 das células para a recepção da glicose como substrato de oxidação, sendo
476 frequente encontrar peixes com altas quantidades de glicose circulante no sangue
477 associada com uma baixa expressão de transportadores GLUT-4 ou homólogos, os
478 quais auxiliam no transporte da glicose através da membrana para o interior da
479 célula quando são ativadas por sinalização insulínica.

480 No entanto, em casos de restrição alimentar já foram documentadas diminuições na
481 concentração de glicose sanguínea para peixes herbívoros e onívoros
482 principalmente, o que pode ser indicativo da viabilidade desse índice para a
483 determinação do estado nutricional e metabólico de peixes dependendo de seu
484 hábito alimentar (Moon, 2001), fato que poderia sustentar a utilização da glicose
485 sanguínea como indicador do estado metabólico em peixes.

486 Um dos principais problemas para o uso da glicose neste tipo de análise é a
487 susceptibilidade das concentrações séricas à manifestação de estados de estresse
488 tanto crônicos quanto agudos, o qual poderia incrementar a variabilidade dos dados
489 em função das práticas de estocagem e manuseio prévias à extração do sangue
490 dificultando assim o estabelecimento de padrões para a espécie, tamanho, idade,
491 etc., (Rotllant e Tort, 1997; Silbergeld, 1974; Smith e Hattingh, 1976).

492 **Método para análise da atividade do ETS**

493 As análises enzimáticas podem ter uma grande utilidade para a avaliação de
494 condições fisiológicas correlacionadas com a atividade dessas enzimas. Existem
495 algumas técnicas que tem como finalidade avaliar a capacidade metabólica de uma
496 célula em diferentes condições se baseando na capacidade respiratória que sua
497 mitocôndria apresenta, sendo o método mais tradicional a oxigrafia, que faz
498 medições do consumo de oxigênio através de um pool celular ou mitocondrial,
499 dependendo dos requerimentos da medição (Brand e Nicholls, 2011). No entanto,
500 a metodologia apresenta influência do funcionamento dos instrumentos que podem
501 criar ruídos nos resultados, o que faz com que a sensibilidade dos instrumentos
502 apresente desafios para a caracterização metabólica de tecidos ou células
503 (Gnaiger, 2008).

504 Uma alternativa para este tipo de medição pode ser a medição da atividade da ETS,
505 onde podem ser evitados alguns dos problemas inerentes ao funcionamento dos
506 instrumentos, o que evita alguns dos desafios ambientais que apresentam as
507 medições oxígrafas. A medição do ETS avalia a atividade máxima das enzimas que
508 compõem o respirosoma mitocondrial quando se agrega no meio analítico
509 nucleotídeos reduzidos (NADH e NADPH) e, se troca o oxigênio por um reagente
510 indicador, como é o caso do cloreto de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil
511 tetrazolium (INT), que muda sua cor devido o poder redutivo do meio gerado pela
512 oxidação dos nucleotídeos pelas enzimas do ETS (Gómez et al., 1996; Gopalan et
513 al., 1996; Kenner e Ahmed, 1975; Owens e King, 1975; Packard, 1971).

514 No caso da metodologia do ETS, esta apresenta vantagens inerentes a pouca
515 influência ambiental (Kenner e Ahmed, 1975), e considerável precisão dos
516 resultados, mas também apresenta limitantes consideráveis quando se tenta
517 comparar os dados obtidos com análises oxígrafa, uma vez que a análise da ETS é
518 uma avaliação da capacidade respiratória total das células, e as análises oxígrafa
519 só apresentam uma fração dessa capacidade, o que faz das duas metodologias
520 análises complementares.

521 No entanto, quando o objetivo é a caracterização comparativa do estado ou
522 capacidade metabólica de animais, o protocolo de ETS pode ser de grande utilidade
523 e confiabilidade.

524 **Outros métodos para a avaliação da respiração celular**

525 Um dos alvos mais utilizados na avaliação da respiração celular e função do ETS é
526 a medição da atividade ou expressão da enzima citocromo c oxidase (COX), para o
527 qual já foram desenvolvidos métodos espectrofotométricos que medem a
528 enzimática da COX, onde se observa a taxa de oxidação de um agente redutor o
529 qual muda de cor pela reação, em um meio com uma alta concentração de oxigênio
530 podendo-se assumir que a oxidação do agente redutor se deve à ação da COX
531 (Bermejo-Nogales et al., 2015; Smith e Conrad, 1956). Para a enzimática da COX,
532 a presença desta também pode ser avaliada com métodos para a determinação da
533 expressão gênica que já têm sido testados em experimentos de restrição alimentar

534 e calórica apresentando correlações positivas entre a ingesta de alimento, a
535 expressão, assim como a enzimática da enzima (Bermejo-Nogales et al., 2015).

536 Tendo em conta que a respiração celular compreende os processos de glicólise, o
537 ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, há uma grande quantidade de testes
538 enzimáticos utilizados para a determinação do estado fisiológico e energético dos
539 peixes, devido à interação e dependência dos processos respiratórios na célula, no
540 caso da glicólise destacam-se enzimas como a Hexoquinase (Blin et al., 1999;
541 González-Alvarez et al., 2009), a qual tem a função da fosforilação da glicose no
542 primeiro passo da glicólise, para o caso do ciclo de Krebs também tem a citrato
543 sintase, a isocitrato desidrogenase e a malato desidrogenase que são utilizadas
544 também para avaliar flutuações no processo (Alp et al., 1976; Somero e Childress,
545 1980).

546 A vantagem que poderia ter a metodologia de avaliação da atividade do ETS é sua
547 capacidade de estabelecer o potencial metabólico, o qual poderia auxiliar o cálculo
548 de uma grande variedade de fatores na produção aquícola, como a capacidade de
549 carga dos sistemas de criação.

550 **Crescimento**

551 O crescimento é o aumento da massa dos animais através do tempo, sendo
552 influenciado por uma grande variedade de fatores, como principalmente a nutrição,
553 o ambiente, a atividade hormonal e a genética do animal.

554 Em peixes, o crescimento normalmente é avaliado pelos incrementos em peso e
555 comprimento, e a maneira mais adequada de descrever o crescimento é pela taxa
556 específica de crescimento (TCE), que pode ser definida como a taxa instantânea de
557 crescimento por unidade de peso vezes 100 (Lugert et al., 2016). Além da TCE, o
558 crescimento também pode ser avaliado em função da taxa de incorporação da
559 glicina nas escalas, uma vez que representa o maior constituinte do colágeno que
560 as compõe, com as taxas incorporação da glicina nas escalas se correlacionando
561 positivamente com taxa de crescimento do animal. O IHS tem demonstrado também
562 uma boa capacidade para descrever o crescimento dos peixes antes da maturidade
563 sexual, já que depois desta o tamanho do fígado varia em função da locação das

564 reservas energéticas para a síntese do material reprodutivo, principalmente no caso
565 das fêmeas que investem uma grande parte das reservas energéticas entocadas no
566 fígado para a síntese do vitelo. Outro dos métodos de avaliação do crescimento é a
567 proporção de RNA:DNA já que uma quantidade alta de RNA quando contrastada
568 com a quantidade DNA representa altas taxas de síntese de proteína e, por fim,
569 altas taxas de crescimento (Dutta, 1994).

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da restrição alimentar e jejum sobre a atividade do ETS e crescimento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Objetivos específicos

Descrever o desenvolvimento zootécnico dos pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a diferentes regimes alimentares.

Avaliar a enzimática de cadeia transportadora de elétrons em órgãos alvo para o experimento e do regime alimentar ao qual o peixe foi exposto.

Construir um modelo das mudanças metabólicas dos órgãos, baseado no regime alimentar, estado fisiológico e peso do pacu.

610 **Referências**

- 611 Abimorad, E.G., Jose, D., Urbinati, E.C., 2007. Growth and metabolism of pacu
612 (*Piaractus mesopotamicus Holmberg 1887*) juveniles fed diets containing
613 different protein , lipid and carbohydrate levels 36–44. doi:10.1111/j.1365-
614 2109.2006.01621.x
- 615 Al-Ghais, S.M., 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as
616 potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine Pollution*
617 *Bulletin* 74, 183–186. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2013.07.005
- 618 Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Electron-
619 Transport Chains and Their Proton Pumps.
- 620 Alp, P.R., Newsholme, E.A., Zammit, V.A., 1976. Activities of Citrate Synthase and
621 NAD + -Linked and NADP + -Linked Isocitrate Dehydrogenase in Muscle from
622 Vertebrates and Invertebrates 154, 689–700.
- 623 Bechara, J.A., Pablo, R.J., Ruiz Diaz, F.J., Flores Quintana, C.I., Longoni de Meabe,
624 C.A., 2005. The effect of dietary protein level on pond water quality and feed
625 utilization efficiency of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).
626 *Aquaculture Research* 36, 546–553. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01252.x
- 627 Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Oxidative Phosphorylation.
- 628 Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2015. Unraveling the
629 Molecular Signatures of Oxidative Phosphorylation to Cope with the Nutritionally
630 Changing Metabolic Capabilities of Liver and Muscle Tissues in Farmed Fish.
631 *PLOS ONE* 10, e0122889. doi:10.1371/journal.pone.0122889
- 632 Blin, C., Panserat, S., Médale, F., Gomes, E., Brèque, J., Kaushik, S.,
633 Krishnamoorthy, R., 1999. Teleost liver hexokinase- and glucokinase-like
634 enzymes: partial cDNA cloning and phylogenetic studies in rainbow trout
635 (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead
636 seabream (*Sparus aurata*)+. *Fish Physiology and Biochemistry* 21, 93–102.
637 doi:10.1023/A:1007748204428

638 Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells.
639 Biochemical Journal 435, 297–312. doi:10.1042/BJ20110162

640 Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition
641 factor and hepasomatic index as estimates of energy status in male three-
642 spined stickleback. Journal of Fish Biology 47, 775–787. doi:10.1111/j.1095-
643 8649.1995.tb06002.x

644 Cooper, G.M., 2000. The Mechanism of Oxidative Phosphorylation.

645 Dutta, H., 1994. Growth in Fishes. Gerontology 40, 97–112. doi:10.1159/000213581

646 Fanelli, A.R., Antonini, E., Caputo, A., 1964. Hemoglobin and Myoglobin. Advances
647 in Protein Chemistry 19, 73–222. doi:10.1016/S0065-3233(08)60189-8

648 Favero, G.C., Yukihiro, R., Luz, G., 2017. Fasting and refeeding lead to more
649 efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*) 359–366.
650 doi:10.1111/are.13466

651 Fromm, P.O., 2014. Division of Comparative Physiology and Biochemistry , Society
652 for Integrative and Comparative Biology Heat Production of Frogs 29, 234–240.

653 Gnaiger, E., 2008. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-
654 resolution respirometry to assess mitochondrial function. Mitochondrial
655 dysfunction in drug-induced toxicity. 327, 327–52.
656 doi:10.1002/9780470372531.ch12

657 Gómez, M., Torres, S., Hernández-León, S., 1996. Modification of the electron
658 transport system (ETS) method for routine measurements of respiratory rates
659 of zooplankton. South African Journal of Marine Science 17, 15–20.
660 doi:10.2989/025776196784158446

661 González-Alvarez, R., Ortega-Cuellar, D., Hernández-Mendoza, A., Moreno-Arriola,
662 E., Villaseñor-Mendoza, K., Gálvez-Mariscal, A., Pérez-Cruz, M.E., Morales-
663 Salas, I., Velázquez-Arellano, A., 2009. The hexokinase gene family in the
664 zebrafish: Structure, expression, functional and phylogenetic analysis.
665 Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular

666 Biology 152, 189–195. doi:10.1016/j.cbpb.2008.11.004

667 Gopalan, G., Madon, S.P., Culver, D.A., Pappas, P.W., 1996. Measurement of
668 metabolism in free ranging juvenile fishes using electron transport system (ETS)
669 enzyme assays. International Congress on the Biology of Fishes, San
670 Francisco.

671 Hattingh, J., 1977. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish, *Labeo*
672 *capensis* (Smith). Journal of Fish Biology 10, 191–195. doi:10.1111/j.1095-
673 8649.1977.tb04053.x

674 Kenner, R.A., Ahmed, S.I., 1975. Correlation between Oxygen Utilization and
675 Electron Transport Activity in Marine Phytoplankton 133, 129–133.

676 Lucas, A. (Albert), 1996. Bioenergetics of aquatic animals. Taylor & Francis.

677 Lucas, J.S., Southgate, P.C., 2012. Farming Aquatic Animals and Plants.
678 doi:10.1017/CBO9781107415324.004

679 Lugert, V., Thaller, G., Tetens, J., Schulz, C., Krieter, J., 2016. A review on fish
680 growth calculation: multiple functions in fish production and their specific
681 application. Reviews in Aquaculture 8, 30–42. doi:10.1111/raq.12071

682 Lunger, A.N., Craig, S.R., McLean, E., 2006. Replacement of fish meal in cobia
683 (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein.
684 Aquaculture 257, 393–399. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.010

685 Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: Fact or fiction? Comparative
686 Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 129, 243–
687 249. doi:10.1016/S1096-4959(01)00316-5

688 NRC, 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on
689 Biological Markers of the National Research Council. Environmental health
690 perspectives 74, 3–9.

691 Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. Journal of Fish
692 Diseases 35, 83–108. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x

- 693 Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-
694 system activity in marine zooplankton. *Marine Biology* 30, 27–36.
695 doi:10.1007/BF00393750
- 696 Packard, T.T., 1971. The measurement of respiratory electron transport activity in
697 marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 29, 235–244.
- 698 Rotllant, J., Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net
699 handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *Journal*
700 *of Fish Biology* 51, 21–28. doi:10.1006/jfbi.1997.0405
- 701 Sakamoto, S., Yone, Y., 1978. Effect of Starvation on Hematological Characteristics,
702 and the Contents of Chemical Components and Activities of Enzymes in Blood
703 Serum of Red Sea Bream. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu*
704 *University* 23, 63–69.
- 705 Silbergeld, E.K., 1974. Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress
706 in fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 11, 20–25.
707 doi:10.1007/BF01685023
- 708 Smith, L., Conrad, H., 1956. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c
709 by cytochrome c oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 63, 403–
710 413. doi:10.1016/0003-9861(56)90055-8
- 711 Somero, G.N., Childress, J.J., 1980. A Violation of the Metabolism-Size Scaling
712 Paradigm: Activities of Glycolytic Enzymes in Muscle Increase in Larger-Size
713 Fish. *Physiological Zoology* 53, 322–337. doi:10.1086/physzool.53.3.30155794
- 714 Tytler, P., Calow, P. (Eds.), 1985. *Fish Energetics New Perspectives*, 1 st. ed.
715 doi:10.1007/978-94-011-7918-8
- 716 Abimorad, E.G., Jose, D., Urbinati, E.C., 2007. Growth and metabolism of pacu (
717 *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing
718 different protein , lipid and carbohydrate levels 36–44. doi:10.1111/j.1365-
719 2109.2006.01621.x
- 720 Al-Ghais, S.M., 2013. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index

721 as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine*
722 *Pollution Bulletin* 74, 183–186. doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2013.07.005

723 Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Electron-
724 Transport Chains and Their Proton Pumps.

725 Alp, P.R., Newsholme, E.A., Zammit, V.A., 1976. Activities of Citrate Synthase and
726 NAD + -Linked and NADP + -Linked Isocitrate Dehydrogenase in Muscle from
727 Vertebrates and Invertebrates 154, 689–700.

728 Bechara, J.A., Pablo, R.J., Ruiz Diaz, F.J., Flores Quintana, C.I., Longoni de
729 Meabe, C.A., 2005. The effect of dietary protein level on pond water quality
730 and feed utilization efficiency of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,
731 1887). *Aquaculture Research* 36, 546–553. doi:10.1111/j.1365-
732 2109.2005.01252.x

733 Bendschneider, K., 1952. A new spectrophotometric method for the determination
734 of nitrite in sea water,. [University of Washington Oceanographic
735 Laboratories], [Seattle Wash.].

736 Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Oxidative Phosphorylation.

737 Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*. W H Freeman.

738 Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2015. Unraveling
739 the Molecular Signatures of Oxidative Phosphorylation to Cope with the
740 Nutritionally Changing Metabolic Capabilities of Liver and Muscle Tissues in
741 Farmed Fish. *PLOS ONE* 10, e0122889. doi:10.1371/journal.pone.0122889

742 Black, D., Love, R.M., 1986. Comparative s c The sequential mobilisation and
743 restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and
744 refeeding 469–479.

745 Blin, C., Panserat, S., Médale, F., Gomes, E., Brèque, J., Kaushik, S.,
746 Krishnamoorthy, R., 1999. Teleost liver hexokinase- and glucokinase-like
747 enzymes: partial cDNA cloning and phylogenetic studies in rainbow trout
748 (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead

749 seabream (*Sparus aurata*)+. *Fish Physiology and Biochemistry* 21, 93–102.
750 doi:10.1023/A:1007748204428

751 Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells.
752 *Biochemical Journal* 435, 297–312. doi:10.1042/BJ20110162

753 Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition
754 factor and hepasomatic index as estimates of energy status in male three-
755 spined stickleback. *Journal of Fish Biology* 47, 775–787. doi:10.1111/j.1095-
756 8649.1995.tb06002.x

757 Cooper, G.M., 2000. *The Mechanism of Oxidative Phosphorylation*.

758 Drew, R.E., Rodnick, K.J., Settles, M., Wacyk, J., Churchill, E., Powell, M.S.,
759 Hardy, R.W., Murdoch, G.K., Hill, R.A., Robison, B.D., Re, D., Kj, R., Settles,
760 M., Wacyk, J., Churchill, E., Rw, H., Gk, M., Ra, H., Bd, R., 2018. Effect of
761 starvation on transcriptomes of brain and liver in adult female zebrafish (
762 *Danio rerio*) 3051, 283–295. doi:10.1152/physiolgenomics.90213.2008.

763 Dutta, H., 1994. Growth in Fishes. *Gerontology* 40, 97–112.
764 doi:10.1159/000213581

765 Eaton, A.D., Franson, M.A.H., American Public Health Association., American
766 Water Works Association., Water Environment Federation., 2005. Standard
767 methods for the examination of water & wastewater. American Public
768 Health Association.

769 Fanelli, A.R., Antonini, E., Caputo, A., 1964. Hemoglobin and Myoglobin. *Advances*
770 *in Protein Chemistry* 19, 73–222. doi:10.1016/S0065-3233(08)60189-8

771 Favero, G.C., Yukihiro, R., Luz, G., 2017. Fasting and refeeding lead to more
772 efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*) 359–366.
773 doi:10.1111/are.13466

774 Fromm, P.O., 2014. *Division of Comparative Physiology and Biochemistry , Society*
775 *for Integrative and Comparative Biology Heat Production of Frogs* 29, 234–
776 240.

- 777 Gnaiger, E., 2008. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-
778 resolution respirometry to assess mitochondrial function. Mitochondrial
779 dysfunction in drug-induced toxicity. 327, 327–52.
780 doi:10.1002/9780470372531.ch12
- 781 Gómez, M., Torres, S., Hernández-León, S., 1996. Modification of the electron
782 transport system (ETS) method for routine measurements of respiratory rates
783 of zooplankton. South African Journal of Marine Science 17, 15–20.
784 doi:10.2989/025776196784158446
- 785 González-Alvarez, R., Ortega-Cuellar, D., Hernández-Mendoza, A., Moreno-
786 Arriola, E., Villaseñor-Mendoza, K., Gálvez-Mariscal, A., Pérez-Cruz, M.E.,
787 Morales-Salas, I., Velázquez-Arellano, A., 2009. The hexokinase gene family
788 in the zebrafish: Structure, expression, functional and phylogenetic analysis.
789 Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular
790 Biology 152, 189–195. doi:10.1016/j.cbpb.2008.11.004
- 791 Gopalan, G., Madon, S.P., Culver, D.A., Pappas, P.W., 1996. Measurement of
792 metabolism in free ranging juvenile fishes using electron transport system
793 (ETS) enzyme assays. International Congress on the Biology of Fishes, San
794 Francisco.
- 795 Kenner, R.A., Ahmed, S.I., 1975. Correlation between Oxygen Utilization and
796 Electron Transport Activity in Marine Phytoplankton 133, 129–133.
- 797 Kiessling, K.-H., Kiessling, A., 1993. Selective utilization of fatty acids in rainbow
798 trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. Canadian
799 Journal of Zoology 71, 248–251. doi:10.1139/z93-035
- 800 Knox, D., Walton, M.J., Cowey, C.B., 1980. Distribution of enzymes of glycolysis
801 and gluconeogenesis in fish tissues. Marine Biology 56, 7–10.
802 doi:10.1007/BF00390588
- 803 Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefe,
804 F., Vachot, C., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary
805 energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

806 1154–1164. doi:10.1152/ajpregu.00766.2007.

807 Lucas, A. (Albert), 1996. Bioenergetics of aquatic animals. Taylor & Francis.

808 Lucas, J.S., Southgate, P.C., 2012. Farming Aquatic Animals and Plants.
809 doi:10.1017/CBO9781107415324.004

810 Lugert, V., Thaller, G., Tetens, J., Schulz, C., Krieter, J., 2016. A review on fish
811 growth calculation: multiple functions in fish production and their specific
812 application. Reviews in Aquaculture 8, 30–42. doi:10.1111/raq.12071

813 Lunger, A.N., Craig, S.R., McLean, E., 2006. Replacement of fish meal in cobia
814 (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein.
815 Aquaculture 257, 393–399. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.010

816 Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: Fact or fiction? Comparative
817 Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 129,
818 243–249. doi:10.1016/S1096-4959(01)00316-5

819 NRC, 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on
820 Biological Markers of the National Research Council. Environmental health
821 perspectives 74, 3–9.

822 Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. Journal of Fish
823 Diseases 35, 83–108. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x

824 Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-
825 system activity in marine zooplankton. Marine Biology 30, 27–36.
826 doi:10.1007/BF00393750

827 Packard, T.T., 1971. The measurement of respiratory electron transport activity in
828 marine phytoplankton. Journal of Marine Research 29, 235–244.

829 Pavek, T., 2015. Fish and amphibian euthanasia. Institutional Animal Care and
830 Use Committee 222, 1–4.

831 Rosenfeld, J., Van Leeuwen, T., Richards, J., Allen, D., 2015. Relationship
832 between growth and standard metabolic rate: Measurement artefacts and

833 implications for habitat use and life-history adaptation in salmonids. Journal of
834 Animal Ecology 84, 4–20. doi:10.1111/1365-2656.12260

835 Rotllant, J., Tort, L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net
836 handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress.
837 Journal of Fish Biology 51, 21–28. doi:10.1006/jfbi.1997.0405

838 Sakamoto, S., Yone, Y., 1978. Effect of Starvation on Hematological
839 Characteristics, and the Contents of Chemical Components and Activities of
840 Enzymes in Blood Serum of Red Sea Bream. Journal of the Faculty of
841 Agriculture, Kyushu University 23, 63–69.

842 Silbergeld, E.K., 1974. Blood glucose: A sensitive indicator of environmental stress
843 in fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 11, 20–25.
844 doi:10.1007/BF01685023

845 Smith, L., Conrad, H., 1956. A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c
846 by cytochrome c oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics 63, 403–
847 413. doi:10.1016/0003-9861(56)90055-8

848 Smith, L., Hattingh, J., 1976. *Labeo capensis* 191–195.

849 Somero, G.N., Childress, J.J., 1980. A Violation of the Metabolism-Size Scaling
850 Paradigm: Activities of Glycolytic Enzymes in Muscle Increase in Larger-Size
851 Fish. Physiological Zoology 53, 322–337.
852 doi:10.1086/physzool.53.3.30155794

853 Tytler, P., Calow, P. (Eds.), 1985. Fish Energetics New Perspectives, 1 st. ed.
854 doi:10.1007/978-94-011-7918-8

855 UNESCO, 1983. CHEMICAL METHODS FOR USE IN MARINE
856 ENVIRONMENTAL MONITORING.

857 Wright, P. a, Fhyn, J.H., 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion,
858 Fish Physiology. Vol. 20.

859 Zammit, B.V.A., Newsholme, E.A., 1979. Activities of Enzymes of Fat and Ketone-

860 Body Metabolism and Effects of Starvation on Blood Concentrations of
861 Glucose and Fat Fuels in Teleost and Elasmobranch Fish 184, 313–322.

862

863

864

865

866

Capitulo I

867

868

869

870

871

872

873

874

875

876 Avaliação do efeito da restrição alimentar e jejum sobre a atividade do ETS e
877 crescimento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

878

879

880

881

882

883

884

885

886

887

888 Artigo para ser submetido na revista "Comparative Biochemistry and Physiology B"

889

890

Avaliação do efeito da restrição alimentar e jejum sobre a atividade do ETS e crescimento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

891

892

893

Juan Rafael Buitrago Ramírez ¹, Andrea Idelette Hernandez ¹, Luciano García ², Virgínia

894

Fonseca Pedrosa ¹, José María Monserrat ³, Luis Alberto Romano ¹

895

1 Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brasil

896

897

2 Laboratório de Aquicultura Continental, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brasil

898

899

3 Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Rio Grande – (FURG), Rio Grande, Brasil

900

901

902

Resumo

903

As análises da atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) tem sido uma

904

ferramenta útil para avaliar a situação metabólica das populações naturais

905

planctônicas (Owens e King, 1975; Packard, 1971). Nesse trabalho foi testada a

906

utilidade do método na avaliação do metabolismo em órgãos alvo da espécie pacu

907

(*Piaractus mesopotamicus*) para determinar se atividade do ETS pode se ver

908

refletida nos parâmetros zootécnicos mais importantes como a taxa de crescimento

909

específico (TCE). Para tal, foram utilizados 21 animais de 115,5 ±10,4 g de peso em

910

quatro regimes alimentares: jejum; 0,6% do peso vivo (PV); 1,0% do PV e *ad libitum*.

911

Foi avaliado o ganho de peso, conversão alimentar (CA) e TCE. Avaliaram-se

912

também alguns índices fisiológicos: glicemia e hemoglobina. Após 15 dias de

913

experimento, para cada peixe foi coletado: fígado, brânquia, intestino, rim para fazer

914

análises do sistema transportador de elétrons. Foram encontradas diferenças

915

significativas no peso final, ganho de peso, CA e TCE como se esperava, e foi

916

estabelecida uma correlação entre esta última e a atividade da ETS no fígado e no

917

rim, onde foi possível concluir que os parâmetros zootécnicos podem se ver

918

refletidos na atividades de ETS do fígado e do rim, as quais podem ser utilizadas

919

como biomarcadores e possíveis preditores do comportamento produtivo do pacu.

920

Abstract

921 Electron transporter system (ETS) activity has been a useful tool for assessing the
922 metabolic status of natural planktonic populations (Owens and King, 1975; Packard,
923 1971). In this work the usefulness of the method for the evaluation of the metabolism
924 in target organs of the specie *Piaractus mesopotamicus* (pacu) was tested to
925 determine if ETS activity can be reflected in the most important zootechnical
926 parameters such as the specific growth rate (SGR) for the 21 animals of $115.5 \pm$
927 10.4 g of weight in four feeding regimes: fasting; 0.6% of live weight (LW); 1.0% of
928 PV and *ad libitum*. It was evaluated the weight gain, feed conversion (FC), SGR.
929 Some physiological indices were also evaluated: glycemia, hemoglobin. After 15
930 days of experiment for each fish was collected: liver, gill, intestine, kidney to make
931 analyzes of the electron transport system. Significant differences were found in the
932 final weight, weight gain, FC and SGR as expected and a correlation was established
933 between the latter and the ETS activity in liver and kidney, and it is possible to
934 conclude that the zootechnical parameters can be reflected in the liver and kidney
935 ETS activities which can be used as biomarkers and possible predictors of pacu's
936 productive behavior.

937

Introdução

938 Uma das funções da pesquisa é detectar padrões em cada uma das áreas do
939 conhecimento com a finalidade de prever comportamentos a partir de índices ou
940 marcadores que demonstrem relação estatisticamente significativa com o fator de
941 interesse. No caso do metabolismo de animais de produção, que abarca uma
942 grande quantidade de fenômenos fisiológicos e bioquímicos inter-relacionados, há
943 um enorme campo de estudo sobre biomarcadores que representem a maneira
944 como ocorrem processos como o crescimento e reprodução.

945 Comumente, uma das ferramentas utilizadas para a caracterização do estado
946 metabólico em peixes é a aplicação de provas de calorimetria indireta a qual utiliza
947 a taxa respiratória do peixe como um indicador positivo de sua capacidade
948 metabólica, que pode ser interpretada em muitos casos como potencial de
949 crescimento (Rosenfeld et al., 2015). Os equipamentos utilizados para avaliar a

950 taxa metabólica por respirometria são muito variados e, em muitos casos, os
951 resultados que eles fornecem são difíceis de comparar com diferentes estudos,
952 quando não é claro o tipo de metabolismo avaliado, nem o estado de estresse do
953 animal pela manipulação prévia, demonstrando que as análises respirométricas
954 enfrentam diferentes problemas por erros gerados na dificuldade de controlar as
955 variáveis extrínsecas e intrínsecas ao indivíduo experimental (Brand and Nicholls,
956 2011).

957 O metabolismo respiratório compreendido como taxa de consumo de oxigênio pode
958 ser subdividido em diferentes taxas que representam as variações no consumo de
959 oxigênio em função as atividades próprias da fisiologia e história de vida do animal.
960 A primeira taxa de consumo de oxigênio dentro do pacote do metabolismo
961 respiratório é a taxa metabólica basal (R_S), a qual é entendida como o consumo de
962 oxigênio pelo animal em estado de repouso, ocorrendo posteriormente o consumo
963 gerado pelas atividades rotineiras do peixe (R_R), a este se agrega o consumo de
964 oxigênio gerado pelo processo de ingestão do alimento (R_F) e por último está o
965 consumo gerado pela atividade física do indivíduo, geralmente o nado (Tytler e
966 Calow, 1985). No entanto, todas as taxas respiratórias são sustentadas pela
967 capacidade da atividade do sistema de transporte de elétrons (ETS), a qual pode
968 ser entendida como o potencial respiratório do animal (Gopalan et al., 1996).

969 O protocolo desenvolvido por Packard (1971) para a avaliação da atividade do ETS,
970 têm sido utilizado a princípio como biomarcador do metabolismo de populações
971 planctônicas marinhas e, posteriormente foi adaptado para animais de maior
972 complexidade como peixes (Gopalan et al., 1996). Em humanos, algumas análises
973 do ETS ou análises análogas têm sido utilizadas como biomarcadores para a
974 determinação do estado fisiológico e deficiências metabólicas, já que de sua
975 produção de ATP dependem uma grande variedade de processos para
976 homeostase, crescimento e reprodução na célula, sendo assim, a avaliação *in vivo*
977 ou *in vitro* pode ter um grande potencial para a determinação de fatores
978 predominantes dentro da fisiologia do indivíduo ou a capacidade produtiva do animal
979 (Brand e Nicholls, 2011; Kiessling e Kiessling, 1993).

980 Esse trabalho tem como finalidade avaliar o efeito da restrição alimentar e jejum
981 sobre o metabolismo e crescimento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando
982 como ferramenta a análise enzimática do ETS em órgãos alvo para, por fim, avaliar
983 por modelagem matemática a capacidade que tem a análise da atividade do ETS
984 como preditor e descritor do crescimento ou TCE.

985 **Material e Métodos**

986 **Delineamento experimental**

987 O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura Continental da
988 Universidade Federal do Rio Grande, onde foram utilizados indivíduos juvenis de
989 $102 \pm 9,5$ g de peso da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus*), os quais foram
990 estocados em 27 tanques de 100 L (um peixe por tanque), durante 15 dias de
991 aclimatação. Durante esse período foi medido o consumo de alimento (Supra Anzol
992 de ouro 24 ®) que era oferecido duas vezes por dia, para cada peixe, com o objetivo
993 de determinar a taxa máxima de alimentação para o tamanho utilizado.

994 Após 15 dias de aclimatação foram eutanasiados 5 peixes em imersão em
995 benzocaína a 400 mg/L (Pavek, 2015) para coleta e armazenamento de amostras
996 das brânquias, fígado, músculo e rim, em ultrafreezer a -86°C , das quais foram feitas
997 análises bioquímicas para estabelecer as condições dos animais prévias ao
998 experimento.

999 Para os demais peixes foi feita uma biometria, para estabelecer o peso inicial (115.5
1000 ± 10.4 g) deles para o experimento, onde se determinaram 4 regimes de alimentação
1001 como tratamentos experimentais (jejum, 0,6%, 1% do peso vivo e *ad libitum*),
1002 alimentados com ração balanceada comercializado para a espécie (Tabela 1),
1003 utilizando não menos de 4 animais por tratamento. O tempo experimental foi de 12
1004 dias, onde diariamente foram avaliados parâmetros de qualidade de água: oxigênio
1005 e temperatura com o oxímetro Yellow Springs Instruments YSI DO200A ,
1006 alcalinidade com a metodologia de Eaton et al., (2005), pH com pHmetro, Hanna
1007 Instruments HI 8424, amônia (UNESCO, 1983) e nitrito (Bendschneider, 1952),
1008 consumo alimentar medindo as diferenças diárias de peso dos recipientes utilizados
1009 para manter o alimento de cada tanque para o cálculo da conversão alimentar (CA)

1010 e foram realizadas trocas de água de 30% diárias para cada tanque. A qualidade da
 1011 água foi mantida em $7,6 \pm 0,26$ mg O₂/L, temperatura de $27,3 \pm 2,1$ °C, alcalinidade
 1012 de $158,9 \pm 4,2$ mg de CaCO₃/ L, concentração de amônia de $0,07 \pm 0,02$ mg/L e de
 1013 nitrito de $0,03 \pm 0,01$ mg/L. Após o período experimental, os animais foram
 1014 eutanasiados com benzocaína na dose já descrita, antes de serem pesados (tanto
 1015 o peixe inteiro quanto o peixe eviscerado) e foram amostrados os mesmos órgãos
 1016 coletados no tempo pós-aclimatação, os quais foram armazenados em Ultrafreezer
 1017 a uma temperatura de -86 °C. Foram também coletadas amostras de sangue
 1018 prévias à eutanásia para avaliar glicose na hora da coleta, com auxílio do glicômetro
 1019 Accu-Chek Advantage, Roche Diagnosis ®, juntamente com análise de
 1020 hemoglobina (Hb) pelo kit Doles ® e extraído o plasma sanguíneo por
 1021 centrifugação a 2500 RPM..

1022

Tabela 1: Composição proximal do alimento fornecido

Nutrientes	Conteúdo (g/kg)	Porcentagem
Umidade (máx)	120	(12%)
Proteína Bruta (mín)	240	(24%)
Extrato Etéreo (mín)	30	(3%)
Energia Digestível	2.700 kcal/kg	
Matéria Fibrosa (máx)	100	(10%)
Matéria Mineral (máx)	180	(18%)
Cálcio (mín)	20	(2%)
Cálcio (máx)	25	(2.5%)
Fósforo (mín)	10	(1%)

1023

Valores fornecidos pelo produtor da ração

1024 **Análises de ETS**

1025 As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido sobre um cadinho até ficarem
 1026 mais fina possível, para maior uniformidade da amostra do tamanho total do órgão.

1027 Para cada órgão se tomaram 100 mg de tecido, exceto para os rins, dos quais foram
 1028 tomados 50 mg para maximizar a eficiência na utilização das amostras.

1029 As amostras foram homogeneizadas no buffer de homogeneização (0,09M Na/K,
1030 polivinilo de pirrolidona (0,45 mg/ml, MgSO₄ 22,5 µM e Triton X-100 0,16% e pH 8,5
1031 ajustado com Tris-Base) utilizando um mixer eletrônico com lâmina tripla Kenwood
1032 HB716 de 400W durante ~10 s, dependendo do tipo de amostra, depois cada uma
1033 delas foi centrifugada a 2500g por 10 min a 4°C e a fração aquosa intermediária do
1034 meio foi recuperada. Da fração recuperada dosou-se a concentração de proteína
1035 para estabelecer a quantidade de alíquota necessária para obter uma solução de
1036 0,5 mg prot./ml.

1037 Em microplaca de 96 poças foi disposta uma quantidade de 183,3 µL de Buffer de
1038 reação (Buffer fosfato 0,1M, MgSO₄ 16,5 µM, PVP 0,275 mg/ml, pH 8,5 ajustado
1039 com Tris-Base), 55,6 µL de INT (3 mg/ml) e 12,5 µL de solução NADH/NADPH (30
1040 mM e 2,2 mM em buffer Tris- Base 0,01%). A reação é iniciada adicionando 12,5 µL
1041 da solução da proteína ajustada a 0,5 mg de Prot. /ml e a microplaca foi disposta no
1042 espectrofluorômetro (Victor 2, Perkin Elmer) a 490 nm durante 10 min para obter
1043 uma curva de reação de 9 pontos.

1044 **Estatísticas**

1045 As análises estatísticas foram realizadas com o software Statgraphics XVI.I, foram
1046 feitas análises de ANOVA quando os pressupostos de normalidade e
1047 homocedasticidade eram atingidos pelos dados para aplicar análises de anova para
1048 avaliar diferenças entre as variáveis testadas tomando como fonte de variação a
1049 taxa de alimentação. Foram feitas também análises multivariadas de correlações
1050 de Sperman e de componentes principais para explorar as relações estatísticas
1051 entre variáveis que puderam contribuir à construção de um modelo baseado nas
1052 atividades do ETS como preditor da TCE.

1053 **Resultados**

1054 **Crescimento dos animais**

1055 Foram evidenciadas diferenças significativas no crescimento dos animais em
1056 função do regime alimentar, onde o peso médio dos peixes no tratamento *ad libitum*
1057 foi maior aos tratamentos de jejum e 0,6% do peso vivo (PV), sendo o tratamento
1058 de 1% PV igual a todos os tratamentos. Foi realizada uma análise de regressão

1059 linear para o ganho de peso e foi encontrada uma correlação de Sperman positiva
 1060 de 0,95 com um R² de 90,7% (p<0,05), em função da taxa de alimentação, havendo
 1061 diferenças significativas em todos os tratamentos exceto 1% PV e *ad libitum* que
 1062 foram iguais e maiores que o tratamento de jejum e 0,6% PV onde jejum, como era
 1063 de esperar, teve perda de peso como se apresenta na Tabela 2.

1064

1065 Tabela 2: Parâmetros zootécnicos e sanguíneos avaliados.

Tratamento	Jejum	0,6%	1%	<i>Ad libitum</i>	R de Sperman*
Peso Inicial	116,8 ±4,3 _a	114,8 ±4,7 _a	113,9 ±5,2 _a	121,6 ±4,7 _a	
Peso Final	110,9 ±4,8 _b	118,5 ±5,3 _b	124,7 ±5,9 _{ab}	138,8 ±5,3 _a	0,73
Ganho de Peso	-5,9 ±2,1 _c	3,37 ±1,4 _b	10,8 ±2,8 _{ab}	14,6±10,1 _a	0,95
Proporção Ganho	-0,05 ±0,015 _c	0,03±0,01 _b	0,095 ±0,024 _a	0,12±0,0164 _a	0,95
CA	NA	2,5 ±0,18 _b	1,6 ±0,18 _a	1,9 ±0,16 _a	0,57
TCE	-0,43 ±0,14 _c	0,24 ±0,10 _b	0,63 ±0,19 _a	0,75 ±0,37 _a	0,93
Proporção Carcaça	0,82 ±0,008 _a	0,82 ±0,008 _a	0,81 ±0,010 _a	0,83 ±0,008 _a	NA
Glicose (mg/dL)	40 ±3 _b	64 ±3 _a	60 ±4 _a	65 ±3 _a	0,55
IHS	0,041 ±0,007 _b	0,083 ±0,007 _a	0,095 ±0,009 _a	0,094 ±0,007 _a	0,53
Hb (g /dL)	7,61 ±0,345 _a	7,22 ±0,378 _a	7,84 ±0,422 _a	7,93 ±0,378 _a	NA

1066 Tabela de médias com desvios padrão para cada variável; os subíndices do lado de cada desvio
 1067 padrão indicam as diferenças entre os tratamentos através de letras distintas.

1068 *Só foram mostrados os valores de correlação com um p< 0,05.

1069

1070 No caso da conversão alimentar não foram evidenciadas diferenças entre os
 1071 tratamentos de 1% PV e *ad libitum*, com uma maior utilização do alimento quando
 1072 comparadas com o tratamento do 0,6% PV.

1073 O índice hepatossomático (IHS) apresentou correlação (R) significativa, com um
 1074 grande número de variáveis avaliadas no experimento, entre as quais ressaltam o
 1075 ganho de peso (R = 0,59), TCE (R = 0,64), taxa alimentar (R = 0,65), CA (R = 0,59)
 1076 e glicose no sangue (R = 0,59).

1077 Fazendo uma avaliação do IHS dos peixes coletados ao início do experimento e os
 1078 peixes de diferentes tamanhos estocados em condições padrão, quando avaliada
 1079 em função de peso dos animais e nível de glicose, não foi possível encontrar uma
 1080 correlação estatisticamente significativa, acontecendo o mesmo nos animais
 1081 experimentais apenas em função do peso, mas não para o caso de glicose, que
 1082 apresentou uma correlação positiva como já foi. Na análise multivariada de
 1083 componentes principais, comprovou-se que a TCE, taxa alimentar, CA e glicemia,
 1084 fazem parte do mesmo componente de variação do IHS, o que pode explicar as
 1085 correlações estatísticas encontradas nas regressões.

1086 **Parâmetros Sanguíneos**

1087 Para glicose sanguínea houveram diferenças significativas entre os tratamentos que
 1088 foram alimentados, quando comparados com o tratamento de jejum, também teve
 1089 uma relação linear entre as variáveis de taxa de alimentação estabelecida em uma
 1090 análise de regressão com uma correlação de Person de 0,55 e um R² de 30%
 1091 (p<0,05).

1092 Para hemoglobina não foram encontradas diferenças significativas e, não foi
 1093 detectada correlação com as outras variáveis avaliadas neste experimento.

1094 **Análises de ETS**

1095 Para as análises estatísticas dos dados de atividade da ETS em cada órgão foi feita
 1096 uma prova multivariada de correlações de Sperman para detectar a possibilidade
 1097 de utilizar a atividade da ETS como preditora de variáveis, como a TCE e estado
 1098 nutricional do peixe, como se apresenta na Tabela 3.

1099
 1100
 1101
 1102
 1103
 1104
 1105

Tabela 3: Análise multivariada de correlações de Sperman entre as atividades do ETS e as variáveis avaliadas.

Fator	ETS Fígado	ETS Musculo	ETS Brânquia	ETS Rim
Peso Final	0,5542 *	0,4376 *	-0,0164	-0,3835

Ganho de Peso	0,7579 *	0,2412	0,0779	-0,6150 *
TCE	0,7503 *	0,2038	0,0841	-0,5940 *
Taxa de Alimentação	0,6726 *	0,2173	0,1449	-0,6061 *
CA	0,7374 *	0,0823	0,2431	-0,2673
Glicose	0,3986	0,1209	0,0316	-0,2144
IHS	0,4634	-0,0051	0,0491	-0,3143
Hb	0,3249	0,0340	-0,2345	-0,2507
Peso Carcaça	0,4791 *	0,2729	0,0051	-0,3740
ETS Fígado		0,3251	0,4489	-0,4324
ETS Musculo	0,3251		-0,0141	-0,3368
ETS Brânquia	0,4489	-0,0141		-0,3098
ETS Rim	-0,4324	-0,3368	-0,3098	

1106 Análises de correlações de Sperman com as principais variáveis experimentais e as
 1107 atividades da ETS. Os valores com * embaixo apresentam $p < 0,05$.
 1108
 1109

1110 Tabela 4 Correlações de Sperman para TCE.

Variáveis	R
Ganho de Peso	0,9839
Taxa de Alimentação	0,9387
Glicose	0,4564
IHS	0,6465

1111 Correlações de Sperman com $p < 0,05$
 1112

1113 Baseando-se nas análises de correlações, buscou-se estabelecer um modelo
 1114 matemático preditor da TCE, onde a atividade da ETS do fígado e do rim apresentou
 1115 o maior poder preditivo pelo modelo de regressão múltipla, como é apresentado a
 1116 seguir.

1117
$$TCE = 0,132491 + 0,031903 * ETS \text{ Fígado} - 0,0133372 * ETS \text{ Rim}$$

1118 Tabela 5: Parâmetros do modelo matemático para a predição da TCE

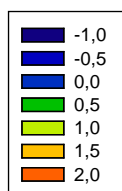
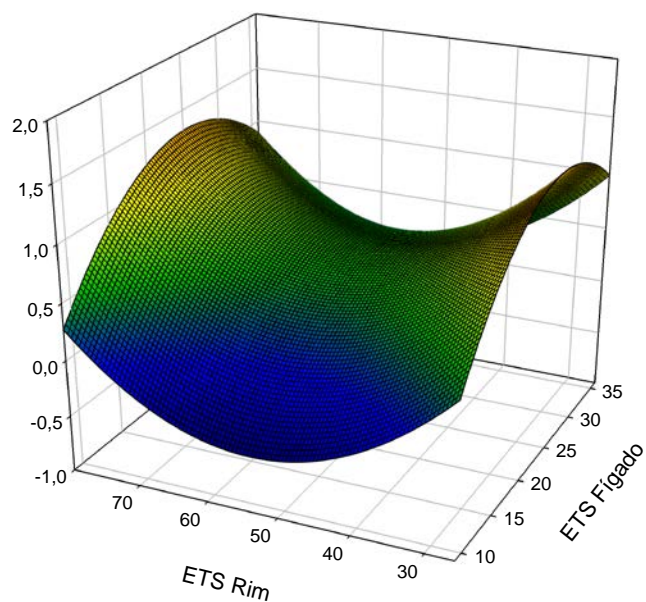
Componente Modelo	Soma de Quadrados	GI	Quadrado Médio	Razao-F	Valor-P
ETS Fígado	2,5159	1	2,5159	27,00	0,0003

ETS Rim	0,0891152	1	0,0891152	0,96	0,3491
ETS Fígado 2	1,6157	1	1,6157	17,34	0,0016
ETS Rim 2	0,886598	1	0,886598	9,51	0,0104
Modelo	5,10732	4			

1119
1120
1121

Figura 1: Gráfico do modelo

TCE



1122
1123
1124
1125

1126

1127

1128

1129

Modelo preliminar da TCE explicada por ETS rim e ETS Fígado.
Os dados estão em $\text{mg O}_2 \cdot \text{g Proteína}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ para o caso das atividades da ETS

1130
1131

Tabela 6: Análise de Variância do modelo matemático da TCE

Fonte	Soma de Quadrados	GI	Quadrado Medio	Razão-F	Valor-P
Modelo	5,10732	4	1,27683	13,70	0,0003
Resíduo	1,02502	1	0,0931838		
Total	6,13234	1			
(Corr.)		5			

1132
1133
1134

Utilizando as variáveis da atividade do ETS do fígado e rim junto com seus componentes quadráticos se obteve uma significância estatística do modelo para a predição da TCE

1135

1136 Tabela 7: Estatísticas de ajuste do modelo

Parâmetros de ajustes	Valor
R-quadrada	83,2%
R-quadrada (ajustada g.l.)	77,2068 %
Erro Padrão do estimado	0,30526
Erro absoluto médio	0,207818
Estatístico Durbin-Watson	2,31885 (P=0,6594)
Autocorrelação de resíduos em atraso 1	-0,169197

1137
1138

Estatísticos de ajuste do modelo matemático para a predição da TCE utilizando como variáveis preditoras a atividade do ETS do fígado e rim.

1139 **Discussão**

1140 Houve um número considerável de variáveis que tiveram correlação estatística com
1141 os regimes alimentares oferecidos. Como era de esperar, o ganho de peso e a
1142 proporção de ganho de peso tiveram as correlações mais altas em função da taxa
1143 de alimentação, tendo em conta que a taxa de 1% do PV e a alimentação *ad libitum*
1144 foram as médias mais altas sem apresentar diferenças significativas entre elas, o
1145 que é um indicativo de que a alimentação até a saciedade não é necessariamente
1146 a estratégia mais rentável nem eficiente na produção, sendo possível para o pacu,
1147 a exploração de outras estratégias como a realimentação depois de determinados
1148 tempos de jejum, com a obtenção de crescimento equiparáveis aos de animais com
1149 alimentação constante (Favero et al., 2017).

1150 Foi possível observar o efeito dos regimes na glicose sanguínea e no IHS,
1151 demonstrando que essas variáveis podem atuar como índices do estado fisiológico
1152 do peixe, resultado sustentado por outros autores em uma grande diversidade de
1153 peixes com diferentes hábitos alimentares, incluindo o pacu (Abimorad et al., 2007;
1154 Black e Love, 1986; Favero et al., 2017; Zammit e Newsholme, 1979).

1155 Para o caso da CA é possível notar que as diferenças apresentadas dependeram
1156 da prioridade de utilizar o alimento ofertado para a manutenção das funções
1157 fisiológicas vitais, antes que o crescimento pelo qual foi ofertado aos animais 0,6%
1158 de PV tiveram uma quantidade limitada de nutrientes excedentes para crescimento,
1159 observando-se comprometida a CA.

1160 A variável resposta mais importante considerada neste experimento foi a TCE e a
1161 importância das outras variáveis foi medida pela capacidade destas para descrever
1162 as variações da TCE entre indivíduos experimentais; a taxa de alimentação teve
1163 uma das correlações mais altas juntamente com o ganho de peso e a proporção de
1164 ganho; IHS e glicose apresentaram correlações mais discretas para caracterizar as
1165 mudanças na TCE como observado na Tabela 4, mas é importante ressaltar que
1166 estatisticamente a ETS do fígado (Tabela 3) demonstrou que pode ser mais
1167 informativa que o IHS para explicar a variabilidade da TCE. No entanto, o fato da
1168 atividade do ETS do rim ter demonstrado uma correlação menor do que IHS para
1169 explicar TCE, ETS do rim foi mais representativa que a concentração de glicose no
1170 sangue para descrever a TCE, pelo qual ETS do rim pode ser utilizado como
1171 biomarcador metabólico e de crescimento.

1172 A atividade da ETS do fígado pode ser evidenciada) em alguns trabalhos prévios
1173 quando se estuda a influência da alimentação na enzimática do fígado. Drew et al.,
1174 (2018) encontraram uma diminuição na expressão da Hexoquinase IV (hex4) em
1175 zebrafish (*Danio rerio*) em jejum, o qual se assemelha com os resultados desse
1176 experimento quando se entende a diminuição na atividade da ETS como uma
1177 depressão da capacidade oxidativa do sistema respiratório celular. Em truta
1178 (*Oncorhynchus mykiss*), Kolditz et al., (2008) relataram que o incremento em dietas
1179 de alto conteúdo calórico tem um efeito positivo na atividade das enzimas

1180 Hexoquinase I e Piruvato quinase, por meio do qual é possível deduzir que existe
1181 um efeito da quantidade e qualidade do alimento na atividade respiratória celular
1182 dos peixes.

1183 No caso da atividade da ETS no rim, observou-se que, por unidade de proteína, o
1184 rim é o órgão mais ativo, tanto em peixes restritos quanto não restritos, quando
1185 comparada com a atividade no fígado, apresentando um resultado estatisticamente
1186 significativo ($p < 0,05$) e, que sua atividade se incrementa em peixes com algum grau
1187 de restrição ou em jejum, o que poderia significar uma resposta adaptativa para a
1188 compensação do baixo estado energético do peixe, sendo importante se ter em
1189 conta que o rim tem atividade gliconeogênica em um grande número de peixes
1190 (Knox et al., 1980), possuindo também uma função importante para a excreção de
1191 compostos nitrogenados como proteínas, que são oxidadas ativamente pelos
1192 peixes depois de largos períodos de jejum (Wright e Fhyn, 2001).

1193 O modelo matemático apresentado nos resultados é uma amostra de possíveis
1194 aplicações que poderia ter a análise da ETS em tecidos, como preditor de variáveis
1195 zootécnicas, com a finalidade de tornar mais eficiente a obtenção de resultados,
1196 tanto na pesquisa quanto na área produtiva, apresentando as atividades da ETS de
1197 rim e fígado como possíveis preditores da TCE. No entanto, devido à pouca
1198 quantidade de dados utilizados para a formulação deste, não é possível conseguir
1199 uma robustez estatística para a construção de um modelo representativo da
1200 espécie.

1201 **Conclusão**

1202 Foi possível achar uma correlação entre a variabilidade na atividade do ETS do
1203 fígado e o rim e a variabilidade da TCE, o qual pode ser evidência de que a
1204 metodologia apresentada pode ser utilizada como possível biomarcador da
1205 condição metabólica e consequente resposta zootécnica do peixe pacu.

1206 **Referências**

1207 Abimorad, E.G., Jose, D., Urbinati, E.C., 2007. Growth and metabolism of pacu
1208 (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing

1209 different protein , lipid and carbohydrate levels 36–44. doi:10.1111/j.1365-
1210 2109.2006.01621.x

1211 Bendschneider, K., 1952. A new spectrophotometric method for the determination
1212 of nitrite in sea water,. [University of Washington Oceanographic Laboratories],
1213 [Seattle Wash.].

1214 Black, D., Love, R.M., 1986. Comparative s c The sequential mobilisation and
1215 restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and
1216 refeeding 469–479.

1217 Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells.
1218 Biochemical Journal 435, 297–312. doi:10.1042/BJ20110162

1219 Drew, R.E., Rodnick, K.J., Settles, M., Wacyk, J., Churchill, E., Powell, M.S., Hardy,
1220 R.W., Murdoch, G.K., Hill, R.A., Robison, B.D., Re, D., Kj, R., Settles, M.,
1221 Wacyk, J., Churchill, E., Rw, H., Gk, M., Ra, H., Bd, R., 2018. Effect of starvation
1222 on transcriptomes of brain and liver in adult female zebrafish (*Danio rerio*) 3051,
1223 283–295. doi:10.1152/physiolgenomics.90213.2008.

1224 Eaton, A.D., Franson, M.A.H., American Public Health Association., American Water
1225 Works Association., Water Environment Federation., 2005. Standard methods
1226 for the examination of water & wastewater. American Public Health
1227 Association.

1228 Favero, G.C., Yukihiro, R., Luz, G., 2017. Fasting and refeeding lead to more
1229 efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*) 359–366.
1230 doi:10.1111/are.13466

1231 Gopalan, G., Madon, S.P., Culver, D.A., Pappas, P.W., 1996. Measurement of
1232 metabolism in free ranging juvenile fishes using electron transport system (ETS)
1233 enzyme assays. International Congress on the Biology of Fishes, San
1234 Francisco.

1235 Kiessling, K.-H., Kiessling, A., 1993. Selective utilization of fatty acids in rainbow
1236 trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. Canadian

- 1237 Journal of Zoology 71, 248–251. doi:10.1139/z93-035
- 1238 Knox, D., Walton, M.J., Cowey, C.B., 1980. Distribution of enzymes of glycolysis and
1239 gluconeogenesis in fish tissues. Marine Biology 56, 7–10.
1240 doi:10.1007/BF00390588
- 1241 Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefe,
1242 F., Vachot, C., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary
1243 energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
1244 1154–1164. doi:10.1152/ajpregu.00766.2007.
- 1245 Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-
1246 system activity in marine zooplankton. Marine Biology 30, 27–36.
1247 doi:10.1007/BF00393750
- 1248 Packard, T.T., 1971. The measurement of respiratory electron transport activity in
1249 marine phytoplankton. Journal of Marine Research 29, 235–244.
- 1250 Pavek, T., 2015. Fish and amphibian euthanasia. Institutional Animal Care and Use
1251 Committee 222, 1–4.
- 1252 Rosenfeld, J., Van Leeuwen, T., Richards, J., Allen, D., 2015. Relationship between
1253 growth and standard metabolic rate: Measurement artefacts and implications
1254 for habitat use and life-history adaptation in salmonids. Journal of Animal
1255 Ecology 84, 4–20. doi:10.1111/1365-2656.12260
- 1256 Tytler, P., Calow, P. (Eds.), 1985. Fish Energetics New Perspectives, 1 st. ed.
1257 doi:10.1007/978-94-011-7918-8
- 1258 UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
- 1259 Wright, P. a, Fhyn, J.H., 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion, Fish
1260 Physiology. Vol. 20.
- 1261 Zammit, B.V.A., Newsholme, E.A., 1979. Activities of Enzymes of Fat and Ketone-
1262 Body Metabolism and Effects of Starvation on Blood Concentrations of Glucose
1263 and Fat Fuels in Teleost and Elasmobranch Fish 184, 313–322.

1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

1278

1279

1280

1281

1282

1283

1284 **Anexo 1**

1285 **Fórmulas para o Cálculo dos Índices**

1286 **Ganho de Peso** = Peso final – Peso Inicial

1287 **Proporção de Ganho** = Ganho de Peso / Peso Inicial *100

1288 **Conversão Alimentar** = Alimento Consumido / Ganho de Peso

1289 **Taxa de Crescimento Específico** = (Ln(Peso Final) – Ln (Peso Inicial) /tempo *100

1290 **Proporção Carcaça** = Peso da Carcaça / Peso Final

1291 **Atividade do Sistema Transportador de Elétrons =**

1292 (ABS – ABS_{Branco}) * 0,06 * 60 min *Fator de Diluição da Proteína/ (Fator Diluição da
1293 Amostra* Concentração de Proteína por Diluída)

1294