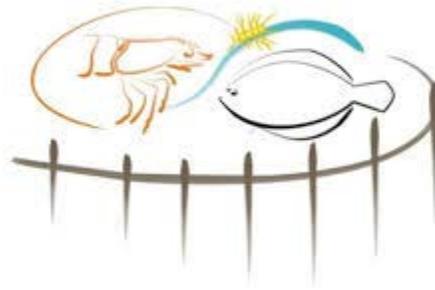




1  
2  
3  
4  
5  
  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

**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 ( $102 \pm 9.5$  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 ( $115.5 \pm 10.4$  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<sup>2</sup> 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, O<sub>2</sub> e calor, saídas como: fezes, amônia, ureia, CO<sub>2</sub>, 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 FADH<sub>2</sub>) 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<sup>+</sup> 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 FADH<sub>2</sub>, 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 *Hoplias*  
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 **Objetivos**

587 **Objetivo Geral**

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

590 **Objetivos específicos**

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

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

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

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

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 (*Danio rerio*)  
762 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 <sup>1</sup>, Andrea Idelette Hernandez <sup>1</sup>, Luciano García <sup>2</sup>, Virgínia**

894

**Fonseca Pedrosa <sup>1</sup>, José María Monserrat <sup>3</sup>, Luis Alberto Romano <sup>1</sup>**

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  $-86^{\circ}\text{C}$ , 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  $\pm 10.4$  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 O<sub>2</sub>/L, temperatura de  $27,3 \pm 2,1$ °C, alcalinidade  
 1012 de  $158,9 \pm 4,2$  mg de CaCO<sub>3</sub>/ 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, MgSO<sub>4</sub> 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, MgSO<sub>4</sub> 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 R<sup>2</sup> 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 <sub>a</sub>	114,8 ±4,7 <sub>a</sub>	113,9 ±5,2 <sub>a</sub>	121,6 ±4,7 <sub>a</sub>	
Peso Final	110,9 ±4,8 <sub>b</sub>	118,5 ±5,3 <sub>b</sub>	124,7 ±5,9 <sub>ab</sub>	138,8 ±5,3 <sub>a</sub>	0,73
Ganho de Peso	-5,9 ±2,1 <sub>c</sub>	3,37 ±1,4 <sub>b</sub>	10,8 ±2,8 <sub>ab</sub>	14,6±10,1 <sub>a</sub>	0,95
Proporção Ganho	-0,05 ±0,015 <sub>c</sub>	0,03±0,01 <sub>b</sub>	0,095 ±0,024 <sub>a</sub>	0,12±0,0164 <sub>a</sub>	0,95
CA	NA	2,5 ±0,18 <sub>b</sub>	1,6 ±0,18 <sub>a</sub>	1,9 ±0,16 <sub>a</sub>	0,57
TCE	-0,43 ±0,14 <sub>c</sub>	0,24 ±0,10 <sub>b</sub>	0,63 ±0,19 <sub>a</sub>	0,75 ±0,37 <sub>a</sub>	0,93
Proporção Carcaça	0,82 ±0,008 <sub>a</sub>	0,82 ±0,008 <sub>a</sub>	0,81 ±0,010 <sub>a</sub>	0,83 ±0,008 <sub>a</sub>	NA
Glicose (mg/dL)	40 ±3 <sub>b</sub>	64 ±3 <sub>a</sub>	60 ±4 <sub>a</sub>	65 ±3 <sub>a</sub>	0,55
IHS	0,041 ±0,007 <sub>b</sub>	0,083 ±0,007 <sub>a</sub>	0,095 ±0,009 <sub>a</sub>	0,094 ±0,007 <sub>a</sub>	0,53
Hb (g /dL)	7,61 ±0,345 <sub>a</sub>	7,22 ±0,378 <sub>a</sub>	7,84 ±0,422 <sub>a</sub>	7,93 ±0,378 <sub>a</sub>	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 R<sup>2</sup> 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.

<b>Fator</b>	<b>ETS Fígado</b>	<b>ETS Musculo</b>	<b>ETS Brânquia</b>	<b>ETS Rim</b>
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

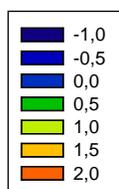
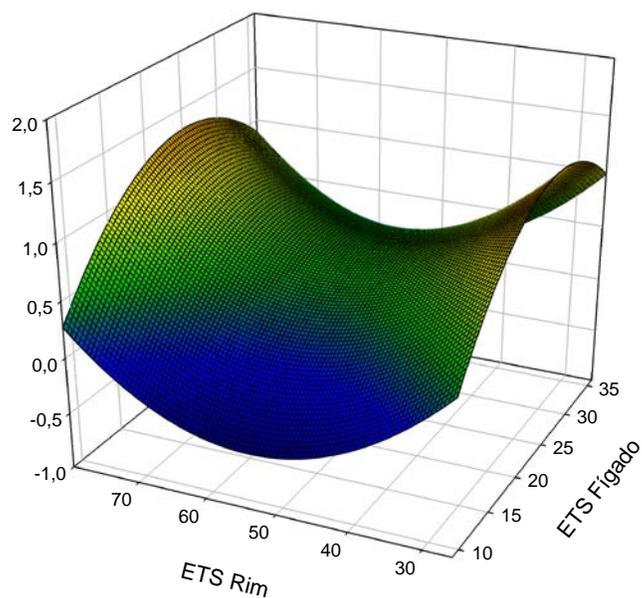
Componente Modelo	Soma de Quadrados	GI	Quadrado Médio	Razao-F	Valor-P
ETS Fígado	2,5159	1	2,5159	27,00	0,0003

<b>ETS Rim</b>	0,0891152	1	0,0891152	0,96	0,3491
<b>ETS Fígado 2</b>	1,6157	1	1,6157	17,34	0,0016
<b>ETS Rim 2</b>	0,886598	1	0,886598	9,51	0,0104
<b>Modelo</b>	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 predictoras 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<sub>Branco</sub>) \* 0,06 \* 60 min \*Fator de Diluição da Proteína/ (Fator Diluição da  
1293 Amostra\* Concentração de Proteína por Diluída)

1294