

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**EXPRESSÃO GÊNICA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
DESEMPENHO DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO
ALIMENTADAS COM NÍVEIS DE PROTEÍNA BRUTA NA
DIETA**

WALISSON DE SOUZA E SILVA

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2017

WALISSON DE SOUZA E SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E DESEMPENHO DE LARVAS
DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM NÍVEIS DE PROTEÍNA BRUTA NA
DIETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para Obtenção do grau de Mestre em Zootecnia

Área de concentração: Produção Animal/Aquacultura

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

S586e

Silva, Walisson de Souza e, 1990-

Expressão gênica, atividade enzimática e desempenho de larvas de Tilápia do Nilo alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta / Walisson de Souza e Silva. – 2017. 60 p. : il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

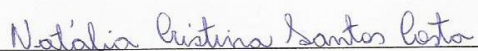
1. Tilápia (Peixe) – Alimentação e rações – Teses. 2. Dieta em veterinária – Teses.
3. Proteínas na nutrição animal – Teses. 4. Produção animal – Teses. I. Luz, Ronald
Kennedy. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 639.31

DISSERTAÇÃO defendida e aprovada em 20/02/2017 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof. (Orientador) Ronald Kennedy Luz



Dra. Natália Cristina Santos Costa



Profa. Dra. Gisele Cristina Fávero

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Efigênia (*In memoriam*) e Olímpio por todo apoio e sabedoria fundamentais para minha vida.

Dedico aos meus familiares, amigos e às minhas irmãs Regiane, Gracieli e Gislene que estiveram junto a mim durante a vida.

Dedico também aos meus sobrinhos Yuri e Lorena pela alegria proporcionada.

A Deus pela força para superar as dificuldades.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro de projetos.

Ao meu orientador Professor Dr. Ronald Kennedy Luz pela oportunidade, ensinamentos, incentivo, amizade e por acreditar na minha capacidade ao longo dos sete anos como meu orientador.

Ao Dr. Leandro Santos Costa pela amizade, paciência e co-orientação.

Ao Dr. José Fernando López-Olmeda, Dra. Natália Cristina Santos Costa e Welliene Moreira dos Santos pela paciência e ajuda na execução das análises e resultados.

À Professora Dra. Paula Adriane Perez Ribeiro pelas dicas na escrita da dissertação.

Aos docentes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial aos mestres do Departamento de Zootecnia (Escola de Veterinária), por transmitirem o conhecimento necessário para o meu crescimento intelectual e pessoal.

À Professora Dra. Gisele Cristina Fávero por aceitar a participar da banca de defesa da presente dissertação.

Ao grupo do Laboratório de Aquicultura, em especial à equipe de larvicultura pelo suporte mútuo durante a execução de experimentos.

À Professora Dra. Priscila Vieira Rosa da Universidade Federal de Lavras (UFLA) por ceder o Laboratório de Enzimologia para a execução de análises.

Ao Raphael Nogueira Bahiense pelo companheirismo, apoio e amizade.

À Deliane Cristina Costa, João Paulo Silva Lorenzini, Luanna do Carmo Neves, Camila Gomes de Oliveira, Angelica da Silva Ferreira e Amanda Hastenreiter do Espírito Santo (sem ordem de importância) pelas risadas, discussões e momentos únicos.

À Marina Guimarães Ferreira pela ajuda em Lavras.

Aos colegas de pós-graduação pela troca de conhecimento e pelos bons momentos.

Obrigado a todos que me ajudaram durante a minha caminhada.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1. Tilápia | 14 |
| 2.2. Proteína bruta em dietas para larvas | 14 |
| 2.3. Expressão gênica e atividade das enzimas digestivas em peixes | 15 |
| 2.3.1. Expressão gênica das enzimas digestivas | 16 |
| 2.3.2. Enzimas digestivas estudadas em peixes | 16 |
| 2.3.2.1. Tripsina e quimotripsina | 17 |
| 2.3.2.2. Pepsina | 18 |
| 2.3.2.3. Lipase | 18 |
| 2.3.2.4. Carboxipeptidase | 19 |
| 2.3.3. Expressão gênica do neuropeptídeo Y e colecistoquinina | 20 |
| 2.3.3.1. Neuropeptídeo Y (NPY) | 20 |
| 2.3.3.2. Colecistoquinina (CCK) | 20 |
| 2.4. Estresse por exposição ao ar | 21 |
| 3. OBJETIVOS | 22 |
| 3.1. Objetivo geral | 22 |
| 3.2. Objetivos específicos | 22 |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 23 |
| 5. ARTIGO | 33 |
| 5.1. Resumo | 34 |
| 5.2. Introdução | 35 |
| 5.3. Material e métodos | 36 |
| 5.3.1. Desenho experimental e instalações..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.2. Dietas experimentais | 37 |
| 5.3.3. Amostragem | 39 |
| 5.3.4. Desempenho | 39 |
| 5.3.5. Expressão gênica | 39 |
| 5.3.5.1. Extração de RNA | 39 |
| 5.3.5.2. Transcrição reversa e análise da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) | 40 |
| 5.3.6. Atividade enzimática | 42 |
| 5.3.7. Teste de estresse: exposição ao ar | 44 |
| 5.3.8. Análises estatísticas | 44 |
| 5.4. Resultados | 45 |
| 5.4.1. Desempenho | 45 |
| 5.4.2. Expressão gênica..... | 46 |
| 5.4.3. Atividade enzimática | 48 |
| 5.4.4. Teste de estresse: exposição ao ar | 49 |
| 5.5. Discussão | 49 |
| 5.6. Conclusões | 53 |
| 5.7. Agradecimentos | 53 |
| 5.8. Referências | 54 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Ingredientes e composição das dietas experimentais | 38 |
| Tabela 2- Sequência dos <i>primers</i> de tilápia utilizados na qPCR em tempo real | 41 |
| Tabela 3- Valores médios (\pm desvio padrão) de sobrevivência, comprimento, peso e taxa de crescimento específico diária (TCE) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta durante 30 dias | 45 |
| Tabela 4- Taxa de resistência ao estresse (Re) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta submetidas a dois tempos de exposição ao ar após 30 dias de cultivo | 49 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Médias (\pm erro padrão) das expressões relativas do mRNA para pepsinogênio (figura 1A), quimotripsinogênio (figura 1B), carboxipeptidase (figura 1C), CCK (figura 1D) e NPY (figura 1E) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta (PB) na dieta aos 10, 20 e 30 dias de experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). * não significativo 46

Figura 2- Médias (\pm desvio padrão) das atividades específicas de pepsina (U mg^{-1} proteína solúvel) (figura 2A), tripsina (mU mg^{-1} proteína solúvel) (figura 2B) e quimotripsina (U mg^{-1} proteína solúvel) (figura 2C) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta (PB) na dieta aos 10, 20 e 30 dias de experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). * não significativo 47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------------|---|
| A.O.A.C. | Association of Official Analytical Chemists |
| BApNA | N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida hidrocloreto |
| BHT | Hidroxitolueno butilado |
| BSA | Soro albumina bovina |
| BTEE | N-benzoil-L-tirosina etil éster |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CCK | Colecistoquinina |
| cm | Centímetro |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DHA | Ácido docosahexaenoico |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| EB | Energia bruta |
| ED | Energia digestível |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| <i>F_w</i> | <i>Foward</i> |
| g | Gramma |
| GH | Hormônio do crescimento |
| Kg | Quilograma |
| kJ | Kilojoules |
| LAQUA | Laboratório de Aquacultura |
| mg | Miligramma |
| Min | Minuto |
| MM | Matéria mineral |
| mM | Milimolar |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| MS | Matéria seca |
| nM | Nanomolar |
| nm | Nanômetro |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| PB | Proteína bruta |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia de polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| p/v | Peso/Volume |
| qPCR | <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPM | Revoluções por minuto |
| SNK | Student-Newman-Keuls |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| <i>R_v</i> | <i>Reverse</i> |
| TCE | Taxa de crescimento específico |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UFLA | Universidade Federal de Lavras |
| UI | Unidades internacionais |
| Vit | Vitamina |
| μg | Microgramma |

RESUMO

O objetivo do trabalho foi determinar a exigência de proteína bruta em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), avaliando o desempenho, expressão gênica, atividade das enzimas digestivas e estresse por exposição ao ar (Re). Foram formuladas dietas contendo: 30, 36, 42% e 48% de proteína bruta (PB). Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia. Foram feitas coletas de animais aos 10, 20 e 30 dias de experimento. Aos 30 dias foi avaliada a resistência à exposição ao ar. Para a expressão gênica, foram avaliados os genes neuropeptídeo Y (NPY), pepsinogênio, tripsinogênio, quimotripsinogênio, carboxipeptidase e colecistoquinina (CCK). Foram determinadas a atividade das enzimas tripsina, proteases ácidas e quimotripsina. Os dados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade. A sobrevivência não foi influenciada pelos níveis de PB na dieta ($P > 0,05$). Aos 10 dias de alimentação, os níveis de PB afetaram o desempenho, sendo que níveis acima de 36% PB são indicados nos 10 primeiros dias de larvicultura. A expressão gênica de pepsinogênio também foi afetada aos 10 dias, sendo maior a 30% PB, intermediária a 42% PB e inferior a 36 e 48% PB ($P < 0,05$). A partir dos 20 dias de alimentação, níveis entre 30 e 42% PB são indicados para melhor desempenho. As dietas não afetaram a expressão gênica e atividade enzimática nessa fase ($P > 0,05$). Aos 30 dias de alimentação, a expressão gênica e atividade das enzimas, CCK e NPY foram influenciados pelos níveis de PB na dieta, exceto para a expressão de pepsinogênio. A maior expressão e atividade enzimática foram detectadas para o nível de 42% PB nas diferentes enzimas, CCK e NPY, exceto para a atividade da pepsina que foi maior para os níveis de 42 e 48% PB ($P < 0,05$). Em relação ao teste de estresse, os animais apresentaram Re semelhantes nos dois tempos de exposição ao ar testados (5 e 7 minutos), independente da dieta. Contudo, quando se compara os tempos por cada nível de proteína, a dieta com 36% PB proporcionou a mesma Re independente do tempo testado ($P > 0,05$). Os demais níveis testados tiveram maior Re aos 5 minutos ($P < 0,05$). Assim, os diferentes níveis de proteína bruta afetam o desempenho, a resistência ao estresse, a expressão gênica e a atividade enzimática durante a larvicultura de tilápia do Nilo. Os resultados sugerem que o nível de PB a ser utilizado depende do período da larvicultura dessa espécie.

Palavras-chave: larvicultura, dietas, nutrição, gene, enzima

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the crude protein requirement in larvae of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), evaluating performance, gene expression and activity of digestive enzymes and stress by exposure to air (Re). Diets containing: 30, 36, 42% and 48% crude protein (CP) were formulated. The animals were fed four times daily. Animal samples were collected at 10, 20 and 30 days of experiment. At 30 days, the resistance to air exposure was evaluated. For the gene expression, the neuropeptide Y (NPY), pepsinogen, trypsinogen, chymotrypsinogen, carboxypeptidase and cholecystokinin (CCK) genes were evaluated. The activity of the enzymes trypsin, acid proteases and chymotrypsin were determined. The data were submitted to normality and homogeneity tests. Survival was not influenced by the CP levels in the diet ($P > 0.05$). After 10 days of feeding, CP levels affected performance, and above 36% CP levels are indicated in the first 10 days of larval rearing. Gene expression of pepsinogen was also affected at 10 days, being greater than 30% CP, intermediate to 42% CP and lower than 36 and 48% CP ($P < 0.05$). From the 20 days of feeding, levels between 30 and 42% PB are indicated for better performance. Diets did not affect gene expression and enzymatic activity in this phase ($P > 0.05$). At 30 days of feeding, the gene expression and activity of the enzymes, CCK and NPY were influenced by CP levels in the diet, except for the expression of pepsinogen. The highest expression and enzymatic activity were detected at the 42% CP level in the different enzymes, CCK and NPY, except for pepsin activity, which was higher at levels of 42 and 48% PB ($P < 0.05$). Regarding the stress test, the animals showed similar Re in the two air exposure times tested (5 and 7 minutes), regardless of diet. However, when comparing the times for each protein level, the diet with 36% CP provided the same Re regardless of the time tested ($P > 0.05$). The other levels tested had higher Re at 5 minutes ($P < 0.05$). Thus, different levels of crude protein affect performance, resistance to stress, gene expression and enzymatic activity during Nile tilapia larviculture. The results suggest that the PB level to be used depends on the larval period of this species.

Keywords: larviculture, diets, nutrition, gene, enzyme

1. INTRODUÇÃO

A tilápia (*Oreochromis* spp.) é um ciclídeo africano de água doce e, está entre as espécies de peixes mais cultivadas no mundo (FAO, 2016). Este fato se deve à adaptação, ótimo desempenho zootécnico, rusticidade em cativeiro e tolerância a condições ambientais adversas da espécie (Herawati et al., 2015). Além desses fatores, sua larvicultura pode ser realizada desde a primeira alimentação com o uso de dietas formuladas.

As dietas comerciais brasileiras utilizadas para larvicultura de tilápia apresentam mais de 50% de proteína bruta. É conhecido que os gastos com dietas podem chegar a 80% dos custos de produção (Pascoal et al., 2006). As dietas devem atender o requerimento nutricional incluindo níveis adequados de cada nutriente e garantir que esta seja consumida em quantidade suficiente para promover crescimento ótimo dos peixes e diminuir o desperdício de ração (Bomfim et al., 2008). Assim, a sustentabilidade precisa ser prioridade para amenizar os altos custos com alimentação e o impacto ambiental (Righetti et al., 2011).

Dentre os nutrientes utilizados nas dietas para peixes, a proteína é o mais oneroso (Figueiredo et al., 2014). As proteínas são essenciais ao desenvolvimento pleno dos animais, participando desde a deposição muscular até a formação e manutenção de sistemas vitais, envolvendo complexos enzimáticos, hormonais e do sistema imunológico (Cyrino et al., 2000). Entretanto, sabe-se que, de maneira geral, as rações oferecidas aos animais nos estágios iniciais de desenvolvimento apresentam níveis elevados de proteína bruta na sua composição, e que nem sempre correspondem às reais exigências dos peixes (Piedras et al., 2004).

Estudos sobre a expressão gênica e atividade de enzimas digestivas em peixes ajudam a esclarecer sobre níveis ideais de diversos nutrientes na dieta (Lundstedt et al., 2004; Panserat, 2010). A partir da expressão gênica e perfil de enzimas digestivas, é possível reconhecer a habilidade de uma determinada espécie de peixe em utilizar diferentes nutrientes (Furné et al., 2005).

Além disso, estudos sobre a resistência a exposição ao ar de larvas alimentadas com níveis de proteína são feitos como uma forma de se conhecer a melhor dieta com base na qualidade dos animais (Luz, 2007; Luz et al., 2012).

Assim, pesquisas na área de nutrição, que busquem a real exigência nutricional dos peixes, são ferramentas fundamentais para o aprimoramento da piscicultura comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão a seguir aborda aspectos da tilapicultura, níveis de proteína bruta na dieta, a importância de estudos de expressão gênica, atividade de enzimas digestivas e o uso de testes de exposição ao ar para a determinação da dieta adequada.

2.1. Tilápia

A tilápia, um ciclídeo africano, é a segunda espécie de peixe de água doce mais cultivada no mundo, sendo presente em todos os continentes e em mais de 130 países (FAO, 2016). A principal espécie de tilápia é a *Oreochromis niloticus*, conhecida popularmente como tilápia do Nilo e que possui hábito alimentar onívoro (Barros et al., 2002).

Esta espécie possui boa capacidade de adaptação em cativeiro, tendo rápido crescimento e tolerância a diversas condições ambientais (Herawati et al., 2015). A carne possui boa qualidade e aceitação do mercado consumidor (Popma e Lovshin, 1996, Boscolo et al., 2002, Righetti et al., 2011). Por essas razões, pesquisas com esta espécie têm sido feitas por diversos grupos de pesquisa, tendo seu genoma completamente descrito na base de dados do Ensembl (2014).

Na fase de larvicultura de tilápia o uso de alimento vivo é dispensável, sendo possível o seu cultivo com ração comercial na primeira alimentação exógena (Meurer et al., 2002; Luz et al., 2012), fato que facilita a produção de juvenis em comparação a espécies nativas que necessitam de alimento vivo na primeira alimentação.

2.2. Proteína bruta em dietas para larvas

A nutrição é fundamental para o sucesso do cultivo de uma espécie. Os gastos com alimentação representam a maior parte dos custos na piscicultura, sendo a proteína o nutriente de maior custo nas dietas de organismos aquáticos (Cho et al., 2005). Os peixes tem a capacidade de utilizar proteína como fonte de energia (Hisano e Portz, 2007). Portanto, o nível proteico na dieta deve ser balanceado para evitar gastos desnecessários (Ozorio et al., 2006).

O conhecimento do nível de proteína bruta ideal na dieta é fundamental para a maior eficiência alimentar de uma espécie diminuindo a carga de nutrientes no meio ambiente (Abdel-Tawwab e Ahmad, 2009). Na larvicultura de tilápia as rações comerciais disponíveis tem entre

50 e 55% de proteína bruta (PB). Contudo, em trabalho desenvolvido por Luz et al. (2012) foi verificado que a ração com 55% levou ao pior desempenho durante a larvicultura comparada a rações comerciais elaboradas para juvenis desta espécie com menores níveis de proteína bruta. Além disso, Hayashi et al. (2002) mostraram que 38,56% de proteína digestível (PD) (42% PB) seria ideal para melhor desempenho durante esta fase.

Abdel-Tawwab et al. (2010) avaliaram três níveis de proteína bruta (25, 35 e 45% PB) em larvas e juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Estes autores concluíram que o melhor desempenho foi para o nível de 45% PB. Contudo, para juvenis o melhor resultado foi com dietas de 35% de PB. Assim, os níveis incorretos de proteína bruta na dieta causam prejuízos no desempenho produtivo.

Contudo, estes estudos tem avaliado somente o desempenho zootécnico, havendo a necessidade de melhor esclarecimento dos efeitos da proteína a nível fisiológico, como por exemplo, a avaliação da expressão gênica e atividade das enzimas digestivas.

2.3. Expressão gênica e atividade de enzimas digestivas em peixes

O desenvolvimento do trato digestivo em peixes tem sido estudado em espécies de interesse comercial com o objetivo de diminuir as dificuldades na alimentação nas fases iniciais de cultivo (Gisbert et al., 2009; Chakrabarti e Rathore 2010; Galaviz et al., 2011; Uscanga-Martínez, et al., 2011, Rønnestad et al., 2013). Em larvas, o sistema digestivo é rudimentar e curto (Rønnestad et al., 2013). Durante a sua formação, as estruturas e órgãos acessórios se desenvolvem de acordo com o ambiente e hábito alimentar da espécie (Zambonino-Infante et al., 2008).

Assim, o conhecimento do desenvolvimento do sistema digestivo é primordial para o emprego da dieta adequada para larvas de peixes, além de ser importante para compreensão dos processos fisiológicos de cada espécie (Lazo et al., 2000). Este conhecimento também pode ser importante para reduzir ou até mesmo eliminar o uso de alimento vivo no cultivo de algumas espécies (Holt, 1993).

Durante este desenvolvimento, também tem importância o entendimento da atividade das enzimas digestivas que tem sido descritas através de métodos morfológicos, histológicos, bioquímicos, imunológicos e técnicas moleculares (Rønnestad et al., 2013). Porém, os estudos moleculares são pouco detalhados e, em sua maioria, são direcionados para peixes marinhos e salmonídeos.

2.3.1. Expressão gênica das enzimas digestivas

A expressão gênica das enzimas digestivas e seus precursores estão intimamente associados ao grau de desenvolvimento dos órgãos que a produzem e podem ser moduladas de acordo com a composição da dieta do animal, principalmente, no fim do estágio larval (Leaver et al., 2008; Panserat et al., 2008). Esse processo pode, conseqüentemente, afetar o desempenho e crescimento dos animais (Cahu e Zambonino-Infante, 1997).

O desenvolvimento das glândulas gástricas está relacionado à transição da fase larval para juvenil. O estudo da expressão e função gênica está associado com diferentes atividades proteolíticas e ajudam na compreensão da real capacidade digestiva das larvas (Darias et al., 2007a).

Para *Pagrus pagrus*, espécie marinha, os sinais da expressão gênica de amilase, lipase e tripsinogênio foram detectados nos primeiros dias após a eclosão, sugerindo que essas enzimas já existem no início da primeira alimentação exógena (Darias et al., 2007a). Qiang et al. (2012) testaram a interação de diferentes temperaturas e níveis de proteína na dieta em juvenis de *O. niloticus*. Estes concluíram que os fatores testados podem influenciar a expressão de genes somatotrópicos e o desempenho zootécnico dos animais. Portanto, estudos sobre expressão gênica são complementares para o nível de determinado nutriente na dieta.

2.3.2. Enzimas digestivas estudadas em peixes

Estudos sobre a atividade das enzimas digestivas são também uma ferramenta complementar aos estudos sobre a dieta ideal para determinada espécie (Perez et al., 2009). Devido ao seu papel essencial nas reações metabólicas, as enzimas podem indicar a condição do organismo (Ueberschär e Clemmesen, 1992). Para larvas de peixes, a atividade das enzimas digestivas pode ser considerada um indicador bioquímico da atividade alimentar, devido à especificidade, sensibilidade e latência curta (Cara et al., 2007). Diversas enzimas são utilizadas com esse propósito, como as enzimas pancreáticas proteolíticas (Cara et al., 2007) e até mesmo as enzimas citosólicas (Zambonino-Infante et al., 2008).

Estudos tem caracterizado o desenvolvimento das enzimas digestivas de peixes marinhos e de água doce (Cara et al., 2003; Ma et al., 2005; Alvarez-Gonzalez et al., 2006; Santos et al., 2016; Volkoff et al., 2016; Zhai et al., 2016). Contudo, ainda há a necessidade de estudos detalhados para se conhecer melhor o requerimento nutricional de larvas e a atividade das principais enzimas digestivas.

2.3.2.1. Tripsina e quimotripsina

A tripsina é uma importante enzima digestiva proteolítica, presente no desenvolvimento larval quando as glândulas gástricas ainda não se desenvolveram e não há atividade da pepsina para a digestão ácida (Murray et al., 2004). Esta enzima funciona como um indicador de crescimento (Darias et al., 2007b).

O tripsinogênio é a forma inativa da tripsina e se expressa na porção exócrina do pâncreas (Murray et al., 2004). Darias et al. (2007b) descreveram três tipos de tripsinogênios para *Pagrus pagrus* e identificaram o tripsinogênio 2 como o mais importante, sendo o primeiro tripsinogênio detectado no sistema digestivo e com maior expressão durante o primeiro mês de desenvolvimento. Os mesmos autores observaram queda na atividade do tripsinogênio no 50º dia pós-eclosão das larvas de *P. pagrus*, coincidindo com o período de metamorfose para a fase juvenil. Adicionalmente, os autores verificaram que essa espécie apresenta a expressão do tripsinogênio cinco vezes maior que da amilase e do BAL (*Bile salt-activated lipase*), indicando a importância da digestão proteica, mesmo que a atividade da pepsina ainda não esteja presente.

A quimotripsina é outra enzima proteolítica pancreática presente no intestino das larvas (Rønnestad et al., 2013). Semelhante à tripsina, a quimotripsina é uma serino protease alcalina, produzida no pâncreas e secretada como quimotripsinogênio no lúmen do intestino, tendo sua atividade complementar à da tripsina. Comparando com a tripsina, os conhecimentos sobre quimotripsina para larvas de peixes ainda são limitados (Rønnestad et al., 2013). A atividade da quimotripsina foi detectada em pós-larvas de *Diplodus puntazzo* e aumentou continuamente durante o período larval (Aktulun et al., 2008). Estes resultados confirmaram que a quimotripsina contribui na digestão de proteínas.

Para larvas de *Atractoscion nobilis*, a atividade específica de tripsina e quimotripsina também foram detectadas no primeiro dia após a eclosão e aumentou gradualmente ao longo do tempo. Porém, a atividade enzimática mais notável foi após a primeira alimentação exógena (Galaviz et al., 2011). Wang et al. (2006) relataram que o nível de proteína do alimento pode influenciar na expressão da tripsina em larvas de *Pelteobagrus fulvidraco*.

Em larvas de *Labeo rohita* alimentadas com microdieta e alimento vivo, a atividade da tripsina e quimotripsina cresceram nos primeiros sete dias de vida do animal, com posterior decréscimo (Chakrabarti et al., 2006a). O mesmo pode ser observado para *Cyprinus carpio* (Farhoudi et al., 2013) e híbridos de *Hypophthalmichthys nobilis* e *Hypophthalmichthys molitrix* (Chakrabarti et al., 2006b). Segundo esses autores, esse aumento pode ser atribuído à adaptação das larvas em digerir o maior teor de proteína no alimento. Já a diminuição na

atividade dessas enzimas pode estar relacionada com o desenvolvimento de novos órgãos e um aumento das proteínas dos tecidos e não à diminuição da atividade das enzimas digestivas.

2.3.2.2. Pepsina

Outra enzima importante é a pepsina. As glândulas gástricas produzem pepsinogênio e HCl para o lúmen do estômago. Um meio ácido é necessário para converter pepsinogênio em pepsina. A subunidade α da bomba de prótons (H^+/K^+ -ATPase) é responsável pela manutenção da produção de HCl. A detecção histológica dessas glândulas não quer dizer necessariamente que esta esteja totalmente funcional (Darias et al., 2007a).

Os primeiros sinais de expressão do pepsinogênio podem ser detectados 30 dias após eclosão em *P. pagrus*, quatro dias após a formação das glândulas gástricas (Darias et al., 2007a). Em larvas de *A. nobilis* foi detectada a atividade da pepsina 10 dias após a eclosão, com aumento gradual até 20 dias após eclosão, que coincidiu com aparecimento das glândulas gástricas (Galaviz et al., 2011). Resultado similar foi encontrado para *Lates calcarifer*, que 17 dias após eclosão já tinha atividade de pepsina presente. Para Alvarez-González et al. (2008) a atividade dessa enzima ocorre independentemente da alimentação exógena desde que a larva seja alimentada antes do quarto dias após a eclosão.

Nas espécies *C. carpio* (Farhudi et al., 2013), híbridos de *H. nobilis* e *H. molitrix* (Chakrabarti et al., 2006a) e *Cirrhinus mrigala* (Chakrabarti e Rathore, 2010) a atividade específica da pepsina também foi verificada nos primeiros dias de vida e decresceu no fim da fase larval. Em todas as espécies pesquisadas a atividade da pepsina está associada ao desenvolvimento do pâncreas e do intestino.

2.3.2.3. Lipase

A enzima BAL (*Bile salt-activated lipase*) é considerada a lipase mais importante em peixes, agindo em amplo espectro de substratos de éster e triacilgliceróis ricos em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (*Polyunsaturated fatty acid* – PUFA) (Murray et al., 2004). Essas lipases são secretadas pelo lúmen intestinal e ativadas pelos sais biliares (Howles et al., 1996). A BAL se ativa nos primeiros dias após a alimentação exógena, sugerindo a necessidade de uma alimentação balanceada já nos primeiros dias de vida do animal (Diaz et al., 2002).

A BAL possui expressão gênica no pâncreas exócrino (Darias et al., 2007b). Segundo os mesmos autores, a atividade dessa enzima aumenta de acordo com o desenvolvimento da

larva e pode ser avaliada através do método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Para *C. carpio* a atividade da lipase foi detectada no primeiro dia de alimentação exógena e decresceu durante o desenvolvimento do animal (Farhoudi et al., 2013). Ao contrário, para híbridos de *H. nobilis* e *H. molitrix* (Chakrabarti et al. 2006b) e *C. mrigala* (Chakrabarti e Rathore, 2010) a atividade da lipase aumentou durante todo período larval. Esses diferentes tempos são devido ao desenvolvimento das glândulas pancreáticas.

Hoehne-Reitan et al. (2001) mostraram que para *Psetta máxima*, o aumento na densidade de alimento vivo aumenta a atividade da lipase. Entretanto, os pesquisadores não observaram aumento no crescimento dos animais com o aumento dessas taxas de ingestão. Adicionalmente, mesmo com o aumento da atividade da lipase, não foi detectado melhor desempenho associado à composição lipídica do alimento vivo.

2.3.2.4. Carboxipeptidase

As carboxipeptidases são enzimas proteolíticas que tem diversas funções nos animais que variam do catabolismo à maturação da proteína. As carboxipeptidases A e B são sintetizadas no pâncreas logo na primeira alimentação e são expressas aos três dias após a fertilização em larvas de *Paralichthys olivaceus* (Srivastava et al., 2002). Para Galvão et al. (1997), enzimas digestivas proteolíticas de *Mugil platanus* durante as fases larval e juvenil são responsáveis pela digestão de alimentos exógenos. Segundo os mesmos autores, com quatro dias após a eclosão, a atividade da carboxipeptidase já existe em *M. platanus*, apesar de ser menor que na fase juvenil.

As pesquisas sobre a atividade e expressão das carboxipeptidases em larvas de peixes são escassas. Maiores estudos são necessários para maiores informações.

2.3.3. Expressão gênica do neuropeptídeo Y e colecistoquinina

2.3.3.1. *Neuropeptídeo Y (NPY)*

O neuropeptídeo Y (NPY) atua como um neurotransmissor no cérebro e desempenha papel de grande importância no consumo de alimento em vertebrados (Volkoff et al., 2009). Para mamíferos são conhecidos os diferentes efeitos do *NPY* sobre atividade dos neurônios GnRH-1 (Ward et al., 2009). No caso dos peixes, também se sabe que o *NPY* está também associado ao consumo de alimento (Campos et al., 2010). A expressão gênica do *NPY* pode ser influenciada pela composição da dieta, mas pouco se conhece sobre a regulação neural da alimentação e apetite em larvas (Narnaware et al., 2000; Narnaware e Peter, 2002).

Trabalhos relacionados à exposição de peixes ao *NPY* e aumento da ingestão de alimento têm sido realizados (Peng e Peter, 1997; Lopez-Patino et al., 1999; Volkoff et al., 2005; Aldegunde e Mancebo, 2006; Carpio et al., 2007; Kiris et al., 2007; Volkoff et al., 2009). Para as espécies *Gadus morhua* (Kehoe e Volkoff 2007), *C. auratus* (Narnaware et al., 2000) e *Salmo salar* (Murashita et al., 2009) a expressão gênica do *NPY* no cérebro aumenta após o jejum e após os animais serem alimentados.

No caso da detecção do *NPY* em larvas, para a espécie *P. olivaceus*, o *NPY* não foi detectado em larvas três dias após fertilização. O mesmo aconteceu para larvas em três dias após eclosão, quando estas começaram a se alimentar. O *NPY* foi detectado aos 30 dias após eclosão (Kurokawa e Suzuki, 2002). Já, em larvas de *Anguilla japonica* o *NPY* foi detectado aos oito dias após a eclosão, sendo o primeiro dia de alimentação desses animais (Suzuki et al., 2004). No caso de larvas de *Scophthalmus maximus* o *NPY* foi detectado aos cinco dias após a eclosão (Reinecke et al., 1997). Este fato coincide com o início da síntese enzimática, (Kurokawa et al., 2002), mostrando variações e a necessidade de estudos em outras espécies.

2.3.3.2. *Colecistoquinina (CCK)*

A *colecistoquinina (CCK)* é um hormônio peptídico do sistema gastrointestinal que desempenha papel de grande importância no consumo de alimento dos vertebrados e estimula o epitélio intestinal (Walsh, 1994). O *CCK* influencia na secreção de enzimas pancreáticas e os níveis de *CCK* são regulados pelos níveis e composição da proteína e gorduras na dieta (Cahu et al., 2004).

Este hormônio é um importante anorexígeno, sinalizando ao cérebro o momento de saciedade (Volkoff et al., 2005). Assim, regula a hipófise e a secreção hormonal (MacKenzie

et al., 1998). Portanto, a manipulação da dieta influencia na capacidade digestiva e nas funções endócrinas dos peixes, proporcionando maior desenvolvimento dos animais (Kortner et al., 2011).

Similar ao NPY, em larvas de *Anguilla japonica* a expressão da CCK foi detectada aos oito dias após a eclosão (Suzuki et al., 2004). Para larvas de *P. olivaceus*, a expressão gênica da CCK foi detectada aos dois dias após a eclosão.

Kortner et al. (2011) testaram diferentes constituintes na dieta de larvas de *Gadus morhua*. Nesse caso a expressão gênica de CCK foi detectada aos 29 dias após a eclosão. Um fato importante é que a expressão desta coincide com a expressão da tripsina, amilase e NPY.

Os resultados apresentados mostram que a expressão e atividade enzimática são dependentes do desenvolvimento de cada espécie estudada e podem ter relação com a alimentação.

2.4. Estresse por exposição ao ar

Além do conhecimento do desenvolvimento do sistema digestório para auxiliar na avaliação de dietas, os testes de resistência ao estresse também são uma forma de avaliação de qualidade de larvas e juvenis em função da alimentação (Luz, 2007; Luz et al., 2012). Esse teste pode indicar o efeito de dietas no bem-estar, tendo relação direta com os resultados no desempenho e sobrevivência dos animais (Luz, 2007).

Ako et al. (1994) testaram a resistência de larvas de *M. cephalus* alimentadas com náuplios de artêmia. Estes autores concluíram que o enriquecimento desses náuplios proporciona maior resistência de larvas a testes de exposição ao ar por 15 segundos.

Kanazawa (1997) testou a resistência de larvas de *Pagrus major* alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) e lecitina de soja. O autor concluiu que larvas alimentadas com 2% de DHA apresentam maior resistência ao estresse em teste de 30 segundos de exposição ao ar.

Para larvas de peixes de água doce, tempos maiores de exposição ao ar tem sido empregados. Larvas de *Pseudoplatystoma corruscans* apresentaram maior resistência ao estresse de exposição ao ar por 20 minutos quando alimentadas por alguns dias com larvas forrageiras, do que com larvas alimentadas apenas com náuplios de artêmia ou dieta seca (Luz, 2007). Esse mesmo autor comprovou que larvas de *Piaractus mesopotamicus*, apresentaram maior resistência ao teste de exposição ao ar por 20 minutos, quando alimentadas com náuplios

de artêmia ou náuplios de artêmia e dieta seca, comparado com larvas mantidas em jejum ou alimentadas exclusivamente com dieta seca.

Já, durante a larvicultura de *O. niloticus*, Luz et al. (2012) verificaram que tilápias alimentadas com 32 e 55% de proteína bruta foram menos resistentes à exposição ao ar de 7 e 10 minutos comparado aos que receberam 40% de proteína bruta.

Desta forma, fica evidente que este tipo de teste pode auxiliar na avaliação de diferentes dietas na qualidade de larvas e juvenis.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar níveis de proteína bruta na larvicultura de tilápia do Nilo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho e sobrevivência na larvicultura de tilápia do Nilo alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta;
- Avaliar a expressão gênica de neuropeptídeo Y (NPY), pepsinogênio, tripsinogênio, quimotripsinogênio, carboxipeptidase, lipase e colecistoquinina (CCK) em larvas de tilápia do Nilo alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta;
- Avaliar a atividade da tripsina, proteases ácidas e quimotripsina de larvas de tilápia do Nilo alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta.
- Avaliar a resistência ao estresse de larvas tilápia do Nilo alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., 2009. Live *Spirulina (Arthrospira platensis)* as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquac. Res.* 40, 1037–1046.

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Sakr, S.F.M., Seden, M.E.A., 2010. Use of green tea, *Camellia sinensis* L. in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) against *Aeromonas hydrophila* infection. *J. World Aquacult. Soc.* 41, 203–213.

Ako, H., Tamaru, C.S., Bass, P., Lee, C.S. 1994. Enhancing the resistance to physical stress in larvae of *Mugil cephalus* by feeding of enriched *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 122, 81–90.

Aktulun, S., Suzer, C., Kamaci, H.O., Coban, D., Saka, S., Kursat Fira, K., 2008. Activity of the digestive protease, chymotrypsin, in larvae of the cultured sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae. *Isr. J. Aquacult-Bamid.* 60, 82–88.

Aldegunde M., Mancebo M., 2006. Effects of neuropeptide Y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Peptides* 27, 719–727.

Alvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gsibert, E., Piedrahita, R., 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 31, 83–93.

Alvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 34, 373–384.

Barros, M.M., Lim, C., Klesius, P.H., 2002. Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 207, 263–279.

Bomfim, M.A.D., Lanna, E.A.T., Donzelle, J. L., Abreu, M.L.T., Ribeiro, F.B., Quadros, M., 2008. Redução de proteína bruta com suplementação de aminoácidos, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. *Rev. Bras. Zootecn.* 37, 1713–1720.

Boscolo, W.R., Hayashi, C., Meurer, F. 2002. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Rev. Bras. Zootecn.* 13, 539–545.

Campos, V.F., Collares, T., Deschamps, J.C., Seixas, F.K., Dellagostin, O.A., Lanes, C.F.C., Sandrini, J., Marins, L.F., Okamoto, M., Luís A. Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., 2010. Identification, tissue distribution and evaluation of brain neuropeptide Y gene expression in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Bioscience.* 35, 405–413.

Cara, B., Moynao, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol.* 63, 48–58.

Cara, B., Moyano, F.J., Zambonino-Infante, J.L., Fauvel, C., 2007. Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *J. Fish Biol.* 70, 1798–1808.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Int.* 5, 151-160.

Cahu, C. L., Rønnestad, I., Grangiera, V. and Zambonino-Infante, J. L., 2004. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238, 295–308.

Carpio, Y.L.K., Acosta, J., Morales, R., Estrada, M.P., 2007. Recombinant tilapia Neuropeptide Y promotes growth and antioxidant defenses in African catfish (*Clarias gariepinus*) fry. *Aquaculture* 272, 649-655.

Chakrabarti, R., Rathore, R.M., Mittal, P., Kumar, S., 2006a. Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a fresh water teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquacult. Nutr.* 12, 35–43.

Chakrabarti, R., Rathore, R.M., Mittal, P., Kumar, S., 2006b. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture* 253, 694–702.

Chakrabarti, R., Rathore, R.M., 2010. Ontogenic Changes in the Digestive Enzyme Patterns and Characterization of Proteases in Indian Major Carp *Cirrhinus mrigala*. *Aquac. Nutr.* 16, 569–581.

Cho, S.H., Lee, S.M., Lee, S.M., Lee, J.H., 2005. Effect of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared under optimum salinity and temperature conditions. *Aquacult. Nutr.* 11, 235–240.

Cyrino, J.E.P., Portz, L., Martino, R.C., 2000. Retenção de proteína e energia em juvenis de "black bass" *Micropterus salmoides*. *Scientia Agric.* 57, 609–616.

Darias, M.J.; Murray, H.M.; Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., 2007a. Ontogeny of pepsinogen and proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. *Aquaculture* 270, 369–378.

Darias, M.J., Murray, H.M., Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., 2007b. The spatiotemporal expression pattern of trypsinogen and bile salt-activated lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae). *Mar. Biol.* 152, 109–118.

Diaz, J.P., Mani-Ponset, L., Blasco, C., Blasco, C., Conne, R., 2002. Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat. Living Resour.* 15, 169–178.

Ensembl. Disponível em: <<http://www.ensembl.org/index.htm>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

Farhoudi, A., Abedian Kenari, A., Nazari, R., Makhdoomi, C.H., 2013. Changes of digestive enzymes activity in common carp (*Cyprinus carpio*) during larval ontogeny. Iran. J. Fish Sci. 12, 320–334.

Figueiredo, R.A.C.R., Souza, R.C., Bezerra, K.S., Campeche, D.F.B., Campos, R.M.L., Souza, A.M., Melo, J.F.B., 2014. Relação proteína:carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 66, 1567–1576.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of world fisheries and aquaculture. Rome, 2016. 204 p.

Furné, M., Hidalgo, M.C., Lopez, A., Garcia-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezaine, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, A comparative study. Aquaculture 250, 391–398.

Galaviz, M. A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López. L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. Aquaculture 318, 162–168.

Galvão, M.S.N., Yamanaka, N., Fenerich-Verani, N., Pimentel, C.M.M., 1997. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Gunter, 1980 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. Bol. Inst. Pesca. 24, 101–110.

Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estevéz, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture. 287, 381–387.

Hayashi, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M., Meurer, F., 2002. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. Rev. Bras. Zootecn. 31, 823–828.

Herawati, V.E., Hutabarat, J., Pinandoyo, Radjasa, O.K., 2015. Growth and survival rate of tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed by *Daphnia magna* cultured with organic fertilizer resulted from probiotic bacteria fermentation. Hayati J. Bioscience. 22, 169–173.

Hisano, H., Portz, L., 2007. Redução de custos de rações para tilápia: a importância da proteína. Bahia. Agric. 8, 42–45.

Hoehne-Reitan, K., Kjórsvik, E., Gjellesvik, D.R., 2001. Development of bile salt-dependent lipase in larval turbot. J. Fish. Biol. 58, 737–745.

Holt, G.J., 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in closed recirculating water system. J. World Aquacult. Soc. 42, 225–240.

Howles, P.N., Carter, C.P., Hui, D.Y., 1996. Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt-stimulated lipase) gene-targeted mice. J. Biol. Chem. 271, 7196–7202.

Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. Aquaculture 155, 129–134.

Kehoe, A. S., Volkoff, H., 2007. Cloning and characterization of *neuropeptide Y (NPY)* and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. 146, 451–461.

Kiris, G.A., Dikel, K.M.S., 2007. Stimulatory effects of neuropeptide Y on food intake and growth of *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 264, 383–389.

Kortner, T.M., Valen, E.C., Kortner, H., Marjara, I.S., Krogdahl, A., Bakke, A.M., 2011. Candidate reference genes for quantitative real-time PCR (qPCR) assays during development of a diet-related enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the potential pitfalls of uncritical use of normalization software tools. Aquaculture 318, 355–363.

Kurokawa T., Suzuki T., 2002. Development of neuropeptide Y-related peptides in the digestive organs during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 126, 30–38.

Lazo, J. P., Holt, G.J., Arnold, C.R., 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquacult. Nutr.* 6, 183–192.

Leaver, M.J., Villeneuve, L.A.N., Obach, A., Jensen, L., Bron, J.E., Tocher, D.R., Taggart, J.B., 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics.* 9, 1–15.

López-Patiño, M.A, Guijarro A.I., Isorna, E., Delgado, M.J., Alonso-Bedate, M., De Pedro, N., 1999. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding in goldfish (*Carassius auratus*). *Eur. J. Pharmacol.* 377, 147–53.

Lundstedt, L.M., Melo, F.B., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137, 331–339.

Luz, R.K., 2007. Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentados com diferentes dietas. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42, 65–72.

Luz, R.K., Silva, W.S., Mellilo Filho, R., Santos, A.E.H., Rodrigues, L.A., Takata, R., Alvarenga, E.R., Turra, E.M., 2012. Stocking density in the larviculture of Nile tilapia in saline water. *Rev. Bras. Zootecn.* 41, 2385–2389.

Ma, H., Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Ya, H., Duana, Q., Le Gall, M.M., Ma, K., 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245, 239–248.

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

Meurer, F., Hayashi, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M., 2002. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). Rev. Bras. Zootecn. 31, 566–573.

Murashita, K., Kurokawa, T., Nilsen, T.O., Rønnestad I., 2009. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): molecular cloning and tissue expression. Gen. Comp. Endocrinol. 160, 223–235.

Murray, H.M., Perez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). Comp. Biochem. Physiol. 138, 53–59.

Narnaware, Y.K., Peyon, P.P., Lin, X.W., Peter, R.E., 2000. Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. Am. J. Physiol. 279, 1025–1034

Narnaware, Y.K., Peter, R.E., 2002. Influence of diet composition on food intake and *neuropeptide Y (NPY)* gene expression in goldfish brain. Regulatory Pept. 103, 75–83.

Ozório, R.O.A., Valente, L.M.P., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2006. Growth performance and body composition of white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets with different protein and lipid levels. Aquac. Res. 37, 255–263.

Panserat, S., C. Kolditz, C., N. Richard, N. E., Plagnes-Juan, F., Piumi, D. Esquerré, F., Médale, G., Corrze, S., Kaushik, 2008. Hepatic gene expression profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fish meal or fish oil-free diets. Br. J. Nutr. 100, 953–967.

Panserat, S., Kaushik, S.J. Regulation of gene expression by nutritional factors in fish., 2010. Aquac. Res. 41, 751–762.

Pascoal, L. A. F., Miranda, E. C., Silva Filho, F. P., 2006. O uso de ingredientes alternativos em dietas para peixes. Rev. Eletr. Nutri. 3, 284–298.

Perez-Jimenez, A., Cardenete, G., Morales, A.E., Garcia-Alcazar, A., Abellan E., Hidalgo, M.C., 2009. Digestive enzymatic profile of *Dentex dentex* and response to different dietary formulations. *Comp .Biochem. Physiol. A.* 154, 157–164.

Peng, C., Peter, R.E., 1997. Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion and Growth in Fish. *Zool. Stud.* 36, 79–89.

Piedras, S.R.N., Pouey, J.L.O.F., Rutz, F., 2004. Efeitos de diferentes níveis de proteína bruta e de energia digestível na dieta sobre o desempenho de alevinos de peixe-rei. *Rev. Bras. Agric.* 10, 97–101.

Popma, J.T., Lorshin L.L., 1996. Worldwide prospect for commercial production of tilapia. Research and development series. International center for aquaculture and aquatic environments, department of fisheries and Allied Aquaculture, Auburn University Alabama. 41 p.

Qiang J., Yang H., Wang H., Kpundeh M.D., Xu P., 2012. Interactive effects of temperature-dietary protein level on somatotropic gene expression and its interrelationship with growth in juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 364–365, 263–271.

Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., LoYng-Cueni, D., 1997. Insulin-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression, and cellular localization. *Endocrinology* 138, 3613–3619.

Righetti, J.R., Furuya, W.M., Conejero, C.I., Graciano, T.S., Vidal, L.V.O., Michellato, M., 2011. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. *Ver. Bras. Zootecn.* 40, 469–476.

Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C., 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev. Aquac.* 5, 59–98.

Santos, J.F., Soares, K.L.S., Assis, C.R.D., Guerra, C.A.M., Lemos, D., Carvalho Jr., L.B., Bezerra, R.S., 2016. Digestive enzyme activity in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under pond and cage farming systems. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1259–1274.

Srivastava, A.S., Kurokawa, T., Suzuki, T., 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Phys. A.* 132, 629–635.

Suzuki, R., Lumeng, L., McBride, W.J., Li, T.K., Hwang, B.H., 2004. Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the central nucleus of amygdala of alcohol preferring (P) rats: its potential involvement in alcohol preference and anxiety. *Brain Res.* 254, 251–254.

Ueberschär, B., Clemmesen, C., 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods - tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *Mar. Sci.* 49, 245–249.

Uscanga-Martínez, A., Moyano-López, F.J., Álvarez-González, C.A., Perales-García, N., 2011. Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23-25 de Noviembre, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 46-104.

Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerda-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocr.* 142, 3–19.

Volkoff, H., Unniappan, S., Kelly, S. P., 2009. The endocrine regulation of food intake. *Fish Neuroendocrinol.* 28, 421–465.

Volkoff, H., Sabioni, R.E., Cyrino, J.E.P., 2016. Appetite regulating factors in dourado, *Salminus brasiliensis*: cDNA cloning and effects of fasting and feeding on gene expression. *Gen. Comp. Endocr.* 237, 34–42.

- Walsh, D.A., Terenghi, G., Polak, J.M., 1994. Neural and vascular regulatory factors of the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol.* 3, 116–139.
- Wang, C., Shouqi, X., Xiaoming, Z., Leia, W., Yanga, Y., Liua, J., 2006. Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture* 254, 554–562.
- Ward, D.R., Dear, F.M., Ward, I. A., Anderson, S.I., Spergel, D.J., Smith, P. A., Francis Ebling, J.P., 2009. Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse. *PLoS One.* 4, 5322–5334.
- Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, S., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Ed). *Feeding and Digestive Functions in Fishes*, Science Publishers, Enfield, NH. 281–348.
- Zhai, S.W., Shi, Q.C., Chen, X.H., 2016. Effects of dietary surfactin supplementation on growth performance, intestinal digestive enzymes activities and some serum biochemical parameters of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Italian J. Animal Sci.*, 15, 318–324.

5. ARTIGO

Expressão gênica, atividade enzimática e desempenho de larvas de tilápia do Nilo alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta

5.1. Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a exigência de proteína na larvicultura de *Oreochromis niloticus*, avaliando-se o desempenho, estresse por exposição ao ar, expressão gênica e atividade das enzimas digestivas. Foram formuladas dietas contendo 30, 36, 42 e 48% de proteína bruta (PB). Foram feitas coletas de animais aos 10, 20 e 30 dias de experimento. Aos 30 dias foi avaliada a resistência ao estresse (Re) pelo teste de exposição ao ar. Após 10 dias de alimentação, níveis entre 36 e 48% de PB podem ser utilizados para melhor desempenho. Neste período, a expressão relativa do pepsinogênio, foi maior a 30%, intermediária a 42% e inferior a 36 e 48% PB (ANOVA $P < 0,05$). Contudo, após este período inicial, dietas contendo entre 30 e 42% de PB são recomendadas para o melhor desempenho dos animais. Aos 20 dias de alimentação, tanto a expressão gênica como as atividades das enzimas foram semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$). Aos 30 dias, 42 %PB proporcionou a maior expressão e atividade enzimática, com exceção da expressão de *pepsinogênio* e atividade da pepsina. A sobrevivência após 30 dias de larvicultura não foi influenciada pelos níveis de PB. Assim como a Re quando avaliada aos 5 e 7 minutos independente da dieta. Porém, ao se comparar os tempos por cada nível de proteína, a única que proporcionou Re semelhante foi a de 36% PB. Desta forma, o melhor nível de PB a ser utilizado na larvicultura de *O. niloticus* depende da idade dos animais, sendo que a dieta pode interferir na expressão gênica e atividade de enzimas.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, Piscicultura, Larvicultura, Proteína, Enzimologia, Molecular

5.2. Introdução

A espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como tilápia do Nilo, é de origem africana e pertence à família cichlidae (Stiassny, 1991). Esta está entre as espécies de peixes mais cultivadas no mundo (Diógenes et al., 2016). Segundo os mesmos autores, esse fato se deve ao rápido crescimento, carne apreciada pelo mercado e excelente desempenho em sistemas intensivos de criação. Além disso, a tilápia resiste a altas temperaturas, alta concentração de amônia na água, elevadas densidades de estocagem, baixa concentração de oxigênio dissolvido, é resistente a doenças e reproduz durante todo o ano (Popma e Lovshin, 1996; Boscolo et al., 2002).

Além das características já citadas, outro ponto relevante é que as larvas de tilápias são alimentadas com dietas comerciais desde a primeira alimentação exógena (Meurer et al., 2002; Luz et al., 2012), fato que facilita esta etapa de produção considerada crítica para muitas espécies de água doce (Santos e Luz, 2009).

As dietas comerciais disponíveis para a larvicultura de tilápia têm entre 50 e 55% de proteína bruta. Luz et al. (2012) verificaram que a dieta com 55% levou a pior desempenho durante a larvicultura comparada a rações comerciais com menores níveis de proteína bruta elaboradas para juvenis desta espécie. Além disso, Hayashi et al. (2002) mostraram que 38,56% de proteína digestível (PD) correspondente a 42% de proteína bruta (PB) seria ideal para melhor desempenho durante esta fase. Contudo, estes estudos têm avaliado somente a parte de desempenho, havendo a necessidade de melhor esclarecimento dos efeitos da proteína a nível fisiológico.

A proteína é o nutriente de maior importância na formulação de dietas, pois está diretamente ligado ao crescimento dos animais (El-Sayed, 1999), sendo essencial o fornecimento do nível proteico adequado para otimizar os custos com rações (Al-Hafedh, 1999). Os nutrientes devem ser digeridos para seu melhor aproveitamento, sendo que as enzimas têm papel essencial nesse processo (Murashita et al., 2015). Para larvas de peixes, a atividade das enzimas pode ser considerada um indicador bioquímico da atividade alimentar (Cara et al., 2007).

Além disso, a dieta pode modular a expressão gênica e atividade de enzimas digestivas (Péres et al., 1998), que junto a seus precursores estão associadas ao grau de desenvolvimento dos órgãos que as produzem (Morais et al., 2007). Além disso, essas podem ser moduladas de acordo com a composição da dieta do animal, principalmente, no fim do estágio larval (Morais

et al., 2007; Yúfera e Darias, 2007; Gilbert et al., 2008; Zambonino-Infante et al., 2008; Rønnestad, et al., 2013). Porém, a maioria desses trabalhos foram realizados com o uso de alimento vivo, sendo escassos os estudos sobre a expressão gênica e atividade de enzimas na fase de larvicultura com o uso de dietas formuladas.

Outro indicador de condição de organismo são os testes de resistência ao estresse que podem ser uma ferramenta para avaliar a qualidade de larvas e juvenis (Luz, 2012). Dentre os testes de resistência ao estresse, o de exposição ao ar é comumente utilizado para algumas espécies de peixes (Luz e Portella, 2005; Luz, 2007; Trushenski et al., 2010). Esse pode indicar o efeito de diferentes dietas na saúde e bem-estar dos animais, uma vez que possui relação direta com os resultados de crescimento e sobrevivência (Luz, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica e atividade de enzimas digestivas, desempenho zootécnico, sobrevivência e resistência ao estresse de exposição ao ar de larvas de *O. niloticus* alimentadas com níveis de proteína bruta.

5.3. Material e métodos

5.3.1. Desenho experimental e instalações

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquacultura (LAQUA) da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, com duração de 30 dias e seus procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo CEUA 248/2016).

Foram utilizadas larvas de tilápia do Nilo da linhagem GIFT, com cinco dias de vida ($0,009 \pm 0,002$ g). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro dietas e quatro repetições, totalizando 16 unidades experimentais. As larvas foram distribuídas nos 16 tanques circulares de 30 L, na densidade de 5 larvas L⁻¹. Os tanques foram mantidos em sistema de recirculação de água, com filtragem mecânica e biológica. O fluxo de água nos tanques foi de aproximadamente 40 mL min⁻¹. Durante o experimento, a temperatura da água foi de $27,80 \pm 1,23$ °C, o teor de oxigênio dissolvido se manteve em $6,31 \pm 2,02$ mg L⁻¹ e o pH foi de $7,91 \pm 0,14$, monitorados através de sonda multiparâmetros YSI 6920VZ2. A amônia total foi aferida utilizando *kits* comerciais (Alcon®) a cada dois dias e se manteve em $0,29 \pm 0,22$ mg L⁻¹ em todos os tratamentos.

Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia (08:00, 11:00, 14:00 e 17:00 h) na taxa de arraçoamento de 20% da biomassa nos primeiros 10 dias de experimento. Nos 20 dias

seguintes, a taxa de arraçoamento foi de 10% da biomassa. Os tanques foram sifonados duas vezes ao dia para a retirada de sobras de ração e fezes.

5.3.2. Dietas experimentais

As dietas contendo quatro níveis de proteína bruta (30, 36, 42 e 48% de proteína bruta-PB) são apresentadas na tabela 1. As dietas foram formuladas, os ingredientes moídos, pesados, misturados e extrusados em extrusora monorosca da Inbramaq[®], modelo Labor PQ30 em peletes de 4-6 mm. Posteriormente, as dietas foram analisadas para determinação da composição bromatológica. Foram avaliados os teores de matéria seca (MS) (estufa a 105°C), proteína bruta (PB) (Kjedahl N x 6,25), energia bruta (EB) (bomba calorimétrica adiabática), matéria mineral (MM) (mufla a 550°C por 5 h) e extrato etéreo (Método Soxhlet) conforme metodologias descritas pela A.O.A.C. (2016) (tabela 1). Para a alimentação, durante os primeiros 20 dias, as dietas foram fareladas (diâmetro <0,5 mm) para fornecimento as larvas. Nos últimos 10 dias de cultivo as dietas foram trituradas.

Tabela 1. Ingredientes e composição das dietas experimentais utilizadas na larvicultura de *Oreochromis niloticus*

| Ingredientes (%) | Níveis de proteína bruta na dieta (%) | | | |
|--|---------------------------------------|---------|---------|---------|
| | 30 | 36 | 42 | 48 |
| Farinha de peixe | 21,00 | 24,00 | 29,00 | 33,00 |
| Farelo de soja | 31,00 | 33,00 | 37,00 | 40,00 |
| Milho | 31,50 | 22,90 | 13,80 | 3,90 |
| Quirera de arroz | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Albumina | 1,60 | 6,50 | 9,10 | 13,00 |
| Óleo de soja | 6,60 | 5,30 | 3,70 | 2,60 |
| Celulose | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 |
| Fosfato bicálcico | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| BHT ² | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Premix vitamínico-mineral ¹ | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Sal | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Caulim | 0,78 | 0,78 | 0,88 | 0,98 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Valores calculados | | | | |
| Energia digestível (ED) kj g ⁻¹ dieta | 3409,25 | 3405,09 | 3404,54 | 3407,21 |
| Cálcio | 0,78 | 0,86 | 1,01 | 1,13 |
| Fósforo | 0,72 | 0,76 | 0,85 | 0,91 |
| Lisina | 1,89 | 2,05 | 2,36 | 2,60 |
| Metionina | 0,49 | 0,53 | 0,61 | 0,67 |
| Treonina | 1,07 | 1,14 | 1,29 | 1,40 |
| Composição proximal³ | | | | |
| Matéria seca (MS) (%) | 91,50 | 91,50 | 91,50 | 91,60 |
| Proteína bruta (PB) (%) | 31,12 | 36,60 | 42,05 | 49,34 |
| Energia bruta (EB) kj g ⁻¹ dieta | 4266,64 | 4282,76 | 4204,13 | 4204,13 |
| Matéria mineral (MM) (%) | 7,02 | 7,49 | 10,08 | 10,32 |
| Extrato etéreo (EE) (%) | 7,77 | 7,86 | 6,35 | 6,69 |

¹Composição do suplemento vitamínico e mineral: Vit. A, 1.200.000 UI; Vit. D₃, 200.000 UI; Vit. E, 12.000 mg; Vit. K, 2.400 mg; Vit. B₁, 4.800 mg; Vit. B₂, 4.800 mg; Vit. B₆, 4.000 mg; Vit. B₁₂, 4.800 mg; Ác. fólico, 1.200 mg; Ác. Pantotênico, 3.750 mg; Vit. C, 48.000 mg; Biotina, 48 mg; Colina, 65.000 mg; Niacina, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 6.000 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg; Se, 20 mg

²Butil-Hidroxi-tolueno (antioxidante)

³Valores analisados em laboratório, expressos com base na matéria seca

5.3.3. Amostragem

Foram coletados 12 animais de cada tratamento nas coletas que ocorreram aos 10, 20 e 30 dias de experimento antes da primeira alimentação diária. Os animais foram eutanasiados com uma overdose de Eugenol (285 mg L⁻¹), pesados e medidos. Os mesmos animais foram limpos em álcool e soro fisiológico. Após, as amostras de animais inteiros foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior análises enzimáticas e de expressão gênica.

5.3.4. Desempenho

Após 30 dias de larvicultura, foi determinada a sobrevivência por contagem direta dos animais. Aos 10, 20 e 30 dias de experimento foram realizadas biometrias. O comprimento foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett® EC799A-8/ 200mm) e o peso com o auxílio de balança analítica digital (Oryon® AY-220 com sensibilidade de 0,0001g). Para tal, os animais foram anestesiados com eugenol a 175 mg L⁻¹.

Com os dados de peso foi calculada a taxa de crescimento específico diária (% dia⁻¹) (TCE) através da fórmula:

$$TCE = 100 (\ln Pf - \ln Pi) / \Delta t$$

Na qual: Pi é o Peso Inicial, Pf é o Peso Final e Δt é a duração de dias entre as amostragens.

5.3.5. Expressão gênica

5.3.5.1. Extração de RNA

Para a expressão gênica foram separados seis animais por tratamento de cada coleta (10, 20 e 30 dias após a eclosão), totalizando 72 peixes.

As amostras de corpo inteiro foram transferidas para microtubos estéreis, contendo 1 mL de Trizol (Invitrogen, CA, EUA), homogeneizadas utilizando-se Ultra Turrax® (IKAWorks, Inc., Wilmington, USA) e centrifugadas a 10.690 rpm utilizando centrífuga (Hermle Z216MK), por 5 minutos, a 4°C. Ao final desse processo, notou-se um pequeno pellet no fundo do tubo, correspondente às membranas celulares e DNA de alto peso molecular. O

sobrenadante contendo o RNA foi coletado utilizando-se pipeta de 1000 μ L e transferido para um novo eppendorf estéril, na qual foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (livre de RNase). A mistura foi agitada por 30 segundos, incubada durante 10 minutos (temperatura ambiente) e centrifugada a 10690 rpm, por 15 minutos, a 4 °C.

Ao término da centrifugação, notou-se um líquido dividido em duas fases, sendo que a que continha o RNA se encontrava na parte superior, na qual foi cuidadosamente coletada com auxílio de pipeta de 100 μ L e transferida para um novo eppendorf estéril. A este material foi adicionado 0,5 mL de isopropanol (livre de RNase), homogeneizado durante 15 segundos, incubados por 10 minutos (temperatura ambiente) e centrifugado por 10690 rpm, por 10 minutos. Ao final da centrifugação, um pequeno pellet contendo o RNA se formou no fundo do eppendorf. O líquido foi retirado cuidadosamente, para evitar o desprendimento do pellet, e descartado.

Para lavagem do RNA, foi adicionado 1 mL de etanol 75% (livre de RNase), centrifugado a 10690 rpm, por 5 minutos, a 4 °C, com posterior retirada do álcool. Este procedimento foi repetido. Após a retirada do álcool da segunda lavagem, o tubo foi mantido aberto por aproximadamente 10 minutos, à temperatura ambiente, para evaporação do líquido residual. Ao pellet de RNA já seco foi adicionado 50 μ L de água DEPC (dietilpirocarbonato, inibidor de RNase). O material foi agitado até a completa homogeneização e mantido a -80 °C, para posterior análise. A concentração da solução de RNA foi medida com auxílio do aparelho DNOVIX DS11 Spectrofotometer.

5.3.5.2. Transcrição reversa e análise da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

A retro-transcrição foi feita utilizando-se 1 μ g de RNA e kit comercial de transcrição reversa (kit QuantiTect, Qiagen, Alemanha), que incluía a eliminação do DNA genômico. O cDNA foi submetido a análises de PCR quantitativo, utilizando um termociclador de luz em tempo real (7500 RealTime PCR sistema, Applied Biosystems, CA, EUA), seguindo o protocolo: incubação inicial a 95°C, durante 15 minutos, seguida por 40 ciclos que alternavam a temperatura de 95°C, durante 15 segundos e 60°C, durante 1 minuto. As reações foram realizadas utilizando SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todas as amostras foram feitas em duplicata.

A eficiência relativa de amplificação de todos os genes foi analisada por meio das curvas de diluição do cDNA, sendo semelhante para todos os genes. O valor da expressão relativa de cada gene foi calculado pelo método do $\Delta\Delta CT$, utilizando-se como referência endógena o fator de alongação 1 α e 18s (Yang et al., 2013).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 μ L. Os *primers* de quimiotripsinogênio foram feitos na concentração de 800 nM, os de carboxipeptidase, lipase e neuropeptídeo Y (NPY) a 400nM e os de pepsinogênio, tripsinogênio, colecistoquinina (CCK), fator de alongação 1 α e 18S foram feitos na concentração de 200 nM. Estas concentrações foram determinadas por meio de uma curva de diluição dos *primers*.

As sequências dos *primers* estão apresentadas na tabela 2 e foram desenhadas com auxílio do *software Primer 3* (Rozen e Skaletsky, 1999).

Tabela 2. Sequência dos *primers* de tilápia utilizados na qPCR em tempo real

| Gene | Número no Ensembl/GenBank | Fw/Rv | Sequência do primer (5' - 3') |
|--------------------|---------------------------|-------|-------------------------------|
| Pepsinogênio | JQ043215.1 | Fw | TGACCAATGACGCTGACTTG |
| | | Rv | GGAGGAACCGGTGTCAAAAATG |
| Quimotripsinogênio | ENSONIG00000003237 | Fw | TTCTGCCTTCGCTTCTCATC |
| | | Rv | TTCAACGCCATCTGCTACTG |
| Tripsinogênio | AY510093.1 | Fw | AGTGCGCAAAGAACTCTGTG |
| | | Rv | AATGTTGTGCTCACCAAGGC |
| Lipase | ENSONIG00000005832 | Fw | TCGGTGGATGGCATGATGGAGA |
| | | Rv | GCGACTGGATAGTGCTGCTGAG |
| Carboxipeptidase | ENSONIG00000003887 | Fw | TGAGGGGCATAAAGTGCTTC |
| | | Rv | GCTCGAACTCCATCATTCC |
| Colecistoquinina | ENSONIG00000019439.1 | Fw | AGAAACTCCACGGCAAACAG |
| | | Rv | ACTCATACTCCTCTGCACTGC |
| Neuropeptídeo Y | ENSONIG00000004499 | Fw | ACACCCAACACTGCTTGAAG |
| | | Rv | TGTTGCACAGATGACGACTC |
| EF1 α | AB075952 | Fw | GATTGACCGTCGTTCTGGCAAGAAGC |
| | | Rv | GGCAAAGCGACCAAGGGGAGCAT |
| 18S RNA ribossomal | JF698683 | Fw | GGACACGGAAAGGATTGACAG |
| | | Rv | GTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC |

5.3.6. Atividade enzimática

Para a atividade enzimática foram separados seis animais por tratamento para cada coleta (10, 20 e 30 dias após a eclosão), totalizando 72 amostras a serem analisadas.

O animal inteiro foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,8 contendo 0,1 % de Triton X-100 e EDTA 0,1 mM, na proporção de 4 mL de tampão para cada 1g de amostra, e o homogenato obtido foi centrifugado a 14000 rpm, a 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente para obtenção de um extrato lípido. O extrato enzimático obtido foi, então, aliqotado e armazenado em ultrafreezer -80°C para,

posteriormente, realizar as análises enzimáticas. Todas análises foram feitas em triplicata em leitor de microplaca Multiskan Go (Thermo Scientific).

Para a determinação da atividade da tripsina foi utilizado BApNA (N α -benzoyl-L-arginina-4-nitroanilida) como substrato. Para isso, 40 μ L do extrato enzimático obtido foram diluídos em 160 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 contendo CaCl₂ 20 mM, e alíquotas de 20 μ L dessa nova solução foram incubadas com 100 μ L de uma solução de substrato contendo BApNA 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,2 e CaCl₂ 20 mM a 30°C utilizando um microplaca de acrílico com 96 poços (CORNING Incorporated – USA). A atividade foi mensurada pela leitura da absorbância a 410 nm a cada 30 segundos durante 30 minutos. A velocidade da reação foi expressa em atividade específica, definida como nmol de 4-nitroanilina produzida por minuto (U) por mg de proteínas (mU⁻¹ mg proteína). O coeficiente de extinção molar da 4-nitroanilina utilizado para efetuar os cálculos foi 8800 M⁻¹ cm⁻¹.

Para a determinação da atividade da quimotripsina foi utilizado BTEE (N-benzoil-L-tirosina etil éster) como substrato. Para isso, 20 μ L do extrato enzimático obtido foi diluído em 160 μ L de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,8 contendo CaCl₂ 25 mM. Alíquotas de 20 μ L dessa nova solução foram incubadas com 140 μ L de uma solução de substrato contendo BTEE 1,13 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7,8 e CaCl₂ 25 mM a 30°C utilizando microplaca em acrílico com tratamento ultravioleta contendo 96 poços (CORNING Incorporated – USA).

A atividade foi mensurada pela leitura da absorbância a 256 nm a cada 20 segundos durante 20 minutos. A velocidade da reação foi expressa em atividade específica, definida como nmol de tirosina produzida por minuto (U) por mg de proteínas (U mg⁻¹ proteína). O coeficiente de extinção molar utilizado para efetuar os cálculos foi 964 M⁻¹ cm⁻¹.

A presença de proteases ácidas foi detectada pela medida de sua atividade utilizando hemoglobina bovina (Sigma) como substrato. Para análise da atividade, alíquotas de 20 μ L do extrato enzimático foram incubadas com 250 μ L de hemoglobina 0,5 mg mL⁻¹ em tampão glicina 0,1M pH 2,0, durante 20 minutos a 37°C. Essa reação foi então paralisada pela adição de 250 μ L de TCA (ácido tricloroacético) 20 % (p/v) em água destilada. Os microtubos foram mantidos durante 15 minutos a 4°C (banho de gelo) e, posteriormente, centrifugados a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante foi coletada e analisada a 280 nm em leitor de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific) utilizando microplaca em acrílico com tratamento ultravioleta contendo 96 poços (CORNING Incorporated – USA).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e para cada amostra foi feito um branco que continha 20 μ L de extrato enzimático, 250 μ L de hemoglobina 0,5 mg mL⁻¹ e 250 μ L de TCA 20 % (p/v). A velocidade da reação foi expressa em atividade específica, definida como

μg de tirosina liberada por minuto por mg de proteínas solúveis totais a 37°C . O coeficiente de extinção molar utilizado para efetuar os cálculos foi de $0,008\text{ mL } \mu\text{g}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

As concentrações de proteína total foram determinadas pelo método de Bradford (1976). A quantificação das amostras foi realizada pela leitura da absorbância a 595 nm , utilizando como padrão soro albumina bovina (BSA).

5.3.7. Teste de estresse: exposição ao ar

Ao final do experimento, após 30 dias, 20 animais de cada tanque foram cuidadosamente estocados em recipientes contendo 2 L de água limpa na densidade de 10 animais por recipiente. Estes foram mantidos em sistema de banho termostaticado a 27°C e em jejum por 12 h.

Após o jejum, o volume de cada recipiente, juntamente com os animais, foi vertido em peneira de $0,5\text{ mm}$ de diâmetro, submersa em água para evitar injúrias devido ao contato direto com a malha da peneira. Em seguida, a peneira foi retirada da água, coberta com tela para evitar escape dos animais e colocada sobre papel secante para a retirada do excesso de umidade. A partir deste momento se iniciou a contagem dos tempos de exposição ao ar por 5 e 7 minutos (Luz et al., 2012), sendo utilizada 10 animais de cada tanque para cada tempo.

Após os respectivos tempos de exposição ao ar, cada peneira foi mergulhada novamente no recipiente de 2 L de água, para recolocação dos animais. Decorridas 24 horas, foi determinada a taxa de resistência ao estresse (Re, em %), medida em função da sobrevivência em porcentagem.

5.3.8. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade de Bartlett. As variáveis de desempenho foram submetidas à ANOVA e posterior teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de expressão gênica, atividade enzimática foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Os dados de sobrevivência do teste de estresse foram transformados em logaritmo e raiz quadrada, submetidos ao teste SNK a 5% de probabilidade. As análises foram feitas através do *Software SAS University Edition*, 2016.

5.4. Resultados

5.4.1. Desempenho

Após 30 dias de alimentação, a sobrevivência foi semelhante entre os tratamentos ($P > 0,05$) (tabela 3). O comprimento e o peso aos 10 dias foram inferiores ($P < 0,05$) para o tratamento com 30% PB. Aos 20 dias de experimento, o comprimento e o peso não apresentaram diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$). O peso aos 30 dias foi maior para as dietas de 30 e 42% de PB e inferiores para a dieta de 48% PB ($P < 0,05$). O comprimento aos 30 dias foi semelhante ($P > 0,05$) para as dietas contendo 30, 36 e 42% de PB e inferior ($P < 0,05$) para a dieta com 48% PB.

A TCE nos primeiros 10 dias de experimento apresentou maiores valores para 42%, intermediários para 36 e 48% PB e inferiores para 30% PB ($P < 0,05$). Entre o 11° e o 20° dia de experimento, a TCE foi superior nos níveis de 30 e 36% PB ($P < 0,05$). No último período da larvicultura, a TCE foi superior nos tratamentos de 30% PB e 42% PB, seguido do tratamento de 36% PB e 48% PB, respectivamente.

Tabela 3. Valores médios (\pm desvio padrão) de sobrevivência, comprimento, peso e taxa de crescimento específico diária (TCE) de larvas de tilápias alimentadas com diferentes níveis de proteína bruta na dieta durante 30 dias.

| Variável | Níveis de proteína bruta da dieta (%) | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 30 | 36 | 42 | 48 |
| Sobrevivência (%)* | 74,6 \pm 1,76 | 73,55 \pm 10,84 | 68,67 \pm 7,06 | 77,55 \pm 3,67 |
| Comprimento 10 dias (mm) | 16,62 \pm 2,51 ^b | 18,52 \pm 1,44 ^a | 17,82 \pm 1,77 ^{ab} | 18,14 \pm 2,21 ^a |
| Comprimento 20 dias (mm)* | 24,88 \pm 2,85 | 24,25 \pm 3,06 | 23,69 \pm 2,16 | 23,48 \pm 2,48 |
| Comprimento 30 dias (mm) | 31,36 \pm 0,50 ^a | 29,41 \pm 1,19 ^{ab} | 30,45 \pm 0,49 ^a | 27,47 \pm 0,90 ^b |
| Peso 10 dias (g) | 0,07 \pm 0,02 ^b | 0,08 \pm 0,02 ^{ab} | 0,09 \pm 0,03 ^a | 0,09 \pm 0,03 ^a |
| Peso 20 dias (g)* | 0,29 \pm 0,10 | 0,26 \pm 0,07 | 0,25 \pm 0,08 | 0,23 \pm 0,06 |
| Peso 30 dias (g) | 0,73 \pm 0,05 ^a | 0,56 \pm 0,07 ^b | 0,64 \pm 0,02 ^{ab} | 0,40 \pm 0,05 ^c |
| TCE 1-10 dias (% dia ⁻¹) | 20,74 \pm 0,98 ^b | 22,01 \pm 0,78 ^{ab} | 23,45 \pm 0,99 ^a | 23,00 \pm 2,79 ^{ab} |
| TCE 11-20 dias (% dia ⁻¹) | 13,65 \pm 2,12 ^a | 11,69 \pm 1,2 ^{ab} | 9,59 \pm 1,45 ^b | 9,51 \pm 1,93 ^b |
| TCE 21-30 dias (% dia ⁻¹) | 9,42 \pm 0,01 ^a | 7,57 \pm 0,25 ^b | 9,39 \pm 0,17 ^a | 5,33 \pm 0,12 ^c |

Letras diferentes em linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

* não significativo

5.4.2. Expressão Gênica

A expressão relativa de mRNA de tripsinogênio ($3,30 \pm 0,91$) e lipase ($14,35 \pm 4,75$) não apresentaram diferença estatística entre os níveis testados nos diferentes dias de coleta ($P > 0,05$).

Aos 10 dias de experimento a expressão relativa de mRNA de pepsinogênio apresentou maior valor no nível de 30%PB, intermediário para 42% PB e inferior para 36 e 48%PB ($P < 0,05$) (figura 1A). Para quimotripsinogênio (figura 1B), carboxipeptidase (figura 1C), CCK (figura 1D) e NPY (figura 1E) aos 10 dias de alimentação não foi detectada diferença estatística da expressão relativa de mRNA entre os níveis testados ($P > 0,05$). Para todas os genes testados, aos 20 dias de alimentação não foi verificada diferença estatística da expressão relativa de mRNA entre os níveis testados ($P > 0,05$) (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D e 1E). Aos 30 dias de alimentação, a expressão gênica de quimotripsinogênio (figura 1B), carboxipeptidase (figura 1C) e NPY (figura 1E) foi maior para o nível 42% PB, e inferior para os demais níveis ($P < 0,05$). No caso de CCK (figura 1D), a maior expressão relativa foi para o nível de 42% PB, intermediário para 48% PB e inferior para os demais tratamentos ($P < 0,05$).

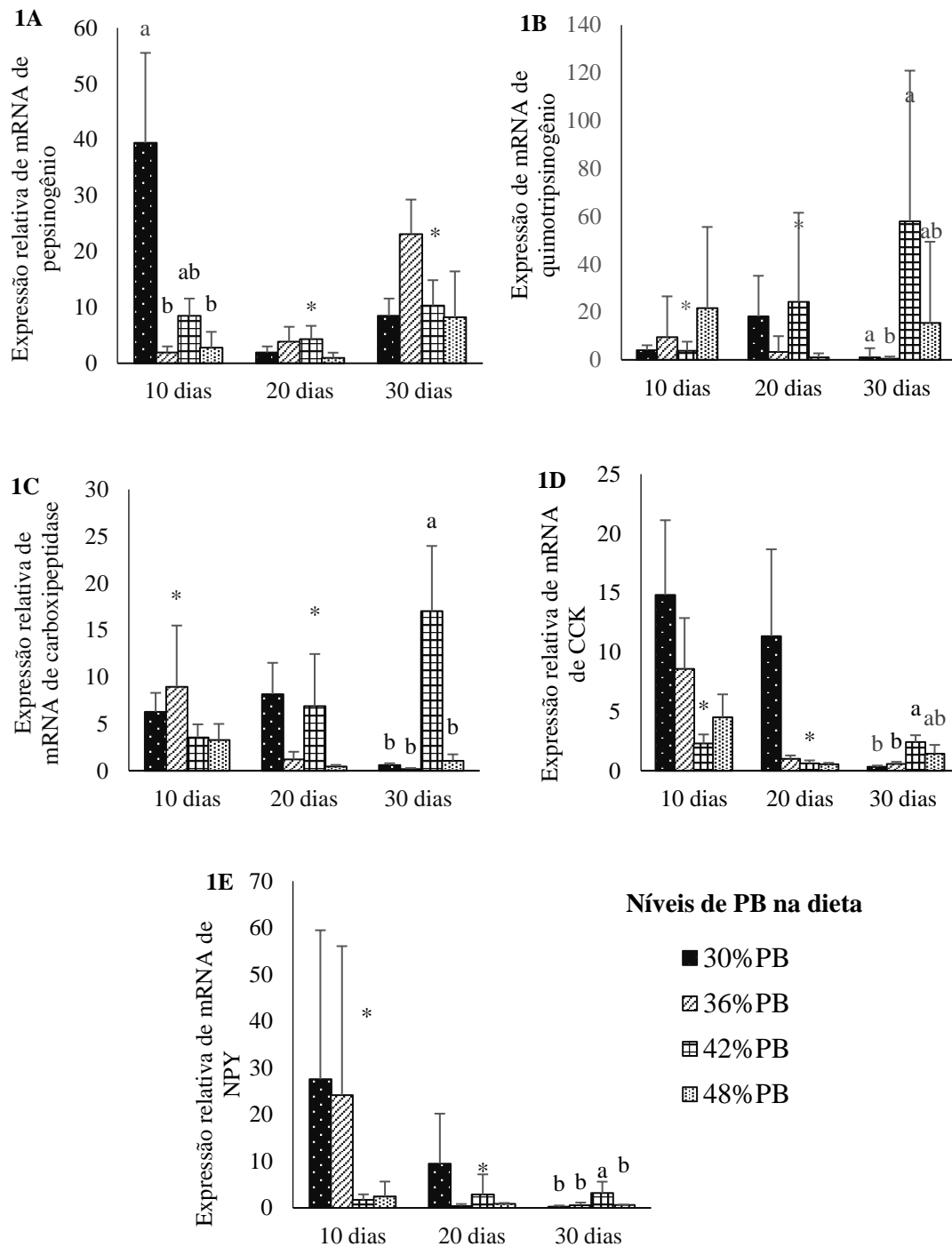


Figura 1. Médias (\pm erro padrão) das expressões relativas do mRNA para pepsinogênio (figura 1A), quimotripsinogênio (figura 1B), carboxipeptidase (figura 1C), CCK (figura 1D) e NPY (figura 1E) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta (PB) na dieta aos 10, 20 e 30 dias de experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). * não significativo.

5.4.3. Atividade Enzimática

A atividade específica da pepsina (figura 2A), tripsina (figura 2B) e quimotripsina (figura 2C) foram semelhantes para os diferentes níveis de proteína aos 10 e 20 dias de alimentação ($P > 0,05$).

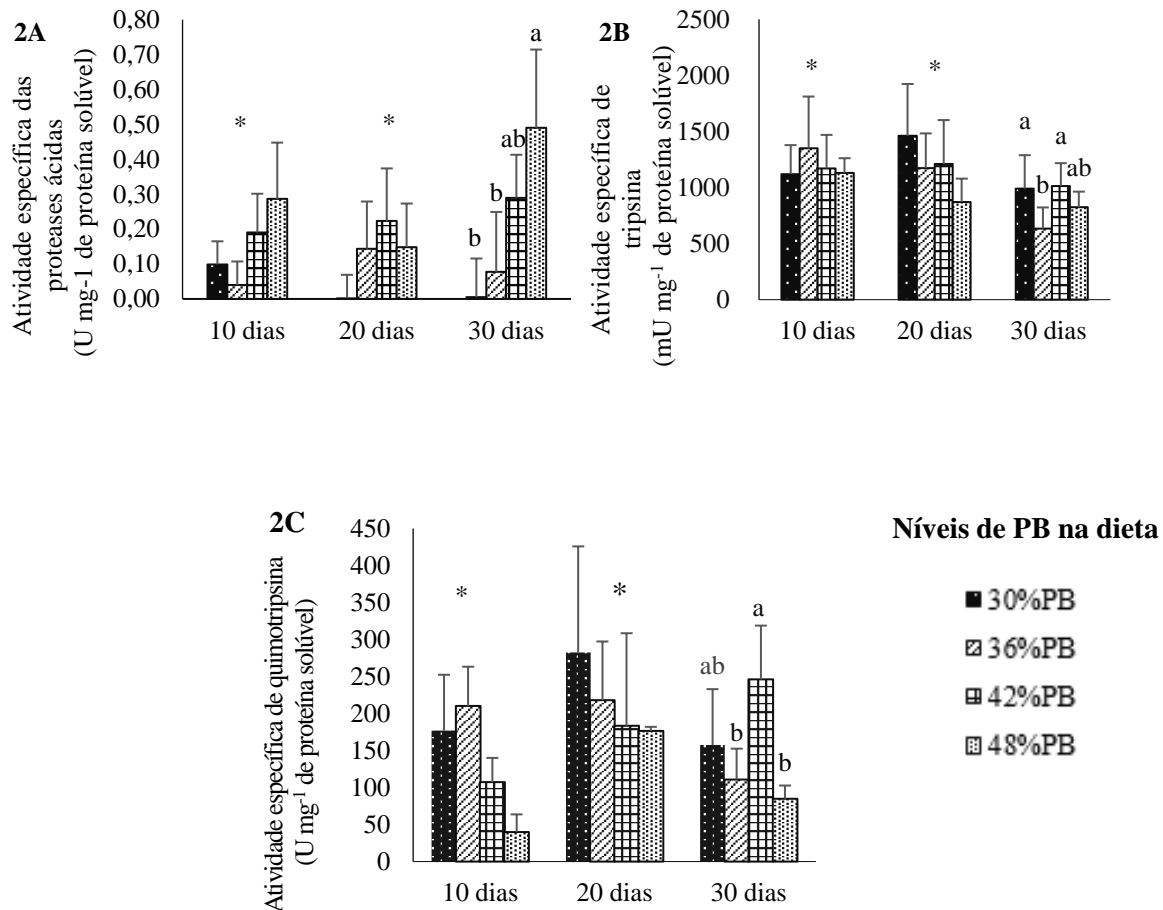


Figura 2. Médias (\pm desvio padrão) das atividades específicas de pepsina (U mg⁻¹ proteína solúvel) (figura 2A), tripsina (mU mg⁻¹ proteína solúvel) (figura 2B) e quimotripsina (U mg⁻¹ proteína solúvel) (figura 2C) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta (PB) na dieta aos 10, 20 e 30 dias de experimento. Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). * não significativo.

Aos 30 dias de experimento, a atividade da pepsina foi maior para o nível de 48% PB, intermediário para 42% e inferior para 30 e 36% PB ($P < 0,05$) (figura 2A). A atividade da tripsina foi maior nos níveis de 30 e 42% PB, intermediário para 48% e inferior para 36% PB ($P < 0,05$) (figura 2B). Já, a atividade da quimotripsina foi superior no nível de 42%PB, intermediário para 30% e inferiores para 36 e 42% PB ($P < 0,05$) (figura 2C).

5.4.4. Teste de estresse: exposição ao ar

Os tratamentos com os níveis de proteína não apresentaram diferenças estatísticas dentro de cada tempo em que foi submetido a resistência ao estresse (Re) (5 ou 7 minutos) (Tabela 4). Porém, quando comparamos a Re dentro do mesmo tratamento com distintos tempos de exposição ao ar, os animais alimentados com ração de 36% de PB não apresentaram diferenças significativa, já para os demais tratamentos a maior sobrevivência foi observada no menor tempo de exposição ao ar.

Tabela 4. Valores médios (\pm desvio padrão) de taxa de resistência ao estresse (Re) de larvas de tilápias alimentadas com níveis de proteína bruta na dieta submetidas a dois tempos de exposição ao ar após 30 dias de cultivo.

| Variável | Níveis de proteína bruta da dieta (%) | | | | |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Tempo (minutos) | 30 | 36 | 42 | 48 |
| Re (%) | 5 | 93,33 \pm 10,33 ^{Aa} | 76,67 \pm 23,38 ^{Aa} | 85,00 \pm 23,45 ^{Aa} | 93,33 \pm 10,33 ^{Aa} |
| Re (%) | 7 | 25,00 \pm 16,43 ^{Ba} | 51,67 \pm 36,00 ^{Aa} | 38,33 \pm 17,22 ^{Ba} | 38,33 \pm 17,22 ^{Ba} |

Letras diferentes (minúsculas em linha e maiúscula na coluna) indicam diferença estatística pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

5.5. Discussão

No presente estudo as dietas influenciaram as diferentes variáveis testadas. Os resultados de desempenho mostraram que na larvicultura de tilápia, dietas com níveis entre 36 e 48% PB proporcionam melhor desempenho nos primeiros 10 dias de alimentação. Hayashi et

al. (2002) verificaram que o desempenho na larvicultura de tilápia, nesta mesma fase teve seu ponto de máximo para 39% PD (~42% PB). Desta forma, fica evidente que o emprego de dietas com mais de 50% não se faz necessário nos primeiros dias de larvicultura desta espécie.

Aos 10 dias de larvicultura, a expressão gênica do pepsinogênio foi influenciada pela dieta, com maior expressão a 30% PB. Para os outros genes testados a expressão de mRNA não foi influenciada pelos níveis proteicos da dieta, assim como a atividade específica das enzimas digestivas. Segundo Douglas et al. (1999) a expressão do pepsinogênio está relacionada à formação das glândulas gástricas. Essas glândulas são responsáveis pela digestão proteica extracelular, substituindo processos menos eficientes de digestão de proteínas, como pinocitose e digestão intracelular (Segner et al., 1994). Huang et al. (1998) através de análises histomorfológicas detectaram que a expressão de pepsinogênio para *Paralichthys dentatus* está relacionada a formação destas glândulas e que estas são importantes para a conversão de pepsinogênio em pepsina. O fato da maior expressão do pepsinogênio acontecer nos 10 primeiros dias de alimentação, pode indicar o desenvolvimento dessas glândulas em tilápias, indicando uma fase de adaptação dos animais a dieta.

Aos 20 dias de alimentação, tanto o desempenho, como a expressão gênica e atividade enzimática não foram influenciadas pelos diferentes níveis proteicos na dieta. Este fato pode estar relacionado a esta ser uma fase adaptação dos animais as dietas (Takou, 1990). Além disso, os resultados indicam a possibilidade de emprego de dietas com menores níveis de proteína bruta. Isso se refletiu na TCE das larvas, quando na primeira fase (1 a 10 dias) as dietas com 30, 36, 48% PB tiveram as menores TCE e entre 11 a 20 dias as dietas de 30 e 36% PB levaram a maiores TCE, indicando recuperação do crescimento que se refletiu em desempenho igual entre todas as dietas neste período.

Após 30 dias, o desempenho (peso, comprimento e TCE) foi pior para 36% PB e para maior nível de proteína bruta na dieta. Este resultado mostra que este nível é prejudicial aos animais nesta fase entre 20 a 30 dias de larvicultura. Semelhante ao presente estudo, Hayashi et al. (2002) verificaram que 38,6% PD (42% PB) seria o nível ideal para melhor desempenho zootécnico após 28 dias de larvicultura. Abdel-Tawwab et al. (2010) obtiveram melhor desempenho com 45% PB ao longo de 30 dias de larvicultura. Nesta mesma linha, Luz et al. (2012) testaram dietas comerciais de tilápia e verificaram que 40% PB resultaram em maior peso e comprimento. Os mesmos autores verificaram que o nível de 55% PB resultou em pior desempenho e qualidade de água. Estes resultados corroboram os do presente estudo, em relação a importância do nível de proteína a ser utilizado na larvicultura de tilápia. Contudo, na larvicultura comercial ainda é utilizado o mesmo nível proteico ao longo dos 30 dias. Assim,

os resultados indicam que esta larvicultura poderia ser realizada em fases, empregando diferentes manejos nutricionais ao longo do desenvolvimento dos animais, o que pode gerar redução de custos com ração, uma vez que a proteína é o nutriente de maior valor nas dietas de peixes (Cho et al., 2005). Por esse motivo, o nível proteico na dieta deve ser balanceado para evitar gastos desnecessários (Ozório et al., 2006).

Aos 30 dias, a expressão relativa de quimotripsinogênio, tripsinogênio, carboxipeptidase, CCK e NPY e a atividade das enzimas digestivas foram influenciadas pelo nível proteico na dieta. Segundo Jones et al. (1997) a dieta influencia a expressão e atividade enzimática, principalmente no fim do estágio larval, na qual os animais já estão mais adaptados a dieta.

A maior atividade específica da pepsina aos 30 dias foi para os níveis de 42 e 48% PB testados. Este fato pode indicar que o excesso de proteína, que levou a pior desempenho e, exige da larva maior produção desta enzima para tentar atuar sobre o excesso de proteína. Nas espécies de água doce *Cyprinus carpio* (Farhoudi et al., 2013), híbridos de *Hypophthalmichthys nobilis* e *Hypophthalmichthys molitrix* (Chakrabarti et al., 2006) e *Cirrhinus mrigala* (Chakrabarti e Rathore, 2010) também registraram a atividade específica da pepsina na fase larval. A atividade desta enzima está associada ao desenvolvimento do pâncreas e do intestino e sugere a presença de estômago funcional (Douglas et al., 1999) estruturas que são importantes para o desenvolvimento das larvas e para a assimilação das dietas.

A atividade específica da tripsina também foi influenciada pela dieta aos 30 dias de alimentação. Segundo Garcia-Gasca et al. (2006) a expressão relativa do tripsinogênio já ocorre em larvas na fase vitelínica. Wang et al. (2006) relataram que o nível de proteína do alimento influencia na expressão de tripsinogênio em larvas de *Pelteobagrus fulvidraco*, corroborando os dados encontrados para a tilápia. Assim como para a tripsina, de acordo Chakrabarti et al. (2006) a atividade dessas enzimas pode estar relacionada com o desenvolvimento do sistema digestivo e deposição proteica muscular.

A expressão gênica de *quimotripsinogênio* e atividade específica da quimotripsina também foram influenciadas pelo nível proteico na dieta aos 30 dias de alimentação. A expressão de *quimotripsinogênio* foi superior para 42% PB, enquanto a maior atividade da quimotripsina foi para 30 e 42% PB. Em pós-larvas de *Diplodus puntazzo* a atividade da quimotripsina foi detectada no período larval e aumentou continuamente durante esta fase (Aktulun et al., 2008). Para larvas da espécie de peixe marinho *Atractoscion nobilis*, a atividade específica de quimotripsina também foi detectada no primeiro dia após a eclosão e aumentou gradualmente ao longo do tempo, com maior atividade após a primeira alimentação exógena

(Galaviz et al., 2011). Esses autores concluíram que os grânulos de zimogênio (precursor das enzimas pancreáticas) já estão presentes um dia antes da alimentação exógena e aumentam de acordo com o desenvolvimento do animal. Desta forma, a dieta tem importante influência na atividade desta enzima.

A expressão gênica das carboxipeptidases foi maior para o nível de 42% PB aos 30 dias de alimentação. Este resultado coincide com a expressão gênica obtida para NPY e quimotripsinogênio testados no presente trabalho. As carboxipeptidases são importantes para o desenvolvimento animal e são responsáveis pela digestão de alimentos exógenos (Galvão et al., 1997).

O NPY e CCK tiveram maior expressão aos 30 dias de larvicultura para 42 e 48% PB. O NPY é um regulador neuroendócrino do hormônio do crescimento (GH) e estimula o consumo de alimento em vertebrados (Volkoff et al., 2009). Segundo Narnaware e Peter (2002) a expressão NPY é influenciada pela composição da dieta como registrado no presente estudo. Já o CCK é um peptídeo de importância no controle da secreção das enzimas pancreáticas (Rønnestad et al., 2013), coincidindo, de maneira geral, com maior atividade enzimática e expressão gênica verificada para tilápia a 42%PB no presente estudo. Hama et al. (2009) em um estudo *in vivo* com a espécie *Danio rerio* mostraram que a digestão de proteína e lipídeos combinado com inibidores de CCK indicam a importância desse peptídeo na regulação da digestão.

Ao contrário do registrado para a expressão gênica e atividade enzimática de tilápia, aos 30 dias, a expressão gênica de lipase não foi influenciada pelas dietas. Para *Cyprinus carpio* a expressão da lipase já foi detectada no primeiro dia de alimentação exógena (Farhoudi et al., 2013), assim como no presente estudo a partir do décimo dia de alimentação. A expressão dessa enzima é importante, pois sugere digestão dos lipídios, disponibilizando energia não proteica (Nunes et al., 2006). Segundo Chakrabarti e Rathore (2010) a atividade da lipase aumenta durante todo período larval e está relacionada ao desenvolvimento das glândulas pancreáticas.

Apesar dos efeitos negativos da dieta com maior nível de proteína bruta no desempenho dos animais, após 30 dias, a sobrevivência foi semelhante entre os tratamentos. Luz et al. (2012) obtiveram maior sobrevivência em larvas de tilápia, no nível de 32% PB, enquanto os piores resultados foram para os demais níveis testados (40 e 55% PB), após 30 dias. Resultados parecidos foram relatados por Hayashi et al. (2002). Os autores verificaram que a sobrevivência apresentou relação inversamente proporcional ao aumento de proteína na dieta. O nível com maior sobrevivência foi o de 30% PD (32,7% PB) e o menor com 46% PD (50% PB). Assim,

os dados apresentados mostram que baixos níveis de proteína na dieta podem proporcionar sobrevivência superior ou similar a níveis maiores.

Assim como para a sobrevivência, a Re também foi semelhante entre os tratamentos. Porém, considerando o tempo de exposição ao ar, a dieta de 36% PB levou a Re semelhante entre 5 e 7 minutos, enquanto nas demais dietas, a Re diminuiu aos 7 minutos comparado a 5 minutos. Este resultado sugere que animais alimentados com 36% PB teriam maior resistência a situações mais drásticas de estresse. Luz et al. (2012) reportaram que tilápias submetidas a dois tempos de exposição ao ar (7 e 10 minutos) tiveram menor Re quando alimentadas com dietas contendo 55% de PB. Assim, os resultados da literatura e do presente estudo reafirmam que o teste de estresse se mostra eficaz para a determinação da qualidade de larvas e juvenis alimentados com níveis de proteína bruta.

5.6. Conclusões

Os resultados mostraram que o melhor nível de proteína bruta varia de acordo com o período da larvicultura, podendo ser recomendado entre 36 e 48% PB do primeiro ao décimo dia, qualquer dos níveis testados entre o décimo primeiro e vigésimo dia e entre 30 e 42% PB do vigésimo primeiro ao trigésimo dia. Além disso, as atividades de expressão gênica e enzimática apresentaram variações entre as dietas e ao longo do desenvolvimento dos animais.

5.7. Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Processo CNPq 401117/2014-6 e Bolsa PQ CNPq-305048/2015-5), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - PPM-00250-15) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo. Aos professores do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, em especial à Professora Dra. Priscila Vieira Rosa por ceder os Laboratórios de Enzimologia e Biologia Molecular para a execução das análises de expressão gênica e atividade enzimática.

5.8. Referências

- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Sakr, S.F.M., Seden, M.E.A., 2010. Use of green tea, *Camellia sinensis* L. in practical diet for growth and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) against *Aeromonas hydrophila* infection. J. World Aquacult. Soc. 41, 203–213.
- Aktulun, S., Suzer, C., Kamaci, H.O., Coban, D., Saka, S., Kursat Fira, K., 2008. Activity of the digestive protease, chymotrypsin, in larvae of the cultured sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae. Isr. J. Aquacult-Bamid. 60, 82–88.
- Al Hafedh, Y.S., 1999. Effects of dietary protein on growth and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquac. Res. 30, 385–393.
- A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists), 2016. Official methods of analysis. 20th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.
- Boscolo, W.R., Hayashi, C., Meurer, F., 2002. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Rev. Bras. Zootecn. 31, 539–545.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248.
- Cara, B., Moyano, F.J., Zambonino-Infante, J.L., Fauvel, C., 2007. Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. J. Fish Biol. 70, 1798–1808.
- Chakrabarti, R., Rathore, R.M., Mittal, P., Kumar, S., 2006. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. Aquaculture 253, 694–702.
- Chakrabarti, R., Rathore, R.M., 2010. Ontogenic Changes in the Digestive Enzyme Patterns and Characterization of Proteases in Indian Major Carp *Cirrhinus mrigala*. Aquac. Nutr. 16, 569–581.

Chen, B.N., Jian, G.Q., Martin, S.K., Wayne, G.H., Steven, M.C., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 264–271.

Cho, S.H.; Lee, S.M.; Lee, S.M.; Lee, J.H., 2005. Effect of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared under optimum salinity and temperature conditions. *Aquacult. Nutr.* 11, 235-240.

Darias, M.J.; Murray, H.M.; Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., 2007. Ontogeny of pepsinogen and proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. *Aquaculture* 270, 369–378.

Diógenes, A.F., Diógenes, A.F., Fernandes, J.B.K., Dorigam, J.C.P., Sakomura, N.K., Rodrigues, F.H.F., Lima, B.T.M., Gonçalves, F.H., 2016. Establishing the optimal essential amino acids ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method. *Aquacult. Nutr.* 22, 435–443.

Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandla, S., Gallant, J.W., 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish Biol.* 55, 897 – 915.

El-Sayed, A.F.M., 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia *Oreochromis* spp. *Aquaculture* 179, 149–168.

Farhoudi, A., Abedian Kenari, A., Nazari, R., Makhdoomi, C.H., 2013. Changes of digestive enzymes activity in common carp (*Cyprinus carpio*) during larval ontogeny. *Iran. J. Fish Sci.* 12, 320–334.

Galaviz, M. A.; García-Gasca, A.; Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López. L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318, 162–168.

Galvão, M.S.N., Yamanaka, N., Fenerich-Verani, N., Pimentel, C.M.M., 1997. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Gunter, 1980 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. Bol. Inst. Pesca. 24, 101–110.

García-Gasca, A., Galaviz, M.A., Gutiérrez, J.N., García-Ortega, A., 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. Aquaculture 251, 366–376.

Gilbert, E.R., Wong, E.A., Webb, K.E., 2008. Board-invited review: peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. J. Anim. Sci. 86, 2135–2155.

Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estevéz, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture 287, 381–387.

Hayashi, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M. Meurer, F., 2002. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. Rev. Bras. Zootecn. 31, 823–828.

Hama, K., Provost, E., Baranowski, T.C., Rubinstein, A.L., Anderson, J.L., Leach, S.D., Farber, S.A., 2009. In vivo imaging of zebrafish digestive organ function using multiple quenched fluorescent reporters. Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol. 296, 445–453.

Huang, L., Schreiber, A.M., Soffientino, B., Bengtson, D.A., Specker, J.L., 1998. Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): thyroid status and the timing of gastric gland formation. J. Exp. Zool. 280, 413 – 420.

Jones, D.A., Kumlu, M., Le Vay, L., Fletcher, D.J., 1997. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquaculture 155, 289–299.

Luz, R.K., Portella, M.C., 2005. Tolerance to the air exposition test of *Hoplias lacerdae* larvae and juvenile during its initial development. Braz. Arch. Biol. Techn. 48, 567–573.

Luz, R.K., 2007. Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentados com diferentes dietas. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42, 65–72.

Luz, R.K., Ribeiro, P.A.P., Ikeda, A.L., Santos, A.E.H., Melillo Filho, R., Turra, E.M., Teixeira, E.A., 2012. Performance and stress resistance of Nile tilapias fed different crude protein levels. *Rev. Bras. Zootecn.* 41, 457–461.

Murashita, K., Fukada, H., Takahashi, N., Hosomi, N., Matsunari, H., Furuita, H., Oku, H., Yamamoto, T., 2015. Effect of feed ingredients on digestive enzyme secretion in fish. *Bull. Fish. Res. Agen.* 40, 69–74.

Meurer, F., Hayashi, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M., 2002. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Rev. Bras. Zootecn.* 31, 566–573.

Morais, S., Conceição, L.E.C., Rønnestad, I. Koven, W., Chantal, C., Zambonino, J.L., Dinis, M., 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture* 268, 106–122.

Narnaware, Y.K., Peter, R.E., 2002. Influence of diet composition on food intake and *neuropeptide Y (NPY)* gene expression in goldfish brain. *Regulatory Pept.* 103, 75–83.

Nunes, E.S.S., Cavero, B.A.S., Pereira-Filho, M., 2006. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. *Pesq. Agropec. Bras.* 41, 139–143.

Ozorio, R.O.A., Valente, L.M.P., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2006. Growth performance and body composition of white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets with different protein and lipid levels. *Aquac. Res.* 37, 255–263.

Péres, A., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 145–152.

Popma, T.J., Lovshin, L. World wide prospects for commercial production of Tilapia., 1996. Int. Center for Aquaculture and Aquatic Environments. 41, 23p.

Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø., Boglione, C., 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. Rev. Aquac. 5, 59–98.

Rozen, S., Skaletsky, H., 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Bioinformatics Methods and Protocols, Cambridge, 132, 365–386.

Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Biol. 119, 471 – 486.

Santos, J.C.E. dos, Luz, R.K., 2009. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. Aquaculture. 287, 324–328.

Stiassny M. L. J., 1991 Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview, pp. 1–35 in Cichlid Fishes: Behavior, Ecology and Evolution, edited by Keenleyside M.H.A Chapman & Hall, London.

Takon, A. G. J., 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. U.S.A. Argent laboratories press, Vol., 1 The essential nutrient.

Trushenski, J., Schwarz, M., Takeuchi, R., Delbos, B., Sampaio, L.A., 2010. Physiological responses of cobia *Rachycentron canadum* following exposure to low water and air exposure stress challenges. Aquaculture 307, 173–177.

Volkoff, H., Unniappan, S., Kelly, S. P., 2009. The endocrine regulation of food intake. Fish Neuroendocrinol. 28, 421–465.

Wang, C., Shouqi, X., Xiaoming, Z., Leia, W., Yanga, Y., Liua, J., 2006. Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture* 254, 554–562.

Yang, C. G., Wang, X.L., Tian. J., Liu. W., Wu, F., Jiang M., Wen, H., 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RTPCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene* 527, 183–192, 2013.

Yúfera, M. Darias, M.J., 2007. The onset of feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268, 53–63.

Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., Sarasquete, S., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Ed). *Feeding and Digestive Functions in Fishes*, Science Publishers, Enfield, NH. 281–348.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, as dietas comerciais disponíveis para a larvicultura de tilápia têm entre 50 a 55% de proteína bruta. Contudo, o presente estudo comprova que altos níveis de proteína bruta na dieta não são necessários em condições de laboratório, sendo assim importante teste em condições de campo. Outro fator importante seria a possibilidade de adotar um manejo nutricional diferenciado ao longo dos 30 dias de larvicultura, de acordo com as exigências nutricionais dos animais, fato que poderia acarretar em economia em relação aos custos com ração.

Além disso, as técnicas de avaliação da expressão gênica, atividade enzimática e testes de resistência ao estresse em larvas de tilápia podem ser utilizadas como referência complementar para a avaliação da qualidade dos animais assim como para avaliar o nível adequado de proteína bruta na dieta.

A influência da dieta sobre a expressão gênica e atividade enzimática na larvicultura de tilápia realizada neste estudo é inédita, contribuindo para o melhor entendimento de questões nutricionais nesta fase, considerada crítica na produção de peixes.