

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Dissertação de Mestrado

**Restrição Alimentar e Realimentação na Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): efeitos sobre o tecido hepático, parâmetros fisiológicos e bioquímicos do sangue**

Francisco de Souza Faria

Belo Horizonte  
2022

Francisco de Souza Faria

**Restrição Alimentar e Realimentação na Tilápia do Nilo(*Oreochromis niloticus*): efeitos sobre o tecido hepático, parâmetros fisiológicos e bioquímicos do sangue**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção de título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Rizzo.

Coorientadora: Dra. Camila Ferreira Sales

Belo Horizonte  
2022

043

Faria, Francisco de Souza.

Restrição alimentar e realimentação na Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): efeitos sobre o tecido hepático, parâmetros fisiológicos e bioquímicos do sangue [manuscrito] / Francisco de Souza Faria. – 2022.

62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Rizzo. Coorientadora: Dra. Camila Ferreira Sales.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Autofagia. 3. Apoptose. 4. Ciclídeos. 5. Fígado/patologia. 6. Jejum. I. Bazzoli, Elizete Rizzo. II. Sales, Camila Ferreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

## ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FRANCISCO DE SOUZA FARIA

**2º/2019 2019721117**

Às treze horas e trinta minutos do dia 31 de janeiro de 2022, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "RESTRIÇÃO ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO NA TILÁPIA DO NILO, OREOCHROMIS NILOTICUS: EFEITOS SOBRE O TECIDO HEPÁTICO, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO SANGUE", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Elizete Rizzo Bazzoli, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq.                                 | Instituição | Indicação |
|---------------------------------------------|-------------|-----------|
| Dra. Elizete Rizzo Bazzoli                  | UFMG        | Aprovado  |
| Dra. Camila Ferreira Sales                  | UFMG        | Aprovado  |
| Dra. Gisele Cristina Favero                 | UFMG        | Aprovado  |
| Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda | UFMG        | Aprovado  |

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2022.**

Dr<sup>a</sup>. Elizete Rizzo Bazzoli

Dra. Camila Ferreira Sales (Coorientadora)

Dr<sup>a</sup>. Gisele Cristina Favero

Dr<sup>a</sup>. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda, Professora do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Cristina Favero, Professora do Magistério Superior**, em 01/02/2022, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elizete Rizzo Bazzoli, Coordenador(a)**, em 01/02/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Ferreira Sales, Colaborador(a) terceirizado(a)**, em 02/02/2022, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 03/02/2022, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1226367** eo código CRC **322ED91A**.

Referência: Processo nº 23072.205925/2022-11  
1226367

SEI nº

Este trabalho foi realizado no laboratório de Ictiohistologia (Labictio) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com a colaboração do Laboratório de Aquacultura (LAQUA), da Escola de Medicina Veterinária da UFMG.

Suporte financeiro:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Aos meus pais, Francisco Valente de Faria  
(In memoriam) e Helena Ferreira de  
Souza Faria. Obrigado por tanto.*

*A ciência não é a vida, mas é a bússola da vida.*

*Mikhail Bakunin*



## Resumo

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram mecanismos para monitorar e responder às flutuações na abundância de nutrientes. Nos vertebrados, durante o jejum, ocorrem mudanças na utilização de compostos energéticos com adaptações metabólicas que envolvem regulação das principais vias do metabolismo intermediário, particularmente no fígado. No nível celular, um redirecionamento do metabolismo para aumento do catabolismo e diminuição do anabolismo por meio da fosforilação de proteínas-chave em várias vias celulares, incluindo homeostase lipídica, glicólise/glicogenólise e autofagia operam para manter níveis de ATP para o metabolismo basal. Neste estudo, foi utilizada uma abordagem multiparamétrica que incluiu a avaliação de índices biológicos (fator de condição e índice hepatossomático), metabólitos plasmáticos (glicose, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, alanina transaminase e aspartato transaminase), ocorrência de autofagia e apoptose, histologia e ultraestrutura do fígado, para avaliar a resposta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à condição de restrição alimentar total em diferentes tempos (7, 14, 21 e 28 dias) e realimentação (ciclos de restrição alimentar e realimentação). Os resultados dos biomarcadores morfométricos indicaram diminuição do índice hepatossomático para o grupo de restrição alimentar total e recuperação completa para os grupos de realimentação. O jejum causou ainda uma queda precoce e significativa nos níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol enquanto os grupos submetidos a realimentação apresentaram uma recuperação rápida e completa da glicemia, mas os triglicerídeos e o colesterol não voltaram aos níveis do grupo controle com 7 dias de realimentação. A análise histopatológica mostrou que a partir de 7 dias há ocorrência de esteatose limitada a pequenas áreas, aumentando progressivamente até atingir grande parte do fígado aos 28 dias. Infiltrado inflamatório e necrose também foram observados aos 14 dias, tornando-se alterações mais frequentes aos 28 dias. Os níveis hepáticos de glicogênio, foram depletados no início do jejum, mas retomaram a valores similares ao grupo controle após realimentação. A lipoperoxidação aumentou com a progressão do jejum, provavelmente sendo parcialmente responsável por dano hepático. As proteínas da autofagia apresentaram queda significativa com 21 e 28 dias de jejum. Além disso, foi observado aumento da apoptose nos grupos de inanição, particularmente nos tempos 21 e 28 dias de restrição alimentar total. Análises ultraestruturais do fígado mostraram a ocorrência de estruturas autofágicas além do esgotamento de glicogênio, desenvolvimento de esteatose e outras degenerações celulares, especialmente no grupo submetido a 28 dias de jejum contínuo. Assim, a restrição alimentar pode levar a danos hepáticos progressivos na tilápia do Nilo após 7 dias de jejum. Dois ciclos

de realimentação, no entanto, são capazes de recuperar a maior parte das reservas depletadas durante o jejum nos tempos avaliados, além de mitigar os efeitos deletérios do jejum extenso.

Palavras-chave: Autofagia. Apoptose. Histopatologia hepática. Tilápia do Nilo. Jejum. Realimentação.

## Abstract

Throughout evolution, organisms developed mechanisms to monitor and respond to fluctuations in nutrient supply. In vertebrates, during fasting, changes in the use of energy fuels mark metabolic adaptations that involve the main pathways of intermediary metabolism, particularly in the liver. At the cellular level, a redirection of metabolism to increased catabolism and decreased anabolism through phosphorylation of key proteins in several cellular pathways, including lipid homeostasis, glycolysis/glycogenolysis and autophagy operates to maintain ATP levels for basal metabolism. In this study, a multiparametric approach was used that included the assessment of morphological biomarkers (condition factor and hepatosomatic index), plasma metabolites (glucose, triglycerides, cholesterol, total proteins, alanine transaminase and aspartate transaminase), autophagy and apoptosis, histology and liver ultrastructure, to assess the response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to the condition of total food restriction at different times (7, 14, 21 and 28 days) and refeeding (food restriction and refeeding cycles). The results of morphometric biomarkers indicated a decrease in the hepatosomatic index for the total food restriction group and complete recovery for the refeeding groups. Starvation also caused an early drop and decrease in glucose, triglyceride, and cholesterol plasma levels. In the groups refeeding, a quick and complete recovery of blood glucose, but triglycerides and cholesterol have not returned to the levels of the control group within 7 days of refeeding. A histopathological analysis showed an occurrence of steatosis limited to small areas after 7 days, progressively increasing until reaching a large part of the liver at 28 days of starvation. Inflammatory infiltrate and necrosis were also observed at 14 days, becoming the more frequent change at 28 days. Hepatic glycogen levels were depleted at the beginning of starvation but returned to similar values to the control group after refeeding. Lipoperoxidation increased with a progression of starvation, probably being partially responsible for liver damage. Autophagy proteins (beclin1 and LC3-II) reveal a drop in autophagy at 21 and 28 days of starvation. The hepatic dynamics of apoptotic death pointed to an increase in apoptosis in the starvation groups, particularly at times 21 and 28 days of total food restriction. Ultrastructural analysis evidenced the occurrence of autophagic structures in addition to glycogen depletion, occurrence of steatosis and other cellular degenerations, especially in the group submitted to 28 days of starvation. Thus, dietary restriction can lead to progressive liver damage in Nile tilapia after 7 days of starvation. However, two refeeding cycles can recover most of the depleted energy stocks in addition to mitigating the deleterious effects of extended period of starvation.

**Keywords:** Starvation. Apoptosis. Autophagy. Liver. Histopathology. Nile tilapia. Refeeding.

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIações**

AF - autofagossomo

AL - autolisossomo

ALT – alanina transaminase

AMPK - proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina

AST – aspartato transaminase

ATG – gene relacionado a autofagia

ATP – adenosina trifosfato

Bax – proteína x associada a beclin-2

BCL-2 – beclin-2

BH3 - agonista da morte com domínio de interação BH3

BSA - albumina de soro bovino

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

CM – corpos multilamelares

CMM – centro melanomacrofágico

COBEA - Comissão Brasileira de Experimentação Animal

CT – comprimeto total

E2F - proteína do retinoblastoma

GIFT – tilápia de cultivo geneticamente melhorada

GL – gotas lipídicas

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

HSC70 – proteína cognata do choque térmico

HTC - hematócrito

IHS – índice hepatossomático

K – fator de condição de Fulton

KFERQ - sequência de aminoácidos Lisina- Fenilalanina- ácido glutâmico- arginina- glicina.

KOH – hidróxido de potássio

LAMP2A - proteína 2 de membrana associada ao lisossomo

LAQUA – Laboratório de Aquacultura da Escola de Medicina Veterinária da UFMG

LC3 I - Cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos I

LC3 II - Cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos II

LP – *lipid droplets* \* gotículas lipídicas  
MDA - malondialdeído  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NaOH – hidróxido de sódio  
NF- $\kappa$ B- fator nuclear kappa B  
*O. niloticus* – *Oreochromis niloticus*  
PBS – salina tamponada por fosfato  
PC – peso corporal  
PF – peso do fígado  
PPT – proteínas plasmáticas totais  
PtdIns3K - fosfatidilinositol 3-fosfato  
SNAREs - proteínas solúveis adaptadoras de fusão vesicular  
TBA- ácido tiobarbitúrico  
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA – ácido tricloroacético  
TG - triglicerídeos  
TOR- alvo mecânico da rapamicina  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
VPS30 – proteína ortóloga a beclin-1 em levedura

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Perfis de variáveis metabólicas durante as três fases do jejum (valores relativos e ilustrativos). (Adaptado de Secor, 2016) .....                                                                     | 20 |
| <b>Figura 2:</b> A tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) (figura superior). Da esquerda para direita, destaque para macho e fêmea da espécie, respectivamente (figura inferior) .....                        | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Desenho esquemático resumido da autofagia (adaptado de Klyonsky, 2007). .....                                                                                                                          | 27 |
| <b>Figura 4:</b> As duas principais vias apoptóticas: A via extrínseca (caminho da esquerda da figura) e a via intrínseca ou mitocondrial (caminho da direita). Figura original de Hengartner (2000).....               | 28 |
| <b>Figura 5:</b> Distribuição do fator de condição (K) e índice hepatossomático (IHS) para <i>O. niloticus</i> nos diferentes grupos de estudo .....                                                                    | 36 |
| <b>Figura 6:</b> Metabólitos sanguíneos (glicose, proteínas plasmáticas totais, triglicerídeos, colesterol, aspartato transaminase, alanina transaminase) para <i>O. niloticus</i> nos diferentes grupos de estudo..... | 37 |
| <b>Figura 7:</b> Metabólitos hepáticos: Glicogênio e MDA (peroxidação lipídica) para <i>O. niloticus</i> nos diferentes grupos de estudo .....                                                                          | 38 |
| <b>Figura 8.</b> Histologia e ultraestrutura hepática para <i>O. niloticus</i> nos diferentes grupos de estudo.....                                                                                                     | 40 |
| <b>Figura 9:</b> Quantificação das proteínas da via autofágica: LC3II e Beclin-1 e da via apoptótica: Bax, para <i>O. niloticus</i> nos diferentes grupos de estudo .....                                               | 42 |
| <b>Figura 10 -</b> Secções ultraestruturais e imunohistoquímicas do fígado de <i>O. niloticus</i> . nos diferentes grupos de estudo .....                                                                               | 43 |
| <b>Tabela 1:</b> Proporção (%) de núcleos, capilares sanguíneos, esteatose e citoplasma para o tecido hepático da tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , nos diferentes grupos de estudo.....                  | 41 |

## SUMÁRIO

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>                                   | <b>17</b> |
| 1.1 – Jejum na natureza .....                                 | 17        |
| 1.2 – Jejum em peixes.....                                    | 20        |
| 1.3 – A tilápia do Nilo ( <i>Oreochomis niloticus</i> ) ..... | 21        |
| 1.4 – O fígado durante o jejum.....                           | 23        |
| 1.5 – Autofagia .....                                         | 25        |
| 1.6 – Apoptose.....                                           | 27        |
| 1.7 – Inter-relação das vias autofágica e apoptótica.....     | 28        |
| 1.8 – Justificativa .....                                     | 29        |
| <b>2 - OBJETIVOS .....</b>                                    | <b>30</b> |
| 2.1 - Objetivo geral.....                                     | 30        |
| 2.2 - Objetivos específicos.....                              | 30        |
| <b>3 - METODOLOGIA.....</b>                                   | <b>30</b> |
| 3.1 - Ensaio experimental e amostragens .....                 | 31        |
| 3.2 - Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....             | 31        |
| 3.3 - Microscopia de luz e eletrônica.....                    | 32        |
| 3.4 – Morfometria do tecido hepático.....                     | 32        |
| 3.5 – Quantificação do glicogênio hepático.....               | 33        |
| 3.6 – Lipoperoxidação hepática.....                           | 33        |
| 3.7 -Western blotting.....                                    | 34        |
| 3.8 – Imunohistoquímica.....                                  | 34        |
| 3.9 – Análises estatísticas .....                             | 35        |
| <b>4 - RESULTADOS.....</b>                                    | <b>35</b> |
| 4.1 - Índices biológicos dos peixes.....                      | 35        |
| 4.2 – Parâmetros bioquímicos e metabólitos do sangue.....     | 36        |
| 4.3 – Parâmetros da fisiologia hepática.....                  | 38        |
| 4.4 – Histologia e ultraestrutura .....                       | 38        |
| 4.5- Morfometria.....                                         | 41        |
| 4.6 – Autofagia e apoptose.....                               | 41        |
| <b>5 -DISCUSSÃO .....</b>                                     | <b>44</b> |
| <b>6 –CONCLUSÕES.....</b>                                     | <b>52</b> |



|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| <b>7 –PERSPECTIVAS DE ESTUDO.....</b> | <b>53</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>               | <b>53</b> |

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Jejum na Natureza

Raramente na natureza os animais experimentam condições ambientais ótimas. Durante a maior parte do tempo, eles têm de lidar com estressores naturais como predadores, patógenos, temperaturas extremas e a indisponibilidade de alimento (Holmstrup, 2010). Períodos de escassez ou ausência total de nutrientes foram experimentados pelos primeiros metazoários e tem agido, desde então, como uma força motriz evolutiva que resultou em diversos níveis de resistência ao jejum (McCue, 2012a). Essa resiliência para lidar com a oscilação na oferta de recursos nutricionais, advém da capacidade dos organismos de monitorar e responder a variações no fluxo de ingestão e na quantidade de reservas endógenas de nutrientes (Chantranupong *et al.*, 2015, Efeyan *et al.*, 2015). De fato, os grupos de animais modernos, representam os táxons que transpuseram eventos de extinção em massa que, invariavelmente, incluíam episódios de diminuição drástica na oferta de nutrientes (McCue, 2012b). No entanto, a despeito de terem desenvolvido estratégias adaptativas para lidar com o estresse nutricional, a flutuação na oferta e qualidade dos recursos nutricionais pode impor períodos de inanição severos reduzindo o potencial reprodutivo, o desenvolvimento e a sobrevivência dos organismos (Wang, 2006).

Uma distinção útil para o estudo do jejum na natureza é a separação de períodos de jejum intermitente e jejum prolongado (do inglês “fasting” e “starvation”, respectivamente). Um denominador comum do jejum intermitente é a manifestação de um conjunto integrado de mecanismos comportamentais, morfológicos, fisiológicos e metabólicos inatos dos organismos que alocam tempo e energia em outras atividades que não a busca e ingestão de alimentos como durante a ecdise, migração e vários comportamentos relacionados à reprodução como defesa de território, construção de ninho, incubação e procura por parceiro sexual (McCue, 2010). O jejum intermitente pode ocorrer ainda devido a fatores abióticos, como baixas temperaturas (hibernação, torpor), altas temperaturas e estiagens (torpor de verão e estivação) (Secor e Lignot, 2009). Em comum, essas atividades geralmente ocorrem de maneira regular com bases sazonais ou em um estágio específico do desenvolvimento do animal e refletem a história natural da espécie (King e Murphy, 1985). O jejum prolongado, por sua vez, é uma situação onde o organismo, apesar de estar apto e disposto a se alimentar, não o faz por limitações extrínsecas na disponibilidade de alimento e sua extensão pode resultar na perda patológica da homeostase devido a alterações que comprometem o

funcionamento normal de órgãos (Lignot e LeMaho, 2012). O limite em que o estado de jejum natural se torna jejum prolongado não é claro e varia entre as espécies. Animais que apresentam ingestão frequente de alimentos durante todo seu ciclo de vida podem possuir menor resistência ao jejum prolongado, por não contar com parte dos mecanismos inatos daqueles que passam por diversos episódios de jejum durante a vida (Le Maho e Cherel, 1987). Essas habilidades são comuns às espécies ditas especializadas em jejum e incluem uma notável capacidade de acumular/excretar resíduos metabólicos ( $\text{CO}_2$ , uréia/amônia/ácido úrico) além da preservação eficiente de proteínas e um distinto controle dos corpos cetônicos que não se acumulam a níveis que possam induzir uma acidose metabólica (Secor e Carey, 2016). A rápida recuperação dos estoques de glicogênio, lipídeos e proteínas utilizadas durante o jejum também é uma marca dos animais especializados em jejum. No entanto, mesmo as espécies que possuem mecanismos para transpor longos períodos de jejum, podem sucumbir à fome quando situações atípicas atuam para estender o jejum além da sua capacidade de manter a homeostase somente com reservas endógenas (Castellini e Rea, 1992). Estas situações podem ocorrer em invernos muito rigorosos, estiagens anormalmente longas, declínio na população de presas ou mesmo devido a intervenções humanas que impactam a rede trófica incluindo os eventos recentes relacionados às mudanças climáticas.

Para superar e se recuperar de longos períodos de indisponibilidade de alimentos, os animais podem empregar diversas estratégias. A nível comportamental, pode-se evitar a fome migrando para habitats onde os alimentos não são limitantes ou ainda reduzir a atividade com vistas a economia energética (Furné e Sanz, 2017). Mecanismos fisiológicos e bioquímicos também operam para manter a homeostase durante períodos de fome. As estratégias empregadas incluem, mas não estão limitadas a: (1) promover o acúmulo de grandes quantidades de macromoléculas que servem como substrato energético (principalmente gordura) em períodos de não escassez de nutrientes e (2) otimizar o uso dos combustíveis energéticos (isto é, carboidratos, lipídeos e proteínas) por meio da mobilização diferencial dessas reservas promovendo assim o ajuste de pontos fisiológicos para tolerar rupturas na homeostase e manter a habilidade de obter e assimilar alimentos, de forma a encerrar o jejum e recuperar os estoques nutricionais perdidos (McCue, 2010).

Embora os processos biológicos empregados para superar a escassez de nutrientes sejam altamente conservados entre os metazoários devido a herança termodinâmica comum da vida que envolve as reações de transferência e armazenamento de energia (Schlegel & Stainier, 2007), os animais diferem em suas necessidades energéticas globais e, portanto, exibem diferentes estratégias adaptativas para lidar com o mesmo problema. Alguns fatores podem

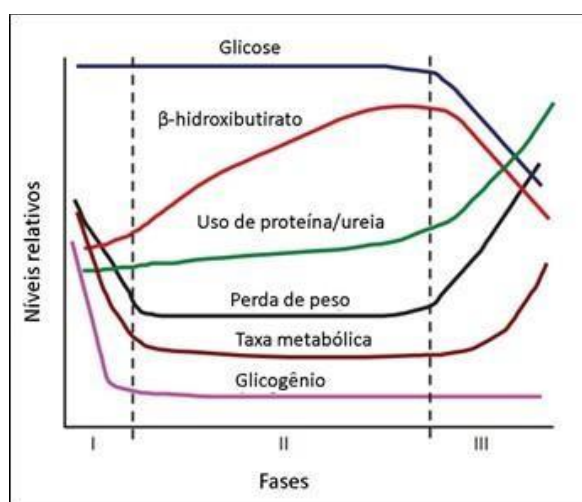
influenciar a capacidade de um organismo de suportar períodos de restrição alimentar. A termorregulação, por exemplo, é um parâmetro importante (Hohtola, 2012). Assim, espécies ectotérmicas geralmente são mais resistentes ao jejum do que espécies que apresentam endotermia (Barboza e Hume, 2006). Alguns pequenos pássaros e mamíferos, por exemplo, podem tolerar apenas um dia de restrição alimentar total (Kendeigh, 1945; Mosin, 1984). Peixes, anfíbios e répteis, por sua vez, toleram períodos de fome que são indubitavelmente letais para outros vertebrados (McCue, 2007). Em geral, essa capacidade de ectotérmicos de resistirem por períodos mais longos a restrição alimentar total, provavelmente resulta de suas necessidades energéticas relativamente mais baixas, normalmente de 10% a 20% menores do que é requerido por animais endotérmicos de tamanho comparável e na mesma temperatura corporal. Adicionalmente, durante períodos de inatividade, as temperaturas corporais de vertebrados ectotérmicos caem perto dos níveis ambientais, com uma consequente redução na taxa metabólica (Pough, 1980).

O hábito alimentar entre os animais varia amplamente e inclui desde frequências de ingestão constantes a intervalos que podem superar vários meses. Nesse sentido, geralmente, animais carnívoros por possuírem dieta onde é comum intervalos alimentares longos, são mais resistentes à fome do que aqueles de hábito herbívoro/omnívoro onde a ingestão de nutrientes ocorre com maior periodicidade (Bond, 1996). Ademais, por apresentarem razão superfície/volume baixa e possuírem mais estoques energéticos, animais que possuem grande massa corporal tendem a lidar melhor com eventos longos de inanição (Gergs e Jager, 2014).

As mudanças progressivas que ocorrem no catabolismo de tecidos corporais em vertebrados têm padrões similares, mas diferem na sua magnitude, sendo comumente divididas em três fases (Castellini e Rea 1992) (Figura 1). Durante o crescimento somático em animais, o estado anabólico é caracterizado pela dependência do metabolismo de carboidratos para suprir demandas energéticas, não apenas para manutenção, mas também para o desenvolvimento de reservas de proteínas e lipídios (Menahan e Sobocinski, 1983). Com o início do jejum total, as reservas relativamente curtas de carboidratos, sobretudo na forma de glicogênio hepático e muscular são consumidas, caracterizando a primeira fase. O catabolismo segue com uma mudança progressiva da dependência das reservas de carboidratos para a mobilização de gordura na segunda fase e o mecanismo de oxidação da glicose é acentuadamente suprimido a um nível mínimo. Finalmente, a terceira e última fase é geralmente caracterizada por um esgotamento crítico da gordura corporal até o ponto em que proteína endógena é utilizada como combustível (Groscolas e Robin, 2001). Curiosamente, embora certos tecidos de mamíferos, como o tecido nervoso, sejam conhecidos pela

dependência de corpos cetônicos durante o jejum (Robinson e Williamson 1980), foi sugerido que o uso de corpos cetônicos durante o jejum não é, da mesma maneira, importante para peixes teleósteos. Isso ocorre porque esses animais, em grande parte, carecem de níveis suficientes de  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase (Zammit e Newsholme, 1979).

Como exposto acima, muitos dos mecanismos inatos dos organismos para lidar com a privação de nutrientes, estão engrenhados em seu contexto ecológico, isto é, fazem parte e são desencadeados por eventos do próprio ambiente do animal. Assim, animais de cultivo e laboratório podem não responder ao jejum da mesma forma que seus pares na natureza que podem ter um conjunto diferente de opções comportamentais (Lignot e LeMaho, 2012).



**Figura 1.** Perfis de variáveis metabólicas durante as três fases do jejum, incluindo concentrações plasmáticas de glicose,  $\beta$ -hidroxibutirato, utilização de proteína/uréia, perda específica de massa corporal, taxa metabólica e concentrações de glicogênio nos tecidos. Os valores relativos de cada perfil são apenas ilustrativos e não quantitativos. Figura adaptada de Secor (2016).

## 1.2 - Jejum em peixes

Compreender como diferentes peixes respondem ao jejum é importante para uma série de áreas do conhecimento, incluindo a ecologia, a fisiologia comparativa e a aquicultura (Bar e Volkoff, 2012). Os peixes em geral demonstram uma adaptação notável ao jejum prolongado, tanto em experimentos controlados quanto em seu habitat natural, e compreender os mecanismos que operam em períodos curtos e longos com pouco ou nenhum alimento pode ajudar a otimizar o crescimento e o manejo nessas condições (Bar, 2014). Na natureza, os peixes podem passar por períodos de jejum que podem variar amplamente em duração e severidade da escassez de nutrientes (Navarro e Gutiérrez, 1995). Em algumas espécies uma

fase de jejum pode fazer parte do seu ciclo natural de vida caracterizando, por exemplo, aspectos sazonais como estiagens ou invernos prolongados, além de inúmeros eventos relacionadas a reprodução como migração para desova, incubação, defesa de território e construção de ninho (McCue, 2010). Espécies de peixes que vivem em cavernas ("troglóbios") podem passar por jejuns prolongados de meses a anos devido à natureza cíclica das enchentes e disponibilidade de alimentos (Hervant, 2012). Na criação comercial de peixes, em diversas etapas do manejo dos animais, podem ser impostos períodos de jejum como na fase pré-despesca, durante o transporte, seleção, sanitização da água, controle de doenças (Lee *et al.*, 2015) ou em dietas onde se utiliza uma estratégia alimentar com ciclos de restrição alimentar e realimentação; com vistas a otimização do desempenho produtivo, por meio do crescimento compensatório (Met calf e Monagham, 2001; Palma, 2010; Wang, 2009).

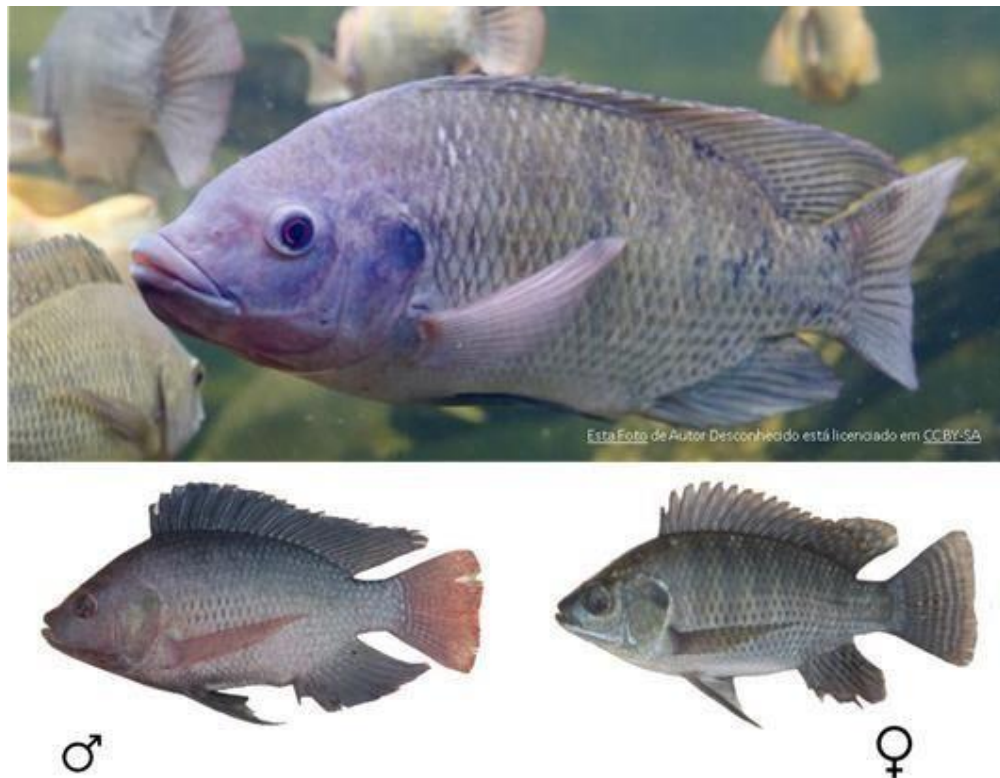
Para a maioria das espécies de peixes, o glicogênio hepático é geralmente o primeiro substrato usado como fonte de energia e a glicose derivada do glicogênio pode ser usada para manter a glicemia durante a primeira fase do jejum. Quase em paralelo com a depleção hepática de glicogênio, as reservas lipídicas são utilizadas para obter energia. Quando ambas as reservas são praticamente esgotadas, proteína é mais extensamente catabolizada (Echevarria *et al.*, 1997; Navarro e Gutiérrez 1995; Wang, 2006). Apesar de serem observadas similaridades no perfil de resposta ao jejum, muitas variações do padrão geral podem ser encontradas. Espécies como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) e enguia europeia (*Anguilla anguilla*), tendem a preservar suas reservas de glicogênio enquanto metabolizam significativas quantidades de lipídios e/ou proteínas (Kamra, 1966; Sheridan, 1991; Larsson e Lewander, 1973). De fato, em peixes carnívoros, os aminoácidos frequentemente tomam o lugar dos carboidratos como precursores das fontes de energia (Furné e Sanz, 2017). Recentemente, foi reportado para o peixe tetra mexicano (*Astyanax mexicanus*), resistência à insulina, como mecanismo para superar a pouca oferta de recursos nutricionais (Riddle *et al.*, 2019). Deste modo, estudos comparativos permitem distinguir adaptações únicas daquelas compartilhadas pelos peixes em geral.

### 1.3 – A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe teleósteo pertencente à família dos ciclídeos (*Cichlidae*). Espécie nativa da África, possui distribuição natural por toda a bacia dos rios Nilo e Níger e do lago de Chade, além dos grandes lagos do leste africano (Bezault *et al.*, 2011). Adultos de tilápia se alimentam predominantemente de fitoplâncton. Se esse

recurso está escasso, há preferência por zooplâncton, ovos e larvas de outros peixes e, por fim, podem se alimentar de detritos. Variações sazonais, sobretudo devido a influência do regime de precipitações, influenciam no tipo de dieta da tilápia. Durante a estação seca, detritos se tornam escassos, afetando a quantidade de alimento disponível (Leveque, 2002). A fêmea apresenta comportamento de cuidado parental incubando ovos fertilizados na cavidade bucal até a liberação dos alevinos. Durante a incubação dos ovos a fêmea não se alimenta, mantendo-se por um período de 10 a 12 dias em jejum até a liberação dos alevinos (Barreto *et al.*, 2003).

A tilápia do Nilo é amplamente cultivada ao redor do mundo. Entre os peixes de água doce é a quarta espécie com maior produção global, ficando atrás apenas da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), carpa-prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e da carpa-comum (*Cyprinus carpio*) e representando 8% de todo o pescado de água doce cultivado (FAO, 2017). A preferência pela tilápia do Nilo por produtores se deve a características favoráveis da espécie para a aquacultura como rápido crescimento corporal, fácil reprodução, resistência a doenças, tolerância a alta densidade populacional e baixas concentrações de oxigênio, além de possuir carne com boa aceitação no mercado (Vicenti *et al.*, 2013). As adaptações da espécie a uma ampla faixa de condições ambientais também favorecem sua consolidação como espécie invasora, reduzindo a biodiversidade nos locais onde é inapropriadamente introduzida, alterando a composição ictiológica, por meio da competição com outras espécies por recursos alimentares e pela predação de ovos e alevinos (Williamson, 1996).



**Figura 2.** A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe da família dos ciclídeos (*Cichlidae*). O dimorfismo sexual é evidente. Machos desenvolvem as pontas da nadadeira dorsal e anal em formato pontiagudo e mais alongado, enquanto nas fêmeas são arredondadas. Os machos podem ainda exibir coloração avermelhada durante o período reprodutivo.

#### 1.4 – O Fígado durante o jejum

Quando um animal se encontra sob estresse nutricional, seus órgãos, tecidos e células também enfrentam limitação de recursos. No entanto, esses compartimentos não compartilham, necessariamente, esse ônus de maneira equalizada (McCue, 2010). Assim, o fígado, órgão central do metabolismo, possui um papel importante para a sobrevivência do organismo durante a restrição alimentar ao reajustar continuamente estruturas e funções hepatocelulares para a manutenção da homeostase metabólica do organismo (Segner, 1998). A manutenção de níveis basais de glicose circulante, por exemplo, é crucial para a sobrevivência de vertebrados e vários órgãos estão coordenados durante o jejum para que seja mantida a homeostase da glicose, sendo o fígado o mais importante (Hong *et al.*, 2014). O fígado é um órgão vital que desempenha funções diversas, intimamente ligadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, atuando também na eliminação de toxinas e patógenos e ainda na regulação das respostas imunes. Lipídios, peptídeos, carboidratos e



nutrientes são transportados para o órgão através do sangue venoso portal derivado do intestino e passam pelas células do revestimento sinusoidal antes de finalmente serem absorvidos e metabolizados pelos hepatócitos (Protzer *et al.*, 2012).

No estado alimentado, o fígado promove a captação do excesso de glicose circulante para armazená-la na forma de glicogênio ou promove a sua transformação em ácidos graxos, através da lipogênese (Shimeno, 1993). Já em condições de jejum, o órgão auxilia o organismo através da quebra de glicogênio para a liberação de glicose na circulação (glicogenólise) além de promover a gliconeogênese hepática e produção de corpos cetônicos (Alves-Bezerra e Cohen, 2018). O jejum prolongado induz mudanças na circulação de metabolitos (e.g. glicose, aminoácidos, ácidos graxos, lipídeos, proteínas). Essas alterações, junto da avaliação de parâmetros biomorfométricos, constituem as medidas mais comumente estudadas em animais submetidos ao jejum e podem fornecer informações sobre as transições fisiológicas durante o estresse nutricional (Eiermann e Jenni, 1998; Guzman *et al.*, 2004). Paralelo a mobilização de substratos para o fornecimento de energia, a autofagia opera para reciclar componentes celulares para reutilização pela célula e constitui, dessa maneira, evento fundamental para a manutenção da homeostase durante o jejum (Klionsky, 2016).

O fígado possui um papel central na homeostase energética do organismo por sua capacidade de metabolizar glicose e ácidos graxos (Reddy e Rao, 2006). Quando a ingestão de energia é abundante, os vertebrados utilizam preferencialmente carboidratos para gerar ATP e o excesso de glicose, após recompor os estoques de glicogênio, é convertido em ácidos graxos (lipogênese) para uso na síntese e armazenamento de triglicerídeos (TG) no tecido adiposo (Reddy e Hashimoto, 2001). Os ácidos graxos constituem a forma de energia mais armazenada e circulante em um organismo vertebrado e os TG são a forma não-tóxica mais comum de ácidos graxos (Nguyen *et al.*, 2008). Eventualmente, o acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos resulta em esteatose hepática, que pode se desenvolver como consequência de múltiplas disfunções, como alterações na resposta à insulina,  $\beta$ -oxidação, armazenamento e transporte de lipídios, autofagia e desequilíbrio nas quimiocinas e sinalização de receptores nucleares (Bechmann *et al.*, 2012).

Apesar da grande semelhança morfológica e funcional do fígado de peixes e de outros vertebrados, como os mamíferos, é útil levar em consideração algumas características do órgão em peixes. O parênquima hepático em peixes tem uma organização distinta da encontrada em mamíferos e não possui disposição em compartimentos hexagonais (lóbulos hepáticos). Além disso, diferente dos mamíferos, hepatócitos de peixes se mostram fracamente basofílicos. O fígado em alguns teleostes pode apresentar agregados de

macrófagos chamados centros de melanomacrófagos (MMC). Os MMCs são histologicamente distinguíveis no tecido hepático por apresentarem macrófagos com pigmentos como melanina, hemossiderina e lipofuscinas (Sales *et al.*, 2017). Ainda, a temperatura tem grande influência sobre o metabolismo do órgão, visto que são animais pecilotérmicos. Apesar de suas características próprias, estudos de fígado de peixe são úteis na análise de interações ambientais e a morfofisiologia hepática (Bruslé *et al.*, 1996).

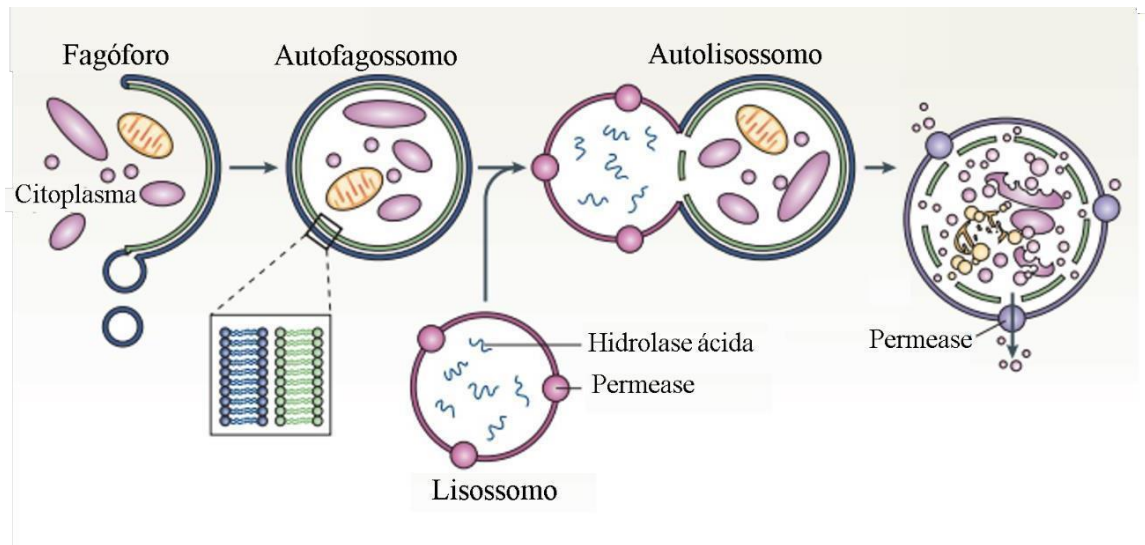
## 1.5 – Autofagia

A autofagia é um processo catabólico evolutivamente conservado que tem como alvo proteínas citoplasmáticas de vida longa ou organelas danificadas para degradação lisossômica (De Duve e Wattiaux, 1966). Diferente da via ubiquitina-proteassoma, que reconhece e degrada principalmente proteínas de vida curta, a autofagia é mais do que uma via de autodestruição e desempenha papéis importantes em um amplo espectro de processos fisiológicos incluindo diferenciação, desenvolvimento, metabolismo celular e homeostase energética (Qu *et al.*, 2007; Cecconi e Levine, 2008). Três tipos principais de autofagia são reconhecidos: macroautofagia (doravante referida como autofagia), microautofagia e autofagia mediada por chaperona, que diferem principalmente em como o material citosólico é entregue aos lisossomos. A microautofagia refere-se à invaginação da membrana lisossomal resultando no recrutamento direto de substratos que são subsequentemente degradados por proteases lisossomais (Sahu *et al.*, 2010). A autofagia mediada por chaperonas é mais seletiva e envolve o reconhecimento pela proteína cognata do choque térmico (HSC70) do motivo contendo o pentapeptídeo KFERQ (Lis-Fen-Glu- Arg-Gli). A HSC70 promove a translocação desses alvos através das membranas lisossomais para o lúmen lisossomal por meio do receptor 2A da proteína de membrana associada ao lisossoma (LAMP2A) (Mizushima, 2018).

A via autofágica (ou macroautofagia) é iniciada com a formação de uma membrana de isolamento, denominada fagóforo, e a ação coordenada das proteínas ATG (relacionadas à autofagia) que resulta na expansão dessa membrana para formar o autofagossomo (Lamb *et al.*, 2013). As principais proteínas ATG podem ser divididas em diferentes subgrupos funcionais que orquestram a formação do autofagossomo, processo que compreende três etapas principais: iniciação, nucleação e expansão. A proteína pertencente ao complexo PtdIns3K, denominada Beclin 1 (ortóloga à ATG6/VPS30 em levedura) tem sido associada a regulação coordenada do tráfego de membrana e da autofagia em vários processos fisiológicos e patológicos sendo, portanto, muito útil na investigação de processos que podem

envolver a ativação da autofagia. Evidências sugerem que o fator nuclear kappa B (NF-Kb) e os fatores de transcrição E2F e microRNAs (miRNAs) estão envolvidos na regulação da expressão de Beclin 1 na autofagia (Kang *et al.*, 2011). A proteína da via autofágica LC3 (ortóloga à Atg8 em levedura) é uma proteína semelhante à ubiquitina. Sua forma citosólica LC3-I é conjugada com fosfatidiletanolamina para formar LC3-II, participando do recrutamento de carga para os autofagossomos e na sua biogênese e, assim, o tamanho do autofagossomo é regulado pela quantidade de LC3. Como essa proteína é seletivamente encontrada em autofagossomos, a conversão LC3-I para LC3-II permite a medição da taxa autofágica (Klionsky *et al.*, 2010). Após o fechamento do fagóforo, o autofagossomo de membrana dupla que surge amadurece e funde-se com os lisossomos para degradar seu conteúdo. A fusão completa é alcançada pela degradação da membrana autofagossômica interna por hidrolases lisossômicas e exposição do conteúdo do autofagossomo ao lúmen do lisossomo. Até agora, um grande conjunto de moléculas, incluindo componentes do citoesqueleto, proteínas motoras, fatores de ligação, fosfolípidios e proteínas SNAREs, foram identificados como atores importantes para garantir uma fusão precisa e eficiente (Yu *et al.*, 2017).

A autofagia é regulada por importantes vias de detecção de nutrientes, incluindo a proteína alvo da rapamicina (TOR) e a 5' proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), que inibem e ativam a autofagia, respectivamente (Ho *et al.*, 2017). Atualmente, a função da autofagia pode ser classificada em duas amplas categorias: geração de produtos de degradação, importante para organismos na fase aguda do jejum e depuração intracelular de macromoléculas e organelas defeituosas, uma função essencial para o controle de qualidade intracelular e importante para células e organismos de vida longa (Mizushima, 2018). As funções catabólicas da autofagia mitigam esses fatores de estresse através da reciclagem de componentes defeituosos e do suprimento de moléculas que sustentam o metabolismo. Portanto, a autofagia induzida pelo estresse faz parte de uma mudança metabólica mais ampla que promove a sobrevivência de células e organismos, priorizando o reparo e a manutenção sobre o crescimento (Leidal *et al.*, 2018).



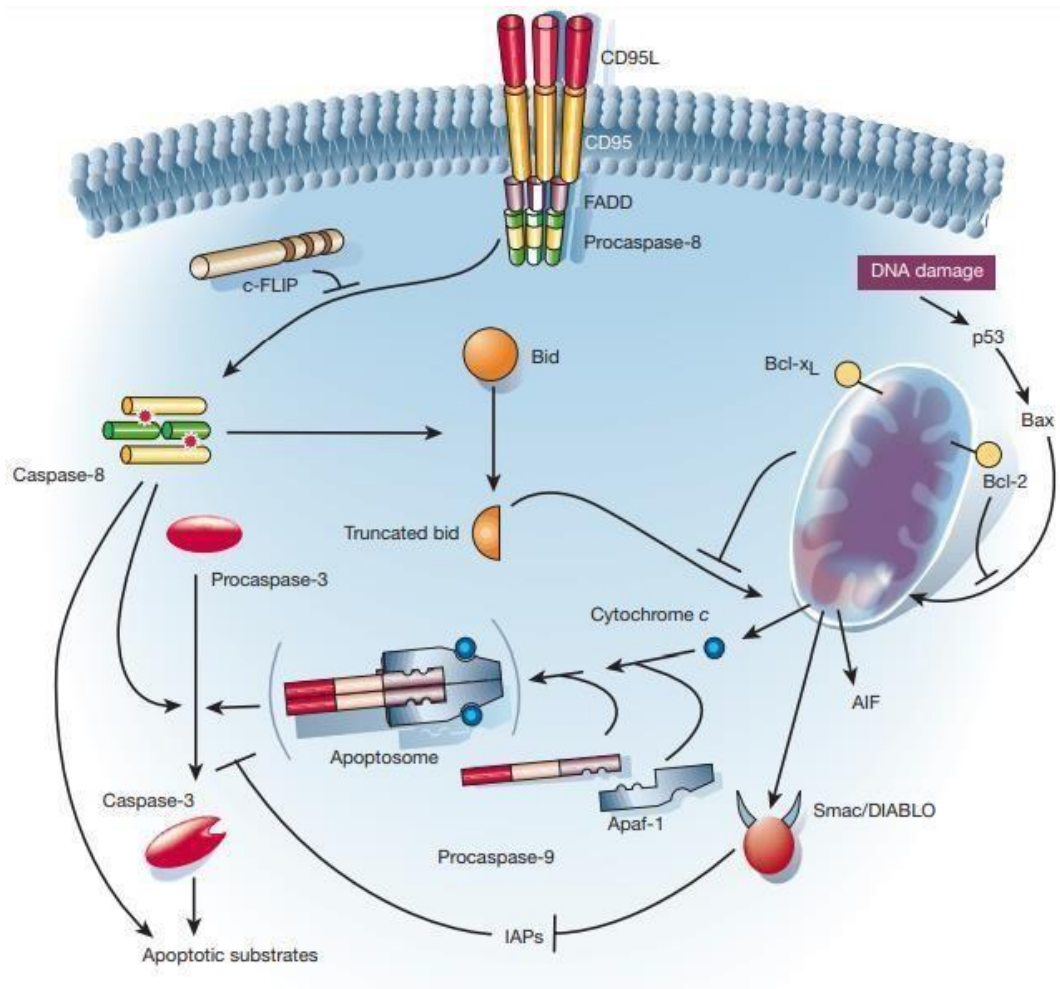
**Figura 3.** Durante a autofagia, o sequestro de componentes que serão alvo da degradação, começa com a formação de um fagóforo que se expande formando um autofagossomo de membrana dupla que envolve uma porção do citoplasma. O autofagossomo completo se funde com um lisossomo, que contém hidrolases ácidas. As enzimas do compartimento recém formado, um autolisossomo, degradam a membrana interna do autofagossomo e os componentes internalizados. As macromoléculas resultantes são liberadas por meio de permeases para reutilização no citoplasma. Figura adaptada de Klyonsky (2007).

## 1.6 - Apoptose

O jejum prolongado pode também alterar a dinâmica de outro processo celular importante, a apoptose. Tanto a autofagia quanto a apoptose são processos biológicos finamente regulados que desempenham papéis essenciais no desenvolvimento, homeostase tecidual e doenças. As interações entre os componentes das duas vias indicam uma interrelação complexa, por vezes induzida por estímulos semelhantes (Nikoletopoulou *et al.*, 2013).

A apoptose é o mais conhecido tipo de morte celular programada e constitui processo altamente conservado evolutivamente (Kerr *et al.*, 1972). Tão importante quanto a divisão e migração celular, esse processo permite que o organismo controle, com precisão, o número de células e, portanto, o tamanho dos tecidos, além de se proteger de células nocivas que podem interferir na homeostase (Hengartner, 2000). A apoptose pode ser estimulada por estímulos intracelulares ou extracelulares, constituindo assim duas vias de ativação: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca inicia-se pela ligação de indutores de morte celular em receptores na superfície celular. Já estímulos da via intrínseca levam à despolarização mitocondrial, que permite a liberação do citocromo c, que por sua vez se liga ao fator de ativação de protease apoptótica 1 (APAF 1) e a procaspase 9, gerando o complexo intracelular

denominado “apoptossomo” que ativa a caspase 9. As mitocôndrias danificadas também produzem um segundo ativador da caspase derivado de mitocôndrias, o SMAC (também conhecido como DIABLO), que libera a caspase 3 de proteínas inibidoras da apoptose. Ambas as vias de apoptose extrínseca e intrínseca convergem na liberação da caspase 3 e caspase 7, que conduzem aos eventos terminais do apoptose (Ashkenazi *et al.*, 2017).



**Figura 4.** As duas principais vias apoptóticas: A via extrínseca (caminho da esquerda na figura acima) e a via intrínseca ou mitocondrial (caminho da direita). Figura original de Hengartner (2000).

### 1.7 - Inter-relação das vias autofágica e apoptótica

A via apoptótica é regulada pelas proteínas da família Bcl2 que controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial e é composta por duas subfamílias: as proapoptóticas, que inclui a proteína Bax e as antiapoptóticas, que inclui Bcl-2 e BCL- XL (Danial e Kosmeyer, 2004). A proteína Beclin-1 interage com as proteínas antiapoptóticas da

família BCL2 (em particular BCL2 e BCL-XL) através de um domínio BH3. As proteínas BH3-aptas e os miméticos farmacológicos da BH3 interrompem competitivamente a interação inibitória entre Beclin-1 e BCL2 ou BCL-XL, estimulando a autofagia. Assim, os domínios BH3, que são bem conhecidos por sua propriedade indutora de apoptose, também podem estimular a autofagia (Maiuri *et al.*, 2007a). Desta forma, a autofagia e a apoptose podem ser desencadeadas por sinais comuns. A relação funcional entre apoptose e autofagia, no entanto, é complexa no sentido em que, sobre vários cenários, a autofagia constitui uma adaptação ao estresse que evita a morte celular, suprimindo assim a apoptose, enquanto que em outros contextos a autofagia constitui um caminho alternativo que pode levar a morte celular que é chamada morte celular dependente de autofagia (Gozuacik e Kimchi, 2004). Em termos moleculares isso significa que ambos os processos podem tanto atuar em sinergia ou polarizar uma resposta celular (Maiuri *et al.*, 2007b). No decurso da morte celular programada, frequentemente, a autofagia ocorre antes da apoptose. Esta sequência ordenada de autofagia e apoptose pode servir para dois propósitos: primeiro, a autofagia pode constituir um mecanismo através do qual a célula destinada a morrer inicia seu catabolismo, acelerando assim a eliminação da célula, e segundo, a autofagia também pode ajudar a manter níveis ótimos de ATP que podem facilitar o processo apoptótico (Maiuri *et al.*, 2007b).

## 1.8 - Justificativa

Tradicionalmente, o jejum tem sido mais extensivamente estudado em aves e mamíferos do que em invertebrados e outros vertebrados e a extensão em que o conhecimento do tema nos grupos mais estudados pode ser extrapolado para outros grupos não é clara (Wang *et al.*, 2006). Estudos demonstraram alterações degenerativas, inflamatórias e circulatórias no fígado entre outros distúrbios em decorrência da exposição de teleósteos a agentes agressores (Weber *et al.*, 2020; Usha *et al.*, 1988; Shi *et al.*, 2015; Rajkumar *et al.*, 2016). Contudo, a despeito de sua importância na aquicultura mundial e potencial como modelo para estudos morfofisiológicos, estudos abrangentes que relacionam alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos e da dinâmica da autofagia e apoptose, processos essenciais para manutenção da homeostasia durante o jejum são escassos para *O. niloticus*. A investigação do estado do fígado; órgão central do metabolismo, e de parâmetros da circulação durante o jejum e ciclos de realimentação pode fornecer informações úteis para o manejo comercial da espécie além de ajudar no entendimento de eventos morfofisiológicos do órgão em condições de estresse nutricional.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da restrição alimentar contínua e intermitente durante 28 dias sobre o tecido hepático na tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, relacionando os parâmetros fisiológicos e bioquímicos do sangue com os processos de autofagia e apoptose.

### **2.2 - Objetivos específicos:**

- Determinar os índices biológicos (hepatossomático e fator de condição de Fulton);
- Analisar a histopatologia do fígado nos animais dos grupos controle e submetidos ao jejum contínuo e intermitente;
- Comparar aspectos da morfometria dos hepatócitos;
- Quantificar o glicogênio hepático nos diferentes grupos de estudo;
- Analisar a lipoperoxidação hepática nos diferentes grupos de estudo;
- Analisar a ultraestrutura das células hepáticas, com ênfase na detecção de estruturas autofágicas;
- Analisar a concentração sanguínea de aminotransferases (AST e ALT);
- Comparar parâmetros bioquímicos do sangue entre os grupos de estudo;
- Quantificar as proteínas das vias autofágica (Beclin-1 e LC3) e apoptótica (Bax) nos grupos de estudo.

## **3 - METODOLOGIA**

### 3.1 - Ensaio experimental e amostragens

Para a realização do experimento, exemplares machos adultos de *O. niloticus* (n=40, linhagem GIFT, com idade entre 6 e 8 meses ( $24,31 \pm 0,31$  cm de comprimento total e  $268,7 \pm 11,21$  g), foram mantidos por até 28 dias em 3 tanques com  $1\text{m}^3$  de capacidade com sistema de filtragem mecânica e biológica sob condições controladas de temperatura, luminosidade e qualidade da água. Os peixes passaram por um período de aclimação (30 dias) onde receberam diariamente ração comercial (32% de proteína bruta) à taxa de 2% de sua biomassa inicial. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Aquacultura da Escola de Medicina Veterinária (LAQUA) da UFMG, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo CEUA: 67/2017).

Os peixes foram divididos em 7 grupos experimentais: controle, jejum contínuo durante 7, 14, 21 e 28 dias e realimentação 1 e 2 (jejum intermitente). No grupo controle, os peixes foram alimentados ‘*ad libitum*’ com ração comercial. Nos grupos de jejum contínuo, os peixes foram submetidos à restrição alimentar total por 7, 14, 21 e 28 dias. No grupo realimentação 1, os peixes foram submetidos a 1 ciclo de jejum/realimentação (1º ao 6º dia em jejum, seguido por realimentação ‘*ad libitum*’ com ração comercial do 7º ao 14º dia). O grupo realimentação 2 foi submetido a dois ciclos de jejum/realimentação, totalizando 28 dias de tratamento. Em cada grupo, 4 peixes foram coletados para obtenção de plasma sanguíneo. Em seguida foram anestesiados com solução de eugenol a 285 mg/L e eutanasiados por secção transversal da medula espinhal seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) para obtenção de amostras do fígado. Destes animais foram obtidos os dados biométricos: peso corporal (PC), comprimento total (CT) e peso do fígado (PF) para cálculo do índice hepatossomático ( $\text{IHS} = 100 \text{ PF/PC}$ ) e do fator de condição de Fulton ( $K = 100 \text{ PC/CP}^3$ ).

### 3.2 - Parâmetros bioquímicos e hematológicos

O sangue de cada animal (n = 4/grupo) foi coletado em seringa heparinizada e transferido para tubo de Eppendorf heparinizado e, em seguida, centrifugado durante 3 min a 3.500 rpm a 0°C. Após centrifugação, o plasma foi separado e armazenado em freezer a -80°C para determinação do colesterol total, triglicerídeos e aminotransferases hepáticas ALT e AST. Para a determinação de glicose em sangue recém coletado, foi utilizado o Kit Accu-Chek com



limite mínimo de detecção de 10 mg/dL e acurácia satisfatória conforme norma europeia EN ISO 15197. O hematócrito foi determinado a partir de tubos capilares preenchidos com aproximadamente 2/3 de sangue previamente homogeneizado e centrifugado durante 10 minutos a 10.000 rpm. A porcentagem de hematócrito (HTC) foi determinada pelo método do microhematócrito, de acordo com Goldenfarb e colaboradores (1971). As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram dosadas por meio de refratômetro portátil. Para determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e transaminases hepáticas foi utilizado kits da biotécnica seguindo recomendações do fabricante.

### **3.3 - Microscopia de luz e eletrônica**

Para análise histológica e morfométrica, fragmentos de fígado dos animais (n= 4/grupo) foram fixados em líquido de Bouin por 24 horas, incluídos em parafina, seccionados com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina.

Para análise ultraestrutural, amostras de fígado foram fixadas em solução de Karnovsky modificado (2,5% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3) durante 24 horas a 4°C. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% com ferrocianeto de potássio 1,5% por 2 h e incluídas em resina Epon/Araldite. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2- 135 12 Spirit (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) a 120 kV no Centro de Microscopia da UFMG.

### **3.4 – Morfometria do tecido hepático**

Para a análise morfométrica do tecido hepático, imagens digitais de secções histológicas do fígado dos animais de estudo foram obtidas utilizando o software Zeiss Axiovision acoplado ao Zeiss Microscópio Axioplan 2. Para a análise da densidade de hepatócitos e ocorrência de alterações do tecido hepático, foi utilizada a ferramenta de grade do software ImageJ, com 713 intersecções por imagem. Para esta análise, foram utilizadas 10 imagens aleatórias em aumento de 400X de cada animal, sendo utilizados 4 animais de cada grupo, totalizando 28 animais avaliados. Os seguintes componentes foram analisados: citoplasma, núcleos, capilares sanguíneos, e esteatose. A proporção (%) dos componentes analisados foi determinada multiplicando-se os pontos de intersecção de cada parâmetro por 100 e em seguida, dividindo o resultado pelo número total de pontos obtidos do tecido.

### 3.5 - Quantificação do glicogênio hepático

A dosagem de glicogênio hepático foi realizada pelo método da antrona (Seifter *et al.*, 1950) de acordo com Colowick, Kaplan (1957). O método consiste em hidrolisar carboidratos presentes na amostra pelo tratamento com ácido sulfúrico, originando furfurais e hidroximetilfurfural. Estes furfurais são depois condensados pela antrona, formando um complexo com cor verde-azulada. A intensidade da cor deste complexo é proporcional à concentração de carboidratos e pode ser medida por espectrofotômetro. Resumidamente, 100 mg de fígado de cada animal (n = 4/grupo) foi tratado com 0,5 mL de KOH 30% e incubados por 20 minutos em banho-maria a 95° C e após, resfriados durante 5 minutos em banho de gelo. Foram adicionados ao tubo 1,25 mL de etanol 95%, agitados em vórtex por 10 segundos e mantidos em banho-maria (95°C) por 2 minutos. Em seguida, foram centrifugados durante 15 minutos a 3000 rpm, separado o sobrenadante e adicionado 1 mL de água destilada ao precipitado. Para a reação colorimétrica, foi adicionado 1mL do homogenato obtido em 2 mL do reagente antrona (0,2 g de antrona em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95%) e homogeneizado em agitador vórtex por 10 segundos. Em seguida deixados por 10 minutos em banho-maria a 95°C (tubo fechado) e resfriados em banho de gelo por 5 minutos. Os valores de absorbância foram lidos em 620 nm. Em conjunto, foram realizadas curvas de calibração com padrão de glicose (10-200 µg/ml) para comparação com os grupos do estudo.

### 3.6 - Lipoperoxidação hepática

O ensaio TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) quantifica o estresse oxidativo medindo o dano peroxidativo aos lipídios que ocorre com a geração de radicais livres. A ação de hidroperóxidos em lipídios pode resultar na produção de malondialdeído (MDA). O MDA gerado pela lipoperoxidação reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob condições de alta temperatura e acidez, gerando um cromógeno que pode ser medido espectrofotometricamente. Assim, o ensaio TBARS descrito a seguir (modificado de Federici *et al.*, 2007), foi usado para quantificar o dano oxidativo (lipoperoxidação) em amostras de fígado dos animais (n = 4/grupo) dos grupos de estudo. Resumidamente, 40 µL de homogenato de fígado (em triplicata) foi adicionado em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços que continha 10 µL de butil hidroxitolueno a 5%. Em seguida foi acrescentado 50 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA) e 75 µL de TBA 1,3% dissolvido em NaOH 0,3%. A placa

foi então incubada a 60°C durante 60 minutos e depois resfriada em gelo. As absorbâncias foram lidas em 630nm, contra a curva padrão (0,5–25 nmol/ml de 1,1,3,3-tetraetoxipropano).

### 3.7 - Western blotting

Para detecção e quantificação das proteínas biomarcadoras da autofagia: LC3 e Beclin-1 e da proteína apoptótica Bax, amostras de fígado de *O. niloticus* dos grupos avaliados foram submetidos a técnica de Western Blot. Amostras congeladas do tecido hepático (n = 4/grupo) foram sonicadas em tampão de lise com aprotinina e inibidores de protease de fluoreto de fenilmetilsulfonila e centrifugadas a 15.000g por 1 hora. A dosagem das proteínas foi realizada no sobrenadante de acordo com Bradford (1976). Para cada amostra, 100 µg de proteína em tampão de amostra foram adicionados a 15% de eletroforese em gel de poliacrilamida e subsequentemente transferidos para membrana de difluoreto de polivinilideno (Sigma Aldrich). Após a transferência, as reações não específicas foram bloqueadas com leite em pó desnatado durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários correspondentes na diluição de 1:500 “overnight” a 4 °C. Por fim, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo) conjugado com peroxidase na diluição 1: 750 (Sigma-Aldrich) por 2 horas e a reação foi revelada usando DAB. A especificidade dos anticorpos primários para a tilápia do Nilo foi confirmada por Western blot: Bax ~ 20 kDa, Casp ~ 15 kDa, Beclin1 ~ 57 kDa, Actina ~ 43 kDa , Lc3I ~ 18 kDa e Lc3II ~ 16 kDa. A densitometria de proteínas autofágicas e apoptótica foi realizada usando o software ImageJ (NIH) e a densidade óptica relativa das bandas das proteínas de estudo foi calculada em relação a proteína constitutiva (β actina).

### 3.8 – Imunohistoquímica

Para imunolocalização no parênquima hepático das proteínas autofágicas (LC3 e Beclin-1) e de morte celular (Bax), amostras do fígado (n=.4/grupo) foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 24 h, incluídas em parafina e seccionadas com 5 µm de espessura. Para recuperação antigênica, as secções foram fervidas em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 durante 20 min, lavadas em tampão fosfato salino (PBS), incubadas com H2O2 a 3% em PBS para inativar a peroxidase endógena. Para o bloqueio de ligação inespecífica foi utilizado tampão de bloqueio albumina do soro bovino BSA 2% por 45 min. Em seguida, as

secções foram incubadas com o anticorpo primário LC3 (polyclonal rabbit, sc-28266, Santa Cruz Biotechnology, Inc 1:100), Beclin1 (Monoclonal mouse ABCAM 1:100) e Bax (Polyclonal rabbit ABCAM 1:100) overnight em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, os cortes foram submetidos ao sistema de revelação secundário (Kit Dako EnVision™ + Dual Link System-HRP, Referência K4063), corados com diaminobenzidina (DAB) e contra corados com hematoxilina. Para o controle negativo, um dos cortes não recebeu o anticorpo primário.

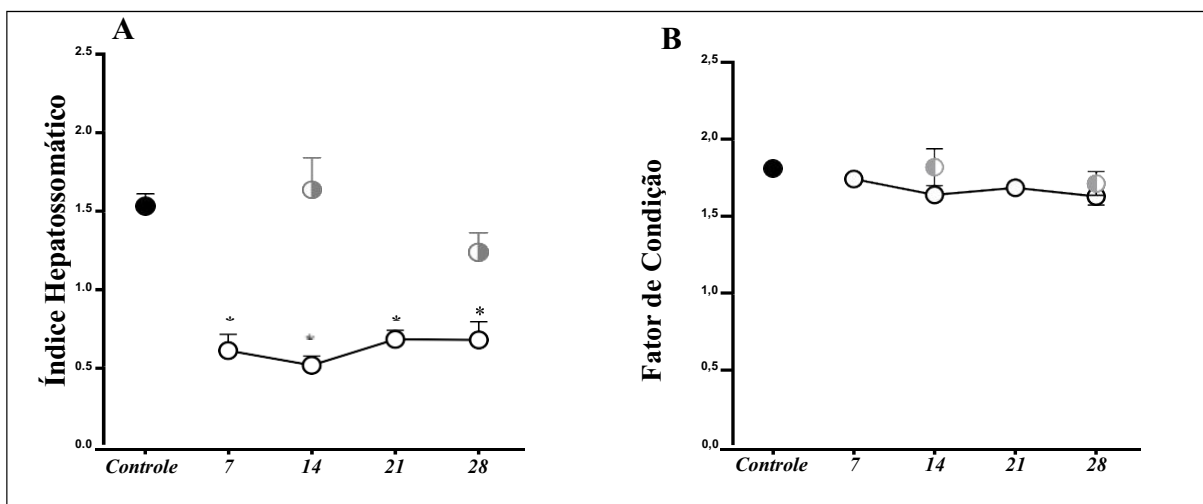
### 3.9 - Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente usando os softwares Minitab 16.1 e Bioestat 5.0 e os gráficos foram construídos utilizando o GraphPad Prism 8.4. Como os dados não apresentaram distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn foram utilizados. Os resultados foram considerados significativos no intervalo de confiança de 95% e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Índices biológicos dos peixes

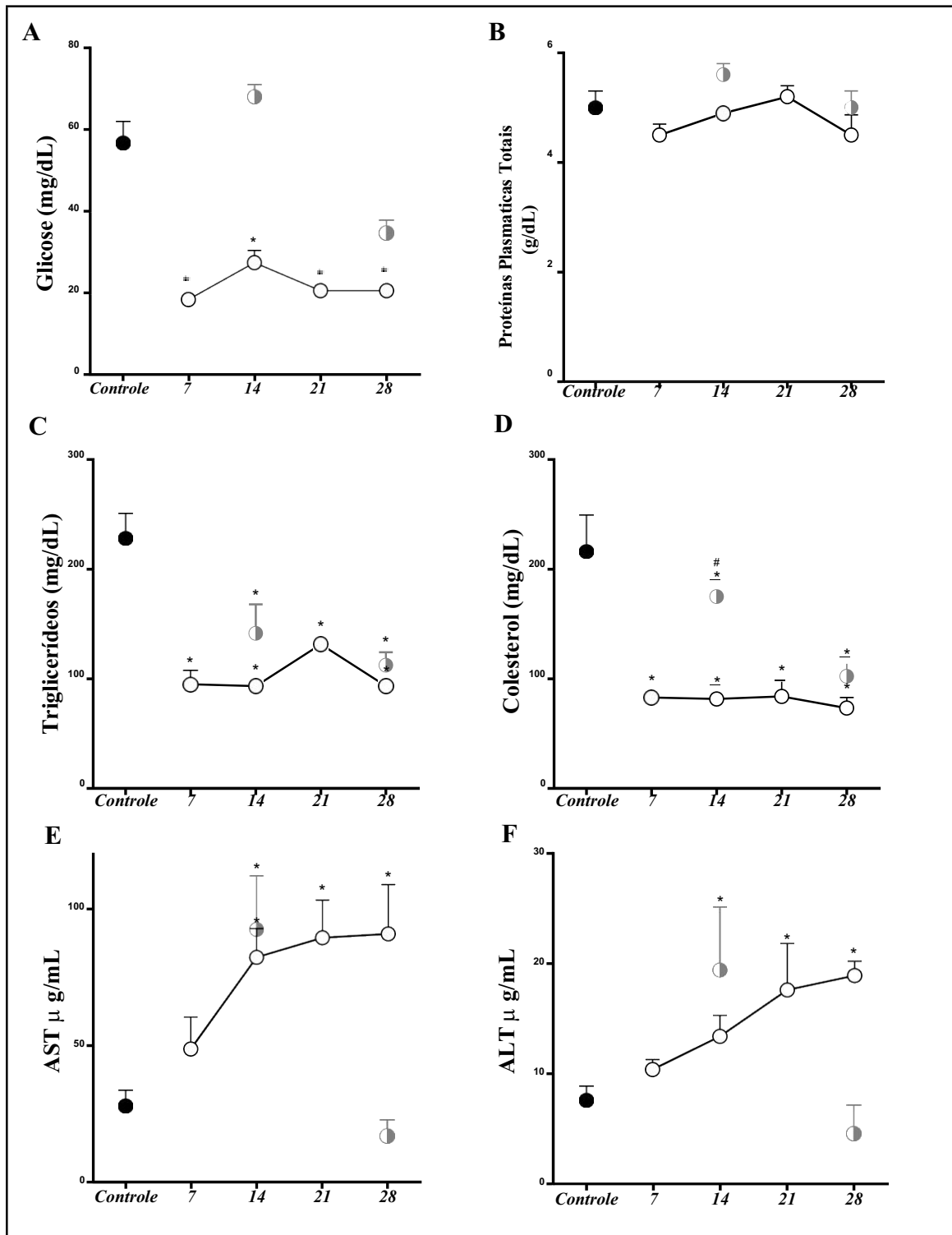
Para o índice hepatossomático (IHS), todos os grupos submetidos a jejum total, mostraram queda significativa ( $p < 0,05$ ) do índice em relação ao grupo controle (**Figura 5**). De maneira distinta, os grupos submetidos a ciclos de jejum/realimentação (jejum intermitente) exibiram valores médios próximos aos registrados para o grupo controle. Para o fator de condição de Fulton (K), os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre os grupos analisados.



**Figura 5:** Distribuição do índice hepatossomático (IHS) (A) do Fator de Condição (K) (B) para *O. niloticus* nos diferentes grupos de estudo. Os valores representam média + EPM. \*  $p < 0,05$ . Círculo cheio: grupo controle; Círculo parcialmente cheio: grupos de jejum intermitente. Círculo vazio: grupos de jejum contínuo.

#### 4.2 – Parâmetros bioquímicos e metabólitos do sangue

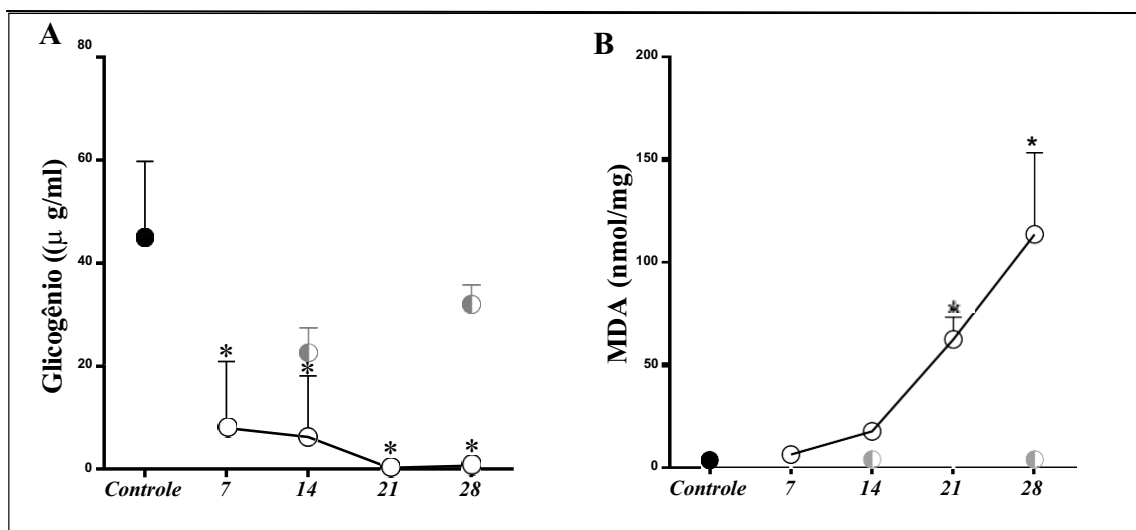
As concentrações sanguíneas dos metabólitos avaliados são exibidas na **Figura 6**. A glicose medida, apresentou decréscimo em todos os tempos avaliados para os animais submetidos ao jejum contínuo, entretanto, os animais dos grupos de jejum intermitente mostraram valores estatisticamente similares ao grupo controle (**Figura 6A**). Os níveis de proteínas plasmáticas totais não apresentaram diferença significativa entre os grupos (**Figura 6B**). A concentração dos lipídeos plasmáticos medidos (triglicerídeos e colesterol) mostraram queda acentuada, em relação ao grupo controle, para ambos os regimes alimentares avaliados (**Figura 6C**). Para o colesterol, entretanto, os animais que passaram por um ciclo de jejum/realimentação (14 dias de tratamento), exibiram valores intermediários entre o grupo controle e os diferentes grupos de jejum contínuo (**Figura 6D**). As concentrações das transaminases hepáticas: aspartato transferase e alanina transferase (AST e ALT, respectivamente) estavam aumentadas a partir de 21 dias para os animais submetidos ao jejum contínuo. Para os grupos de jejum intermitente, em animais submetidos a dois ciclos de jejum/realimentação, os níveis das enzimas avaliadas retornaram a valores similares ao do grupo controle (**Figura 6E-F**).



**Figura 6.** Níveis de metabólitos sanguíneos (A: glicose, B: proteínas plasmáticas totais, C: triglicerídeos, D: colesterol) e de transaminases hepáticas no sangue (E: aspartato transaminase, F: alanina transaminase) para os grupos: controle, jejum contínuo 7, 14, 21 e 28 dias, e jejum intermitente 14, e 28 dias para *O. niloticus*. Os valores representam média + EPM. \*  $p < 0,05$ . Círculo cheio: grupo controle; Círculo parcialmente cheio: grupos de jejum intermitente. Círculo vazio: grupos de jejum contínuo.

### 4.3 - Parâmetros da fisiologia hepática

Os parâmetros hepáticos avaliados: glicogênio e peroxidação lipídica, são apresentados na **Figura 7**. Todos os animais submetidos ao jejum contínuo tiveram decréscimo nas reservas de glicogênio enquanto os animais de ambos os ciclos de realimentação (jejum intermitente), por sua vez, não mostraram valores com diferença significativa em relação ao grupo controle. O subproduto da peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) apresentou níveis progressivamente maiores para os grupos de jejum contínuo, com diferenças significativas com 21 e 28 dias de jejum contínuo. Os animais submetidos ao jejum intermitente, no entanto, exibiram valores de MDA similares ao grupo controle.



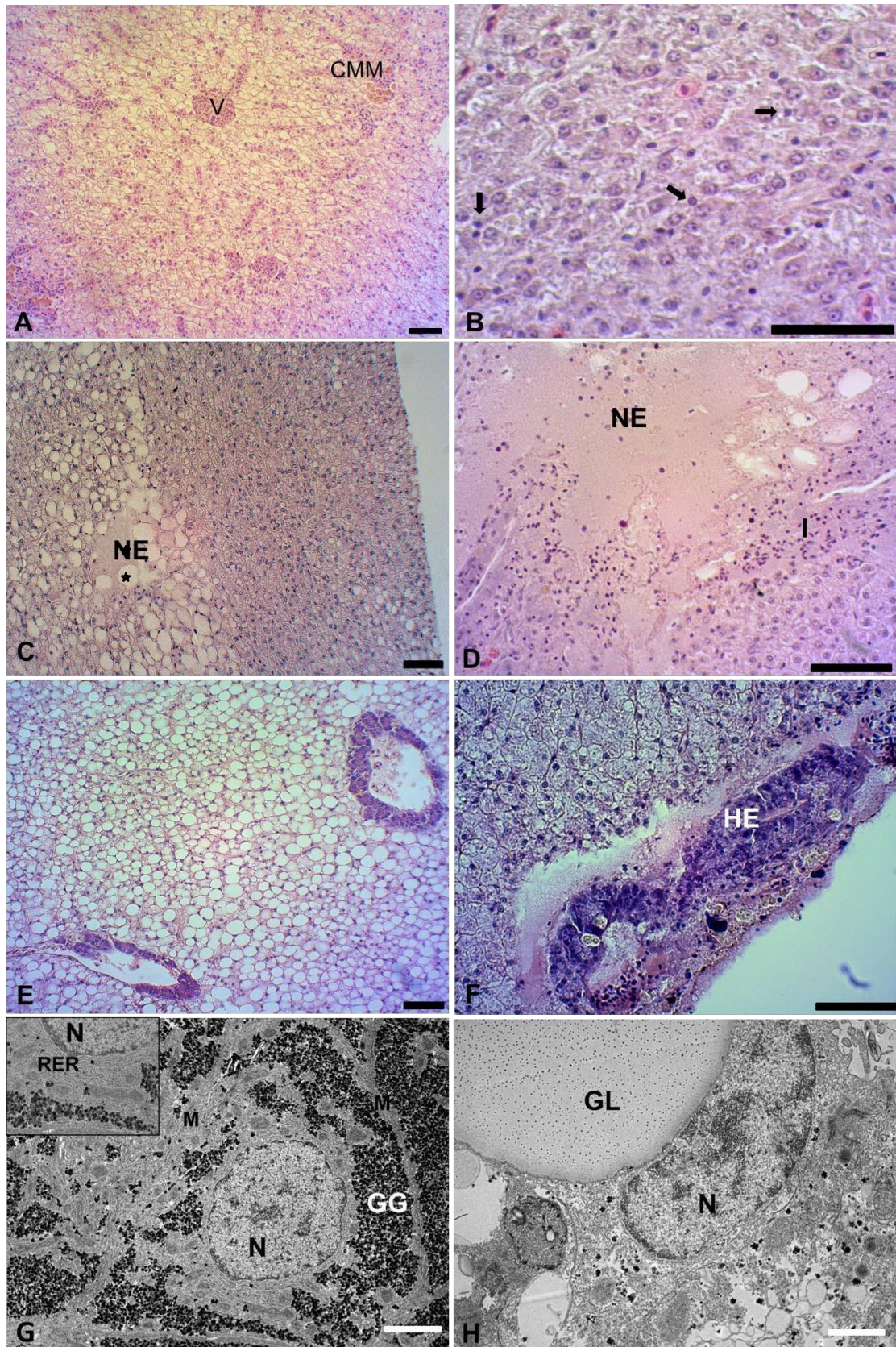
**Figura 7.** Metabólitos hepáticos. Glicogênio (A) e peroxidação lipídica (B) para os grupos: controle, jejum contínuo 7, 14, 21 e 28 dias, e jejum intermitente 14, e 28 dias, para *O. niloticus*. Os valores representam média + EPM. \* p < 0,05. Círculo cheio: grupo controle; Círculo parcialmente cheio: grupos de jejum intermitente. Círculo vazio: grupos de jejum contínuo.

### 4.4 – Histologia e Ultraestrutura hepática

Nos grupos submetidos aos regimes alimentares avaliados, foram observadas alterações celulares e teciduais, particularmente frequentes, nos tempos finais e de maneira progressiva para os animais submetidos em jejum contínuo (**Figura 8**). Grupo controle apresentou histologia normal, com agregados de macrófagos chamados de centro melanomacrofágicos (CMM) e hepatócitos com numerosos grânulos de glicogênio e mitocôndria, e retículo endoplasmático bem desenvolvido (**Figura 8A e G**). Hepatócitos com

núcleo condensado foram frequentemente observados após 14 dias de restrição alimentar (**Figura 8B**). Infiltrado inflamatório e necrose foram observados inicialmente aos 14 dias, se tornando alterações comuns aos 28 dias (**Figura 8 C-D**). Após 7 dias, observou-se também esteatose, inicialmente limitada a pequenas áreas, mas aumentando progressivamente até atingir uma grande parte do fígado dos peixes após 28 dias de jejum (**Figura 8 C-E**). Aos 28 dias, foram observadas ainda, alterações estruturais do pâncreas exócrino intra-hepático (**Figura 8F**). A esteatose, uma alteração presumida na análise histológica pela vacuolização típica do citoplasma dos hepatócitos foi confirmada pela ultraestrutura. A **Figura 8H** mostra grande gota lipídica, que desloca o núcleo do hepatócito para a periferia da célula, característica da esteatose macrogoticular.





**Figura 8.** Histologia e ultraestrutura hepática para *O. niloticus*. Controle apresentando histologia normal, com agregados de macrófagos chamados de centro melanomacrofágicos (CMM). Veia central (V) (A). Grupo jejum contínuo (7 dias) apresentando núcleos com características apoptóticas (setas) (B). Coágulo necrótico (NE) e infiltração inflamatória (I) para jejum contínuo, 14 dias (C-D).



Esteatose difusa (★)(C) em 21 e 28 dias de jejum contínuo, respectivamente (E). Hepatopâncreas apresentando alterações estruturais em 28 dias de jejum contínuo (F). Ultraestrutura de hepatócitos do grupo controle apresentando numerosos grânulos de glicogênio (GG), mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido. Núcleo (N) (G). Grande gota lipídica evidenciando esteatose macrogoticular. Núcleo (N) (H). Barras de escala (G) 1µm e (H) 2µm.

#### 4.5 – Morfometria

A morfometria do tecido hepático (**Tabela 1**) revelou que todos os grupos submetidos ao jejum contínuo (7, 14, 21 e 28 dias) mostraram área de citoplasma dos hepatócitos menor em relação ao grupo controle. Uma menor densidade de núcleos e maior área de capilares sanguíneos foram observados nos grupos com 1 e 2 ciclos de realimentação, quando comparados com os demais grupos. A esteatose foi significativamente maior para os grupos com 21 e 28 dias de jejum contínuo,  $p < 0,05$ . Nos grupos realimentação 1 e 2, a esteatose foi baixa e sem diferença significativa em relação ao controle,  $p > 0,05$ .

**Tabela 1.** Proporção (%) de citoplasma e núcleo dos hepatócitos, capilares sanguíneos e esteatose para o tecido hepático da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, nos diferentes grupos de estudo.

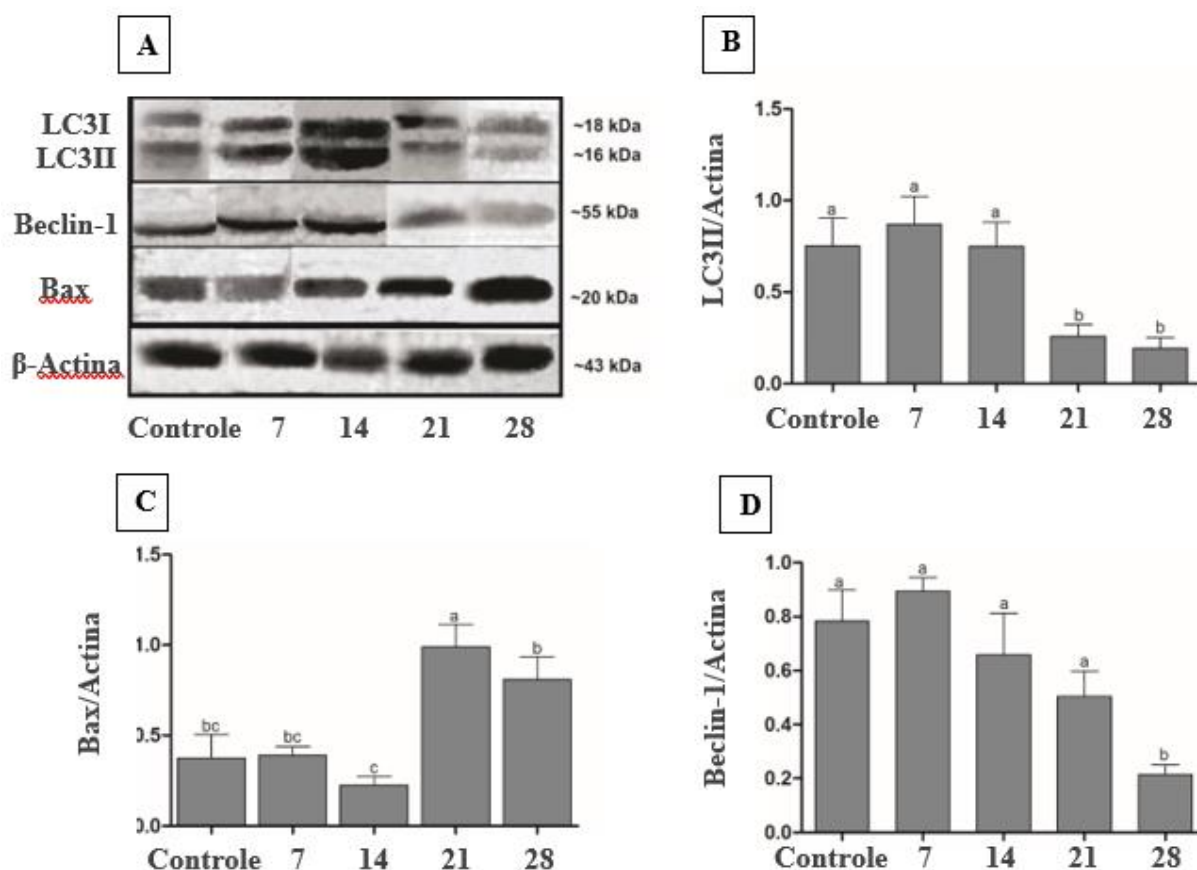
|                 | Citoplasma                | Núcleos                   | Capilares                 | Esteatose                |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Controle</b> | 86,93±0.35 <sup>a</sup>   | 4,27± 0.14 <sup>a b</sup> | 8,62±0.36 <sup>ab</sup>   | nd                       |
| <b>J-7</b>      | 82,58±1.33 <sup>b</sup>   | 5,01±0.19 <sup>a</sup>    | 7,40±0.59 <sup>a b</sup>  | 2,21±1.33 <sup>a b</sup> |
| <b>J-14</b>     | 83,71±0.64 <sup>b c</sup> | 4,57± 0.17 <sup>a b</sup> | 8,91±0.34 <sup>a</sup>    | 2,48±0.64 <sup>b</sup>   |
| <b>J-21</b>     | 83,16±0.54 <sup>b c</sup> | 4,54± 0.15 <sup>a b</sup> | 9,07±0.31 <sup>a</sup>    | 3,95±0.51 <sup>b c</sup> |
| <b>J-28</b>     | 79,45±1.13 <sup>c</sup>   | 3,56± 0.22 <sup>b</sup>   | 8,67±0.53 <sup>a b</sup>  | 7,86±1.05 <sup>c</sup>   |
| <b>R-1</b>      | 84,35±0.39 <sup>a c</sup> | 2,88± 0.11 <sup>c</sup>   | 12,69±0.39 <sup>c</sup>   | 0,32±0.12 <sup>a b</sup> |
| <b>R-2</b>      | 85,00±0.62 <sup>a c</sup> | 2,89 ± 0.13 <sup>c</sup>  | 11,00±0.73 <sup>a c</sup> | 0,84±0.46 <sup>a b</sup> |

Grupos experimentais: controle; jejum contínuo (J) durante 7, 14, 21 e 28 dias; R-1 = 1 ciclo de jejum/realimentação; R-2 = 2 ciclos de jejum/realimentação). Valores são expressos como média ± EPM. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ), nd = não detectado.

#### 4.6 – Autofagia e apoptose

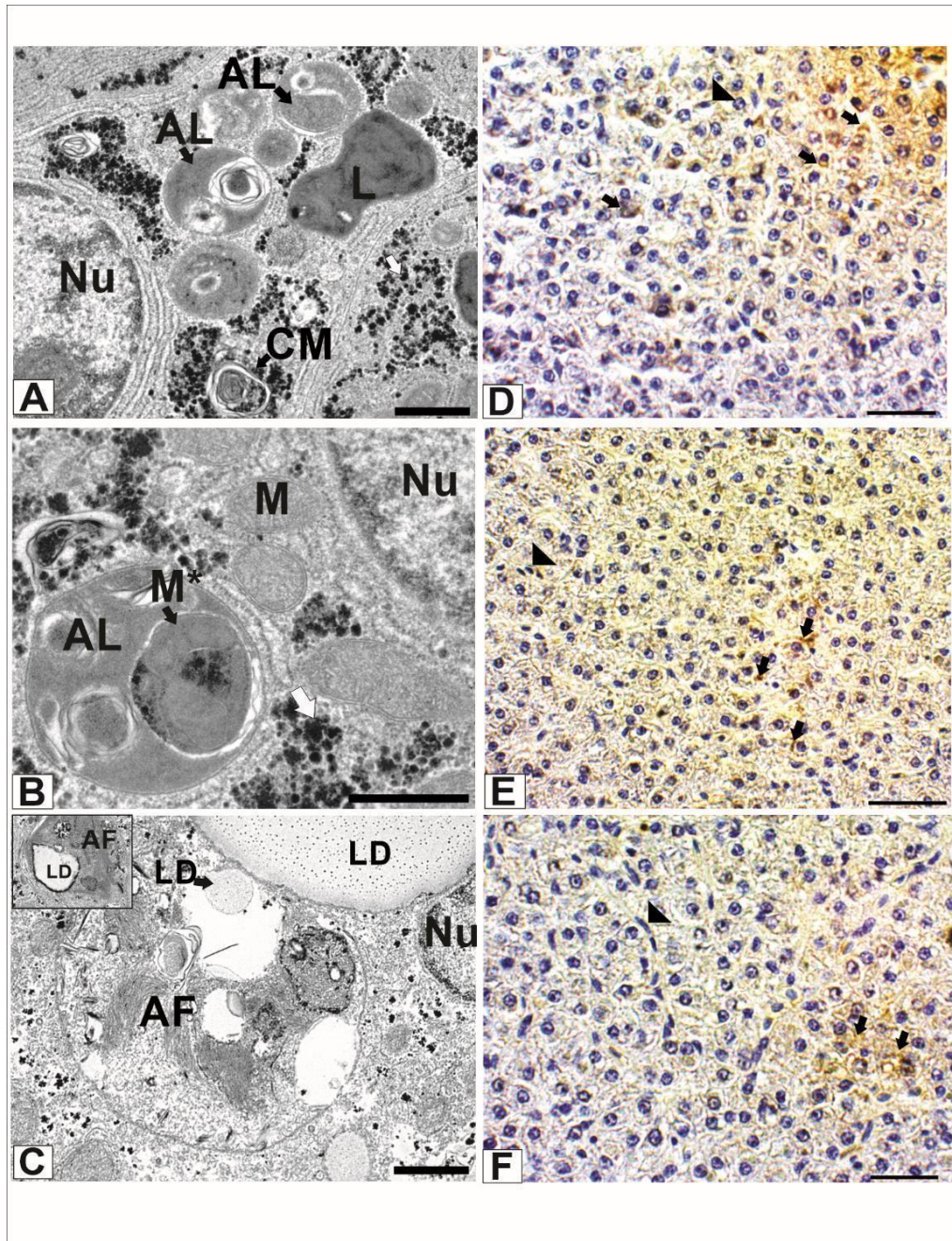
Considerando que nas análises morfológicas e bioquímicas dos grupos que passaram por ciclos de realimentação apresentaram poucas alterações em relação ao grupo controle, a autofagia e a apoptose, foram avaliadas apenas no grupo controle e nos grupos de jejum

contínuo. A quantificação das proteínas LC3 I, LC3 II e Beclin-1, importantes para a progressão da autofagia e da proteína pró-apoptótica Bax, foi avaliada para os grupos de jejum contínuo e controle por meio de Western blotting (**Figura 9**). A localização das respectivas proteínas no tecido hepático foi feita por meio da técnica de imunohistoquímica (**Figura 10 D-F**). Os grupos submetidos a 7 e 14 dias de jejum contínuo não apresentaram diferença significativa para a razão LC3II / Actina, em relação ao grupo controle. Para os grupos finais (21 e 28 dias de jejum contínuo), no entanto, foi observado um declínio da razão LC3II / Actina em relação ao grupo controle. Para Beclin-1, somente para o grupo de jejum contínuo durante 28 dias, foi observado diferença estatística na expressão da proteína, que mostrou declínio para esse grupo, embora os grupos 14 e 21 dias, tenham também mostrado uma diminuição aparente. Além disso, nos animais dos grupos controle, 7 e 14 dias de jejum, estruturas autofágicas como autofagossomos e autolissosomos foram frequentemente identificadas (**Figura 10 A-C**). A quantificação de Bax, revelou aumento na frequência de apoptose para os grupos 21 e 28 dias de jejum contínuo.



**Figura 9.** Quantificação das proteínas da via autofágica (LC3II e Beclin-1) e da via apoptótica (Bax) para o grupo controle e grupos de jejum contínuo (7, 14, 21 e 28 dias) para *O. niloticus*. Letras

diferentes representam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10** - Secções ultraestruturais do grupo jejum contínuo (14 dias) (A-C) e imunohistoquímicas do grupo jejum (14 dias) (D e E) e jejum (28 dias) (F) do fígado de *O. niloticus*. Hepatócitos apresentando estruturas autofágicas como (AL) autolisossomos (com mitocôndrias em degeneração), corpos multilamelares (CM) grandes lisossomos (L) e grânulos de glicogênio (setas brancas) A e B ; autofagossomos (AF) contendo restos celulares e gotas lipídicas (LD) C; Imunohistoquímica para Beclin-1 (D), LC3 (E) e Bax (F) mostrando hepatócitos positivos para as proteínas do estudo (setas pretas) e capilares sanguíneos (cabeça de seta). Barras de escala (A e C) 1 µm (B) 500 nm, (D e F) 20 µm, (E) 30 µm.

## 5- DISCUSSÃO

A restrição alimentar pode levar a morte celular pela falta de substratos para o metabolismo basal das células. No entanto, períodos cíclicos e naturais podem ser superados pelos animais por meio de mecanismos bioquímicos e fisiológicos que operam para a manutenção da homeostase metabólica (Collins e Anderson 1995; Potthoff, 2009). Em peixes, estratégias para lidar com essa condição incluem a mobilização de reservas endógenas, como glicogênio muscular e hepático, metabolização de lipídeos armazenados e catabolismo de proteínas. Vários aspectos da resposta à restrição alimentar de *O. niloticus* foram estudados aqui por meio de uma abordagem multiparamétrica que inclui a análise de índices biológicos, histologia, morfometria e ultraestrutura dos hepatócitos, incluindo a identificação de alterações teciduais e celulares, análise de metabólitos sanguíneos, além da análise da ocorrência de autofagia e apoptose no fígado. Os resultados observados no grupo controle e nos diferentes grupos de restrição alimentar e realimentação foram comparados para esclarecer parte do perfil de resposta de *O. niloticus* em condições experimentais de jejum e de realimentação.

A dinâmica da utilização de reservas endógenas pode ser avaliada, em parte, pelo monitoramento do índice hepatossomático (IHS) e do fator de condição (K). O IHS mostra a proporção do peso do fígado em relação ao peso total do animal. No presente estudo, os peixes submetidos ao jejum contínuo apresentaram queda significativa no IHS em relação ao controle a partir de 7 dias de tratamento sugerindo que as reservas hepáticas de glicogênio, além de lipídeos, foram utilizadas durante a primeira fase do jejum para dar suporte energético aos animais. Glicogênio é especialmente armazenado no músculo e fígado e nesse último geralmente corresponde entre 1 e 6 % do peso do órgão em peixes, podendo em algumas espécies como a carpa-comum (*Cyprinus carpio*) ser responsável por até 10% do peso hepático (Navarro e Gutierrez, 1995). Assim, alterações no IHS em animais sob jejum como detectado nesse estudo, podem estar relacionadas com a depleção dessa reserva. Este perfil de mobilização de glicogênio hepático foi observado para outras espécies de peixes, onde essa reserva constitui o principal substrato mobilizado na fase inicial do jejum, como para os teleósteos neotropicais jundiá (*Rhamdia quelen*) e tamoatá (*Hoplosternum littorale*) e os peixes marinhos como bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) e pargo (*Dentex dentex*) (Jimenez *et al.*, 2007; Barcellos *et al.*, 2010; Black e Love, 1985; Rossi *et al.*, 2015). Nesse estudo, para ambos os grupos de jejum intermitente, os animais apresentaram IHS similar ao grupo controle após realimentação. Esses resultados reforçam que existe uma rápida queda no



IHS durante os primeiros dias de jejum para *O. niloticus*, devido principalmente a depleção de glicogênio, e que esse índice é prontamente recuperado quando ocorre realimentação.

O fator de condição de Fulton (K) é amplamente utilizado em estudos de biologia de peixes (Camara *et al.*, 2011). Este fator é calculado a partir da relação entre o peso do peixe e seu comprimento, com a intenção de descrever a condição individual, que é entendida, por sua vez, como um indicador das reservas energéticas dos tecidos. Deste modo, existe a expectativa de que um peixe com condição relativamente melhor, apresente taxas de crescimento superiores, bem como maior potencial reprodutivo e de sobrevivência que outro em pior condição em situações ambientais comparáveis (Green, 2011). Esse índice, para o presente estudo, não apresentou diferença entre os grupos avaliados. A perda de peso, é significativa quando proteínas próprias são mais utilizadas para a obtenção de energia, que caracteriza a fase 3 do jejum (Castelani e Rea, 1992). A não alteração do fator de condição aqui, pode ser indicativo de que, mesmo o tempo de jejum total de 28 dias, não foi suficientemente longo para a tilápia do Nilo a ponto de aumentar a degradação de proteínas endógenas em níveis significativos. Metabolicamente é importante evitar a utilização intensa de proteínas durante o jejum (Anderson e Silva, 1990) dado que nessa condição não há influxo de aminoácidos pela dieta. A porcentagem de hematócrito também não mostrou mudança significativa durante os tratamentos, o que sugere capacidade de *O. niloticus* em manter uma produção regular de eritrócitos mesmo sob longos períodos de jejum.

O nível de glicose sanguínea é a variável fisiológica mais comumente mensurada em animais submetidos ao jejum (Rossi *et al.*, 2015). De fato, a manutenção do nível de glicose no sangue é um requisito primário para a sobrevivência e alguns tecidos, como o tecido nervoso, são essencialmente dependentes de glicose. A dinâmica da glicemia envolve vários órgãos que coordenam a homeostase da glicose como o pâncreas, que libera os hormônios glucagon e insulina, importantes para o controle glicêmico e o fígado, órgão central do metabolismo. Durante o estado alimentado, o excesso de glicose é captado pelo fígado e armazenado como glicogênio via gliconeogênese ou convertido em reservas de triglicerídeos (lipogênese *de novo*), que é depositado principalmente no tecido adiposo. O glicogênio hepático serve como um tampão de glicose sanguínea ao liberar glicose por meio de sua quebra (glicogenólise) durante o jejum. Assim, neste estudo, para se obter uma compreensão da dinâmica da glicose durante o jejum e realimentação na tilápia do Nilo, foram mensurados tanto a glicose sanguínea como sua forma polimerizada no fígado, o glicogênio. Os níveis de glicose sanguínea mostraram uma queda significativa para o grupo de 7 dias de jejum total (aproximadamente 60 % menor, em relação ao grupo controle), esses níveis foram mantidos

durante todo o experimento para os demais grupos privados de alimentação. A estabilização da glicemia, em níveis mínimos durante o jejum prolongado, provavelmente resulta da utilização de glicogênio e da ativação de processos gliconeogênicos, principalmente sustentados a partir de aminoácidos e glicerol em adição ao decréscimo no consumo de glicose, pela supressão de enzimas glicolíticas, como também observado para outros teleósteos como o bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Black e Love, 1986; Soengas, 2006). Sinergicamente, esses processos tendem a manter uma taxa glicêmica basal, embora o tempo de jejum necessário para atingir esse nível basal possa variar entre diferentes espécies de peixes (Navarro e Gutiérrez, 1995). Em contraste ao padrão observado aqui, em que os estoques de glicogênio são prontamente utilizados quando a alimentação é interrompida, algumas espécies como o salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) e o esturjão de lago (*Acipenser fulvescens*) tendem a preservar os estoques de glicogênio do fígado, degradando proteínas para gliconeogênese e/ou lipídios como substrato energético já nos momentos iniciais do jejum (Sheridan e Mommsen 1991; Gillis e Ballantyne, 1996).

Para ambos os grupos de jejum intermitente, a realimentação por 7 dias mostrou ser suficiente para que a concentração de glicose sanguínea retornasse a valores próximos daqueles observados para o grupo controle. A concentração de glicogênio hepático mostrou variação similar a glicemia sanguínea. Desse modo, para os grupos de jejum total, um declínio acentuado de glicogênio hepático foi constatado na primeira semana, refletindo a dependência dessa reserva no início do jejum. Níveis mínimos foram observados durante o restante do jejum total, com uma queda aparente para os tempos finais. Os ciclos de realimentação mostraram recuperação dos níveis em valores próximos daqueles do grupo controle, evidenciando a versatilidade do metabolismo da glicose.

Os lipídeos mais simples construídos a partir de ácidos graxos são os triacilgliceróis, também chamados de triglicerídeos, gorduras ou gorduras neutras (Voet e Voet, 2004). Por causa de seu alto conteúdo energético, os lipídios, particularmente os triacilglicerídeos, são o combustível mais importante para animais em jejum. Os lipídios podem ser armazenados no fígado, gordura visceral e músculo, com a importância quantitativa de cada tecido variando entre as espécies (Navarro e Gutierrez, 1995). A concentração de lipídeos plasmáticos, particularmente colesterol e triglicerídeos é altamente dependente do estado nutricional e do estágio de desenvolvimento do animal (Bayir et al., 2011). Estudos de lipídeos como fonte de energia para o metabolismo de peixes tem revelado a importância dessa reserva em períodos de estresse, principalmente em condição de restrição alimentar (Costas *et al.*, 2011; Jezierska *et al.*, 1982). No presente estudo, todos os grupos submetidos ao jejum contínuo apresentaram

queda de aproximadamente três vezes nos níveis de lipídeos circulantes. A depleção de triglicerídeos observada, provavelmente, se deve a demanda dos tecidos por lipídeos para  $\beta$ -oxidação nas células, glicerol para gliconeogênese e acetyl-CoA para a fosforilação oxidativa. Esses processos são importantes para manter níveis basais de ATP para a sobrevivência das células e ganham importância no jejum, sobretudo quando os estoques de glicogênio hepático estão se esgotando. Os níveis plasmáticos de colesterol podem variar amplamente em peixes sob jejum de acordo com a espécie (Fávero, 2018). O declínio de colesterol no plasma, possivelmente, ocorreu tanto como em função de seu uso como fonte de energia para os tecidos como também pela supressão de enzimas lipogênicas. Em contraste com os níveis de colesterol encontrados aqui, o teleósteo neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mostrou aumento do colesterol sérico, tanto para animais submetidos ao jejum quanto a realimentação. As prováveis causas dos níveis aumentados reportados para a espécie, incluem demanda de colesterol como precursor para síntese de hormônios, como o cortisol e para utilização como substrato energético (Fávero *et al.*, 2018). A síntese de lipídeos como colesterol é dependente de NADPH que, por sua vez, deverá estar com sua concentração reduzida devido ao jejum (Jiménez *et al.*, 2007; Navarro e Gutierrez, 1995). Em contraste com os níveis de colesterol encontrados aqui, o teleósteo neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mostrou aumento do colesterol sérico, tanto para animais submetidos ao jejum quanto a realimentação. As prováveis causas dos níveis aumentados reportados para a espécie, incluem demanda de colesterol como precursor para síntese de hormônios, como o cortisol e para utilização como substrato energético (Fávero *et al.*, 2017). Problemas no processamento de lipídeos no fígado para circulação de lipoproteínas via plasma sanguíneo podem também ter como consequência níveis baixos de lipídeos circulantes. A análise da histologia hepática de *O. niloticus*, em contraste com os níveis plasmáticos, mostrou acúmulo de lipídeos no fígado (esteatose), em particular nos tempos finais de jejum, (21 e 28 dias). De maneira distinta da observada na dinâmica da glicose/glicogênio na restrição alimentar e realimentação, nesse estudo ambos os ciclos de realimentação foram insuficientes para recuperar os níveis plasmáticos de lipídeos. Os teleósteos, assim como os mamíferos, apresentam sítios extra-hepáticos para armazenar lipídeos (Zammit and Newsholme 1979), é possível que durante a realimentação, esses locais de armazenamento, como do tecido adiposo perivisceral, estariam recuperando seus estoques lipídicos, o que retardou a normalização dos níveis plasmáticos.

Neste estudo foi avaliado também a concentração de proteínas plasmáticas. Estudos anteriores mostraram níveis diminuídos de proteínas no plasma em algumas espécies de



teleósteos, que poderia ser relacionado a demanda de aminoácidos para a gliconeogênese nos tecidos (Eschevarria, 1997; Shimeno, 1997). Para o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), foi reportado níveis reduzidos no início do jejum para proteínas plasmáticas, essa tendência, porém, se reverteu no jejum prolongado, quando houve um aumento aparente do parâmetro, e esta mudança foi atribuída à desidratação do plasma com consequente queda no volume total de sangue (Kamra, 1966). No presente estudo, no entanto, essa variável não sofreu alterações significativas em nenhum dos grupos avaliados, mesmo depois de 28 dias de jejum. Esse resultado indica que houve pouca degradação de proteínas endógenas durante a restrição alimentar para o período avaliado (28 dias) em *O. niloticus*. A capacidade dos animais de preservar aminoácidos durante o jejum apresenta benefícios óbvios, porque parte de tais substratos não podem ser sintetizados pelos animais (Castellini e Rea 1992).

Injúria hepática causada pelo jejum, foi aqui avaliada também pela concentração das transaminases hepáticas: alanina transferase (ALT) e aspartato transferase (AST). Embora esses biomarcadores não sejam específicos para danos ao fígado, o aumento de suas concentrações no plasma reflete disfunção hepática ativa (Neviem *et al.*, 2015). Essa associação, deriva do fato de estas enzimas serem mais abundantes nos hepatócitos do que em outros tipos celulares, e sua concentração elevada na circulação, é indicativo de injúria ao órgão, pelo extravasamento de conteúdo intracelular dos hepatócitos, em função de morte necrótica. Essas enzimas estavam aumentadas nesse estudo para os grupos de jejum total a partir de 14 dias para AST e 21 dias para ALT. Esses resultados indicam dano hepático para os tempos finais de jejum aqui avaliados. Para os grupos que passaram por ciclos de realimentação, apenas o grupo submetido a dois ciclos de realimentação apresentou níveis parecidos com o controle, portanto 1 ciclo de realimentação parece não ser suficiente para evitar danos as células hepáticas.

Embora aqui tenha sido observado uma depleção sustentada em todo o período de jejum total de lipídeos plasmáticos, a histologia e a ultraestrutura do fígado da tilápia do Nilo, principalmente nos tempos finais do jejum prolongado, mostraram um acúmulo de lipídeos no órgão. Em peixes, os elasmobrânquios mais primitivos armazenam a maior parte de seus triglicerídeos no fígado, enquanto os teleósteos, como *O. niloticus*, geralmente armazenam uma proporção considerável de seus lipídeos de reserva em um tecido abdominal especializado (gordura perivisceral) e/ou em adipócitos que se distribuem entre as fibras musculares (Love, 1980). Durante o estado alimentado, o fígado recebe as gorduras ingeridas e pode modificá-las (por exemplo, com elongases e dessaturases) e rearranjá-las em lipoproteínas para transporte para outros tecidos. O fígado também produz ácidos graxos a

partir de precursores de carboidratos. Além disso, o órgão pode ainda receber ácidos graxos livres de outros tecidos e processá-los (Zhou e Nilsson 1999). Em teleósteos, assim como mamíferos, os estoques de lipídeos extra-hepáticos são mobilizados durante o jejum até o fígado pela circulação, principalmente na forma de ácidos graxos não esterificados e glicerol, ligados a albumina, para suprir as necessidades metabólicas no decurso do jejum (Zammit e Newsholme 1979). No fígado, os ácidos graxos advindos dos tecidos de armazenamento podem ser esterificados novamente em TG para armazenamento na forma de gotículas lipídicas, serem exportados por meio de lipoproteínas ou  $\beta$ -oxidados para produção de ATP. Além da lipólise de TG das gotas lipídicas (GLs) internalizados para  $\beta$ -oxidação, a autofagia (processo de autodegradação lisossômica pouco seletivo e mais importante quantitativamente) e a lipofagia (Singh *et al.*, 2009) (tipo particular de autofagia de gotículas lipídicas) atuam tanto para manter o status energético da célula como a homeostase lipídica, suprindo a célula de substratos para biossíntese (lipídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc.) e também não permitindo que os lipídeos se acumulem no citosol em níveis perigosos para a célula (Lopez e Singh, 2015). Dessa forma, se o órgão não lidar de maneira adequada, regulando de forma precisa a captação e exportação de lipídeos, lipólise de GL e autofagia/lipofagia, um acúmulo de lipídeos pode se estabelecer. O acúmulo de lipídeos na célula constitui um problema, dado que o metabolismo oxidativo das células, aumentado pelo excesso de ácidos graxos livres no citosol, é uma fonte contínua de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas pela redução univalente de oxigênio molecular, que pode danificar a maioria dos componentes celulares, especialmente membranas e levar à morte celular (Morales *et al.*, 2004). Neste estudo, foi observado um acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, caracterizando esteatose macrovesicular. A esteatose, como evidenciado aqui pela morfometria, histologia e ultraestrutura do fígado, surgiu de maneira localizada e pouco extensa em alguns animais já na primeira semana de jejum e teve um aumento progressivo durante os tempos subsequentes para os grupos de jejum contínuo. Aos 21 e 28 dias de jejum, partes extensas do órgão estavam comprometidas pela difusão da esteatose, por vezes acompanhada de pontos de necrose e infiltração leucocitária. De fato, a perda de triglicerídeos do fígado durante a inanição não é um fenômeno universal e alguns animais como os mamíferos mustelídeos fúeta (*Mustela putorius*) e o vison-americano (*Neovison vison*) exibem uma tendência de retenção e/ou acúmulo de gordura no fígado em condições de privação de nutrientes da dieta (Nieminen *et al.*, 2009; Rouvinen-Watt *et al.*, 2010). Para *O. niloticus*, outros autores identificaram uma tendência natural para a espécie de acumular lipídios no fígado quando submetidas a dietas hipercalóricas (Tao *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018). Embora o

fornecimento de dietas hipercalóricas para peixes possa resultar em acúmulo de lipídeos no fígado (Zhang *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2020), o desenvolvimento dessa condição para teleósteos, em função da restrição alimentar é incomum, e foi reportada também para a enguia americana (*Anguilla rostrata*) (Moon, 1983).

O aparente paradoxo da acumulação de lipídeos nos hepatócitos durante a restrição alimentar, pode estar relacionado com a autofagia, processo de reciclagem de componentes celulares para reutilização na célula, importante no jejum. Segundo Nguyene Olzmann, (2017), a necessidade do aumento da autofagia para atender a demanda metabólica das células durante a restrição alimentar gera, como efeito colateral, um aumento nos ácidos graxos livres no citosol, proveniente de membranas que foram degradadas pela autofagia. Assim, a fim de se mitigar danos celulares lipotóxicos, a formação de gotículas lipídicas (GLs) atuaria como um sumidouro de ácidos graxos do citosol, evitando seu acúmulo e, conseqüentemente, seus efeitos deletérios, como oxidação de biomoléculas. As GLs são organelas neutras de armazenamento de lipídios que fornecem uma fonte rápida de ácidos graxos durante o jejum. Possuem um núcleo de lipídios neutros (triglicerídeos e ésteres de colesterol) circundados por uma monocamada de fosfolípido que contém proteínas integrais e periféricas (Singh *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo que essas organelas de armazenamento têm sua formação acelerada pela autofagia, GLs podem também ser degradadas pela autofagia o que revela um papel complexo do processo autofágico na homeostase lipídica, especialmente durante o jejum (Ogasawara *et al.*, 2020). Contudo, o acúmulo de GLs pode causar esteatose. Assim, até certo ponto, o acúmulo de lipídeos em GLs parece ter uma ação protetora contra a hepatotoxicidade mediada por excesso de ácidos graxos livres (Nguyen e. Olzmann, 2017). Ao ultrapassar um limiar seguro, entretanto, efeito inverso se estabelece e as GLs passam a ser fonte de lipotoxicidade, caracterizando a esteatose e eventualmente a esteato-hepatite (Day, 1998; Martinez-Lopez e Singh, 2015). Deste modo, as evidências recentes da literatura (Alves-Bezerra e Cohen, 2018) sugerem que os hepatócitos devem ser capazes de manter um balanço entre o influxo, utilização e exportação de lipídeos de modo a garantir a homeostase lipídica. Assim, se um ou mais desses processos se encontrar desregulado, pode ocorrer acúmulo de lipídeos em um nível tóxico. Três formas da célula controlar a quantidade e tamanho das GLs são a conversão dos TG nela armazenados novamente em ácidos graxos no citosol pela ação de lipases, pela autofagia que pode degradar GLs pela via lisossomal junto de outros componentes celulares ou pela lipofagia, um tipo de autofagia específica de GLs (Zechner *et al.*, 2017). No citosol, os ácidos graxos livres provenientes desses processos, se somam àqueles vindos da circulação e também daqueles formados pela lipogênese *de novo* e devem

ser oxidados nos peroxissomos ou nas mitocôndrias, serem rearranjados na forma de TG para compor novamente GLs ou empacotados em lipoproteínas para exportação. Durante o jejum, a fonte mais provável de lipídeos para os hepatócitos deve ser pela captação de ácidos graxos livres provenientes de tecidos extra-hepáticos de armazenamento, como a gordura perivisceral (Alves-Bezerra e Cohen, 2018). Nesse caso, se a exportação de lipoproteínas não ocorrer de maneira eficiente, esses ácidos graxos podem se acumular nessas células. Assim, o processamento de ácidos graxos e ésteres de colesterol em lipoproteínas e sua exportação para a circulação, são importantes tanto para impedir o acúmulo de lipídeos no citosol como para suprir tecidos extra-hepáticos com lipídeos para manutenção da produção de ATP no estado de crise energética. Em humanos, embora vários fatores possam levar à esteatose hepática, os ácidos graxos circulantes são a principal fonte de lipídios hepáticos na doença hepática gordurosa não alcoólica (Donnelly *et al.*, 2005).

A ocorrência e intensidade da autofagia nos grupos submetidos ao jejum contínuo deste estudo mostrou aumento aparente no início do jejum. Um acréscimo do fluxo autofágico é esperado nesse contexto. Entretanto, nos tempos finais de jejum contínuo (21 e 28 dias), as proteínas autofágicas quantificadas exibiram valores significativamente menores em relação ao grupo controle, o que indica que a autofagia, neste caso, foi suprimida no final do jejum. É provável que a queda no fluxo autofágico tenha ocorrido em função do acúmulo de lipídeos, condição associada a supressão da autofagia (Wang, 2015). Com a autofagia e lipofagia suprimidas, a degradação das GLs pode ter sido comprometida favorecendo o acúmulo excessivo dos lipídeos e o estabelecimento da esteatose. Entretanto, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da esteatose no jejum prolongado para *O. niloticus* precisam ser melhor investigados.

Nossa hipótese para o acúmulo de lipídeos observado no fígado de *O. niloticus*, envolve uma resposta inata insuficiente para manter a homeostase lipídica no órgão, dado que *O. niloticus* é um animal onívoro, de intestino alongado (Smith *et al.*, 2000) com predominância de fitoplâncton na composição de sua dieta. Essas características sugerem que a espécie está continuamente absorvendo nutrientes pela via enteral, e não passa por eventos de jejum prolongados na natureza, razão pela qual, possivelmente, não conta com mecanismos eficientes para lidar com períodos longos de jejum. Assim, a criação de *O. niloticus* em ambientes confinados e com filtração constante da água, similares as condições do experimento aqui executado, não favorece a proliferação de fitoplâncton e o animal passa a contar, essencialmente, com o alimento fornecido. Se esta fonte também estiver ausente, as reservas endógenas de nutrientes serão utilizadas para fornecimento de energia. Até 7 dias de

jejum, alterações significativas na morfologia e fisiologia hepática estão ausentes e as depleções de reservas energéticas, retornam a níveis similares ao grupo controle por meio da realimentação por 7 dias. Os resultados encontrados aqui, principalmente o aumento progressivo da esteatose e aumento do dano lipotóxico seguido da apoptose mais frequente (reação para Bax) indicam uma dificuldade de *O. niloticus* em lidar com o jejum total acima de 21 dias, com desregulação da homeostase lipídica evidente. O aumento da apoptose nos tempos finais do jejum está possivelmente relacionado com o agravamento da esteatose e dano lipotóxico, como evidenciado pelo valores significativamente mais altos de malonaldeído (MDA). De fato, a peroxidação lipídica desempenha um papel importante na apoptose, uma vez que seus produtos, incluindo MDA, interagem com receptores de membrana e fatores indutores/ repressores de transcrição e podem estimular a ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Su *et al.*, 2019). O aumento observado neste estudo da proteína promotora da morte celular apoptótica intrínseca Bax, revela que nos tempos finais de jejum (21 e 28 dias) a desregulação no metabolismo de lipídeos no fígado da tilápia do Nilo ocasionou morte apoptótica no parênquima hepático. A análise de lâminas histológicas dos grupos 21 e 28 dias de jejum total, também mostrou áreas de necrose pontuais no tecido hepático, em consonância com a elevação de transaminases hepáticas para estes mesmos grupos. Esta alteração, provavelmente, ocorreu como consequência do dano lipotóxico gerado pelo acúmulo de lipídeos e possivelmente representa a evolução da esteatose para esteato- hepatite nesses animais.

## 6 – CONCLUSÕES

- *O. niloticus* pode tolerar aproximadamente 7 dias de jejum sem alterações relevantes na fisiologia do fígado, e as reservas de glicogênio hepático e lipídeos são utilizadas para sustentar o metabolismo basal.
- A restrição alimentar por 7 dias, seguido por igual período de realimentação pode recuperar a maioria dos parâmetros alterados pelo jejum, e dois ciclos de jejum/realimentação, parecem ser suficientes para evitar danos hepáticos e manter a homeostase tecidual.
- Períodos prolongados de jejum (21 dias ou mais) causam perda da homeostase lipídica no fígado, com estabelecimento de esteatose macrovesicular, causando dano lipotóxico e diminuição da autofagia, que levam a aumento da apoptose, além de necrose e inflamação do

parênquima hepático.

## 7 – PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da esteatose no jejum prolongado para *O. niloticus* precisam ser melhor investigados. Algumas das perguntas a serem respondidas são: se nos tempos finais do jejum aqui avaliados, a peroxidação lipídica está aumentada, como está a expressão de enzimas antioxidantes nos hepatócitos de *O. niloticus* sobre jejum prolongado? A indução da autofagia por meio de fármacos, como a metformina, teria a capacidade de contribuir para o reestabelecimento da homeostase lipídica nos tempos finais de jejum? Qual a participação da lipofagia no decurso do acúmulo de lipídeos aqui observado? Quais são as vias comuns e distintas do surgimento de esteatose para *O. niloticus* na dieta hipercalórica e no jejum prolongado? Em comparação com outras espécies de teleósteos que mantêm a homeostase lipídica no jejum, quais mecanismos genéticos e comportamentais poderiam estar relacionados com esta resposta incomum ao jejum para *O. niloticus*? De que forma os estudos da dinâmica de lipídeos no fígado de *O. niloticus* pode colaborar com a produção comercial da espécie? Dado a facilidade de acumular lipídeos no fígado tanto quando submetida à dietas hipercalóricas como no jejum, *O. niloticus* poderia ser útil para a pesquisa em desordem metabólicas que envolvem acúmulo de lipídeos no fígado, como na doença hepática não alcoólica gordurosa?

## REFERÊNCIAS

- Alves-Bezerra, M. & Cohen, D. E. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 8, 1–22 (2018).
- Anderson, T., De Silva, S., Nutrition. In: Lucas, J.S., Southgate, P.C. (Eds.), *Aquaculture; Farming Aquatic Animals and Plants*. Blackwell Publishing, Victoria, Australia, pp.146–171. (2003).
- Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D. & Souers, A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 273–284 (2017).
- Bar, N. Prolonged Starvation in Fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Early view, 1–46 (2014).
- Barboza, P. S. & Hume, I. D. Physiology of intermittent feeding: Integrating responses of vertebrates to nutritional deficit and excess. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 250–264 (2006).

- Barcellos, L. J. G., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R. M. & Ferreira, D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 300, 231–236 (2010).
- Barreto, R. E., Moreira, P. S. A. & Carvalho, R. F. Sex-specific compensatory growth in food-deprived Nile tilapia. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 36, 477–483 (2003).
- Bayir, A. *et al.* Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 159, 191–196 (2011).
- Bechmann, L. P. *Et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* 56, 952–964 (2012).
- Bezault, E., *et al.* Spatial and temporal variation in population genetic structure of wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) across Africa. *BMC Genet.* 12, 102. (2011).
- Black D, Love RM (1985) The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J Comp Physiol B* 156:469–479.
- Black D, Love RM (1986) The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J Comp. Physiol B* 156:469–479.
- Bond C. E. *Biology of Fishes*, Saunders College Publishing, Florida. p. 750 (1996).
- Camara, E. M., Caramaschi, É. P. & Petry, A. C. Fator de condição: Bases conceituais, aplicações e perspectivas de uso em pesquisas ecológicas com peixes. *Oecologia. Aust.* 15, 249–274 (2011).
- Castellini, M. A. & Rea, L. D. The biochemistry of natural fasting at its limits - Castellini & Rea 1992 - *Experientia*. 48, 8 (2007).
- Cecconi, F. & Levine, B. The Role of Autophagy in Mammalian Development: Cell Makeover Rather than Cell Death. *Dev. Cell* 15, 344–357 (2008).
- Chantranupong, L., Wolfson, R. L. & Sabatini, D. M. Nutrient-sensing mechanisms across evolution. *Cell* 161, 67–83 (2015).
- Cherel, Y., Stahl, J., Le, Y. & Eugene, P. Ecology and physiology of fasting in king penguin chicks. *The auk.* . 254–262 (1987).
- Collins e Anderson. The regulation of endogeneous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.* 47, 1004–1015 (1995).
- Costas, B. *et al.* Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: Effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 495–504 (2011).

- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* 116, 205–219 (2004).
- Day, C. P. & James, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two ‘Hits’? *Gastroenterology* 114, 842–845 (1998).
- De Duve e Wattiaux. Functions of lysosomes. Universitaires. (1966).
- Donnelly, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1343–1351 (2005).
- Echevarría, G., Martínez-Bebíá, M. & Zamora, S. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* 118, 111–123 (1997).
- Efeyan, A., Comb, W. C. & Sabatini, D. M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517, 302–310 (2015).
- Fadeel, B. & Orrenius, S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* 258, 479–517 (2005).
- Favero, G. C., Gimbo, R. Y., Franco Montoya, L. N., Zanuzzo, F. S. & Urbinati, E. C. Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquac. Res.* 49, 359–366 (2018).
- Federici, G., Shaw, B. J. & Handy, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415–430 (2007).
- Federici, G., Shaw, B. J. & Handy, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415–430 (2007).
- Furne, M. & Sanz, A. Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation. *Handb. Famine, Starvation, Nutr. Deprivation* 1–16 (2017). Doi:10.1007/978-3-319-40007-5
- Gergs, A. & Jager, T. Body size-mediated starvation resistance in an insect predator. *J. Anim. Ecol.* 83, 758–768 (2014).
- Gillis, T. E. & Ballantyne, J. S. The effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in lake sturgeon. *J. Fish Biol.* 49, 1306–1316 (1996).
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, New York, v.56, p.35-39, (1971).
- Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891–2906 (2004).



- Green, A. J. Mass / Length Residuals : Measures of Body Condition or Generators of Spurious Results ? Author ( s ): Andy J . Green Published by : Wiley Stable
- Groscolas, R. & Robin, J. P. Long-term fasting and re-feeding in penguins. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 128, 643–653 (2001).
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis : Abstract : *Nature*. *Nature* 407, 770–776 (2000).
- Ho, T. T. Et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 543, 205–210 (2017).
- Hohtola E. Thermoregulatory Adaptations to Starvation in Birds. In: McCue M. (eds) *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer, Berlin, Heidelberg. (2012)
- Holmstrup, M. Et al. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762 (2010).
- Hong, S. H. Et al. Nuclear receptors and metabolism: From feast to famine. *Diabetologia* 57, 860–867 (2014).
- Huang, L. et al. Ameliorative effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract on Tilapia fatty liver via the PPAR and P53 signaling pathway. *Sci. Rep.* 8, 1–11 (2018).
- Jenni, L. & Jenni-Eiermann, S. Fuel Supply and Metabolic Constraints in Migrating Birds. *J. Avian Biol.* 29, 521 (1998).
- Jezierska, B., Hazel, J. R. & Gerking, S. D. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acids. *J. Fish Biol.* 21, 681–692 (1982).
- Jia, R. *et al.* Effects of High-Fat Diet on Steatosis, Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Liver of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Front. Mar. Sci.* 7, 1–14 (2020).
- Jiménez, A., Guedes, M. J., Morales, A. E. & Oliva-Teles, A. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265, 325–335 (2007).
- Kamra, S. K. Effect of Starvation and Refeeding on Some Liver and Blood Constituents of Atlantic Cod ( *Gadus morhua* L. ) . *J. Fish. Res. Board Canada* 23, 975–982 (1966).
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. & Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 571–580 (2011).
- Kendeighsc\_1945\_resistancetohungerinbirds.pdf.
- King, J. R. & Murphy, M. E. Periods of nutritional stress in the annual cycles of endotherms: Fact or fiction? *Integr. Comp. Biol.* 25, 955–964 (1985).

- Klionsky, D. J. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931–937 (2007).
- Klionsky, D. J. Et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy* 6, 438–448 (2010).
- Klionsky, D. J. Et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222 (2016).
- L.S.T Vicente ; C.E Fonseca-Alves. Impact of Nile tilapia in non-native environment.pdf. *Pakistan Journal of Biological Sciences* (2013).
- Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 759–774 (2013).
- Larsson, A. Kerstin Lewander, Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L., *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, Volume 44. (1973)
- Lee, J., Gao, Y. & Lee, J. Compensatory Responses of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under Different Feed- Deprivation Regimes Compensatory Responses of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under Different Feed-Deprivation Regimes. 15, 305–311 (2015).
- Leidal, A. M., Levine, B. & Debnath, J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nat. Cell Biol.* 20, 1338–1348 (2018).
- Lèveque, C. (2002) - Out of Africa: The success story of tilapias. *Environmental Biology of Fishes*, vol. 64, n. 4, p. 461-464.
- Love, R. M. *The Chemical Biology of Fishes*, vol. II. Academic Press, London. (1980).
- Maiuri, M. C. Et al. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26, 2527–2539 (2007).
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752 (2007).
- Martinez-Lopez, N. & Singh, R. Autophagy and Lipid Droplets in the Liver. *Annu. Rev. Nutr.* 35, 215–237 (2015).
- Mccue, M. D. Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation. *Comp. Physiol. Fasting, Starvation, Food Limit.* 1–430 (2013). Doi:10.1007/978-3-642-29056-5.
- Mccue, M. D. Division of Comparative Physiology and Biochemistry , Society for Integrative and Comparative Biology Western Diamondback Rattlesnakes Demonstrate Physiological and Biochemical Strategies for Tolerating Prolonged Starvation. (2016).
- Mccue, M. D. Preface: The comparative physiology of fasting and starvation. *Comp. Physiol. Fasting, Starvation, Food Limit.* 9783642290, v–ix (2012).

- Mccue, M. D. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 156, 1–18 (2010).
- Menahan, L. A. & Sobocinski, K. A. Comparison of carbohydrate and lipid metabolism in mice and rats during fasting. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 74, 859–864 (1983).
- Metcalfé, N. B., Monaghan, P. & Metcalfe, N. Compensation for a bad start: grow now, pay later? 16, 254–260 (2001).
- Mizushima, N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* 20, 521–527 (2018).
- Moon, T. W. Changes in tissue ion contents and ultrastructure of food-deprived immature American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur). *Canadian Journal of Zoology*, 61(4), (1983).
- Navarro, I. & Gutiérrez, J. Fasting and starvation. *Biochem. Mol. Biol. Fishes* 4, 393–434 (1995).
- Nguyen, P. *et al.* Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 92, 272–283 (2008).
- Nguyen, T. B. & Olzmann, J. A. Lipid droplets and lipotoxicity during autophagy. *Autophagy* 13, 2002–2003 (2017).
- Nieminen, P., Mustonen, A. M., Kärjä, V., Asikainen, J. & Rouvinen-Watt, K. Fatty acid composition and development of hepatic lipidosis during food deprivation-mustelids as a potential animal model for liver steatosis. *Exp. Biol. Med.* 234, 278–286 (2009).
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 3448–3459 (2013).
- Ogasawara, Y., Tsuji, T. & Fujimoto, T. Multifarious roles of lipid droplets in autophagy – Target, product, and what else? *Semin. Cell Dev. Biol.* 108, 47–54 (2020).
- Palma, E. H. Da et al. Estratégia alimentar com ciclos de restrição e realimentação no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. *Ciência Rural* 40, 391–396 (2010).
- Potthoff, M. J. et al. FGF21 induces PGC-1 $\alpha$  and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10853–10858 (2009).
- Pough, R. H. The advantages of ectothermy of tertrapods. *Am. Nat.* 115, 92–112 (1980).
- Protzer, U., Maini, M. K. & Knolle, P. A. Living in the liver: Hepatic infections. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 201–213 (2012).

- Qu, X. Et al. Autophagy Gene-Dependent Clearance of Apoptotic Cells during Embryonic Development. *Cell* 128, 931–946 (2007).
- Rajkumar, K. S., Kanipandian, N. & Thirumurugan, R. Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Appl. Nanosci.* 6, 19–29 (2016).
- Reddy, J. K. & Hashimoto, T. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ : An Adaptive Metabolic System. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 193–230 (2001).
- Reddy, J. K. & Rao, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 290, 852–858 (2006).
- Riddle, M. R. et al. Insulin resistance in cavefish as an adaptation to a nutrient-limited environment. *Nature* 555, 647–651 (2019).
- Robinson, A. M. & Williamson, D. H. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 60, 143–187 (1980).
- Roe, J. H. & Dailey, R. E. Determination of glycogen with the anthrone reagent. *Anal. Biochem.* 15, 245–250 (1966).
- Rossi, A., Cazenave, J., Bacchetta, C., Campana, M. & Parma, M. J. Physiological and metabolic adjustments of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae) during starvation. *Ecol. Indic.* 56, 161–170 (2015).
- Rouvinen-Watt, K. et al. Rapid development of fasting-induced hepatic lipidosis in the American mink (*Neovison vison*): Effects of food deprivation and re-alimentation on body fat depots, tissue fatty acid profiles, hematology and endocrinology. *Lipids* 45, 111–128 (2010).
- Santos, R., Pabon, A., Silva, W., Silva, H. & Pinho, M. Population structure and movement patterns of blackbelly rosefish in the NE Atlantic Ocean (Azores archipelago). *Fisheries Oceanography* 29, (2020).
- Sales, C. F. et al. Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotrop. Ichthyol.* 15, 1–12 (2017).
- Schlegel, A. & Stainier, D. Y. R. Lessons from ‘lower’ organisms: What worms, flies, and zebrafish can teach US about human energy metabolism. *Plos Genet.* 3, 2037–2048 (2007).
- Secor, S. M. & Carey, H. V. Integrative physiology of fasting. *Compr. Physiol.* 6, 773–825 (2016).
- Secor, S. M. & Lignot, J. H. Morphological plasticity of vertebrate aestivation. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 49, 183–208 (2010).

- Segner, H. & Braunbeck, T. Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiol. Biochem.* 5, 79–97 (1988).
- Sheridan, M. A. & Mommsen, T. P. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81, 473–483 (1991).
- Shi, Y. Et al. Oxidative stress and histopathological alterations in liver of *Cyprinus carpio* L. Induced by intraperitoneal injection of microcystin-LR. *Ecotoxicology* 24, 511–519 (2015).
- Shimeno, S., Ming, D. C. & Takeda, M. Metabolic Response to Dietary Carbohydrate to Lipid Ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* (Japanese Ed. 59, 827–833 (1993).
- Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T. & Kheyyali, D. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 151, 371–377 (1997).
- Singh, R. *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135 (2009).
- Smith, B. J., Smith, S. A., Tengjaroenkul, B. & Lawrence, T. A. Gross morphology and topography of the adult intestinal tract of the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* L. *Cells Tissues Organs* 166, 294–303 (2000).
- Soengas, J. L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S. & Moon, T. W. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: Changes with food deprivation and refeeding. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, 810–821 (2006).
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., ... Peng, Z.-Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-13. (2019).
- Tao, Y. F. *et al.* Identification and characterization of lipid metabolism-related microRNAs in the liver of genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) by deep sequencing. *Fish Shellfish Immunol.* 69, 227–235 (2017).
- Usha Rani, A. & Ramamurthi, R. Histopathological alterations in the liver of freshwater teleost *Tilapia mossambica* in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 221–226 (1989).
- Vicenti, I. S. T. & Fonseca-Alves, C.E. Impact of introduced Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on non-native ecosystems. *Pakistan Journal of Biological Sciences* (2013).
- Voet, D, Voet J. G, *Fundamentals of Biochemistry*, 4th Edition, Wiley, (2004).
- Wang, T., Hung, C. C. Y. & Randall, D. J. The comparative physiology of food deprivation: From Feast to Famine. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 223–251 (2006).

- Wang, Y., Li, C., Qin, J. G. & Han, H. Cyclical feed deprivation and refeeding fails to enhance compensatory growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac. Res.* 40, 204–210 (2009).
- Weber, A. A. Et al. Effects of metal contamination on liver in two fish species from a highly impacted neotropical river: A case study of the Fundão dam, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190, (2020).
- Williansom, M. *Biological Invasions*. Chappman Hall, London. Pg 224. (1996).
- Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12,814–822 (2010).
- Zammit, V. A. & Newsholme, E. A. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. *Biochem. J.* 184, 313–322 (1979).
- Zechner, R., Madeo, F. & Kratky, D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: Two sides of the same coin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 671–684 (2017).
- Zhang, D. *et al.* A global transcriptional analysis of *Megalobrama amblycephala* revealing the molecular determinants of diet-induced hepatic steatosis. *Gene* 570,255–263 (2015).
- Zhou, L. & Nilsson, Å. Fasting increases tissue uptake and interconversion of plasma unesterified linoleic acid in guinea pigs. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1436, 499–508 (1999).