

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Efeito da dieta na expressão adipogénica e nos neurotransmissores monoaminérgicos da corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801).**

**Francisca Isabel da Silva Brito**

Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar - Recursos Marinhos -  
Especialização em Aquacultura e Pescas

2014

Francisca Isabel da Silva Brito

**Efeito da dieta na expressão adipogénica e nos neurotransmissores monoaminérgicos da corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801).**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos – Especialização em Aquacultura e Pescas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – José Fernando Magalhães  
Gonçalves  
Categoria – Professor auxiliar  
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel  
Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Rodrigo Otávio de Almeida Ozório  
Categoria – Investigador auxiliar  
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel  
Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Alfredo Damasceno-Oliveira  
Categoria – Investigador  
Afiliação – Centro interdisciplinar de Investigação  
Marinha e Ambiental.

## **Agradecimentos**

A conclusão desta dissertação de mestrado contou com importantes contributos, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível. Estou certa de que esta seção de agradecimentos não será suficiente para expressar o meu agradecimento a todas as pessoas que, de uma forma direta ou indirecta, contribuíram, não só para o meu crescimento académico, como também para o meu crescimento como indivíduo que trabalha e contacta com os outros, em contexto de trabalho e fora dele.

Desta forma, deixo poucas palavras, mas com um um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

Ao Professor Doutor José Fernando Gonçalves que me proporcionou esta oportunidade de trabalho e que desde o início depositou em mim a sua confiança. O meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito contribuíram para o meu enriquecimento científico. Obrigada ainda pela oportunidade que me proporcionou de participar em ações de formação de forma a complementar a minha formação.

Ao Professor Doutor Rodrigo Ozório que me recebeu na sua casa, que me orientou, que me consolou e que nunca deixou de estar atento ao que se passava não só comigo, como com os meus colegas. Foi desde início um grande coordenador de trabalho. Expresso aqui o meu profundo agradecimento pela co-orientação e apoio incondicionais que elevaram os meus conhecimentos científicos e o meu sentido de responsabilidade. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no seu Grupo de Investigação.

Ao Professor Doutor Alfredo Damasceno-Oliveira o meu sincero agradecimento pela co-orientação neste Projeto. Muito obrigada pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. Foi sem dúvida um elemento fundamental na conclusão deste projeto.

Ao Sthelio que permitiu que esta tese de Mestrado fosse integrada no seu trabalho de Doutoramento. Não posso deixar de agradecer toda a amizade, atenção e carinho que me prestou, não só enquanto estive em Portugal, bem como depois de ter partido para o Brasil. Obrigada!

Ao Professor Doutor Filipe Castro que se disponibilizou a partilhar os seus conhecimentos na área. Obrigada pela colaboração e disponibilização do seu laboratório, para que dessa forma pudéssemos desenvolver este trabalho. Sempre que precisamos

esteve disposto a reunir-se connosco e explicar-nos com toda a paciência todas as nossas dúvidas. Foi, desde o início, um elemento fulcral no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Isabel Cunha, que nos momentos críticos deste trabalho nos brindou com a sua sabedoria. Obrigada pelo seu contributo neste trabalho, não só ao nível intelectual como ao nível da disponibilização de materiais.

À Professora Doutora Luísa Valente que me recebeu no seu grupo de trabalho, que teve para comigo um comportamento de cordialidade e sempre disposta a ajudar em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório, Maria João, Andreia, Luís, Augusto, Ivone e Mónica. Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda. Vocês foram o meu suporte diário. Foi convosco que partilhei todos os bons e menos bons momentos no laboratório. Obrigada por tudo o que me ensinaram dentro e fora do laboratório. Vocês foram muito importantes para que eu encarasse o trabalho com especial motivação!

Aos restantes elementos do LANUCE que sempre tinham uma palavra amiga e que em algum momento todos me ensinaram algo! Obrigada Vera, Sónia, Emílio, Marta e Nicole.

O meu agradecimento ao Fernando e ao Eloi que estiveram sempre presentes nos dias das amostragens e cuja ajuda foi indispensável.

Agradeço aos restante elementos do CIIMAR, que de alguma forma, numa ou outra ocasião deste percurso foram prestáveis comigo e estiveram sempre dispostos a prestar-me ajuda!

Ao Coordenador do Mestrado em Ciências do Mar e Recursos Marinhos-Especialidade em Aquacultura e Pescas, Professor Doutor Eduardo Rocha, agradeço a oportunidade que tive em frequentar este Mestrado, que foi muito importante para a minha formação académica e científica.

À minha família, em especial à minha mãe e à minha irmã que desde sempre apoiaram todas as minhas decisões e que sem dúvida, sem o seu suporte eu não teria tido a oportunidade de concluir este mestrado! Desejo que a finalização desta etapa da minha

vida possa de alguma forma retribuir tudo o que me ofereceram durante anos. A vocês dedico esta tese!

Ao Pedro que me acompanhou desde início neste percurso e que se revelou um excelente companheiro.

Aos meus amigos, que sempre tiveram um momento para ouvir as minhas dúvidas e me aconselharam sempre que precisei. Obrigada, Rita, Juliana, Catarina, Ana Sofia, Luís, Bruno e Jerusa.

## Resumo

Os óleos de peixe são uma fonte de ácidos gordos altamente insaturados da série n-3 (HUFA n-3) muito importante para os humanos. Uma vez que a pesca se encontra estagnada, o fornecimento de HUFA n-3 é garantido pela aquacultura que, por sua vez, está dependente dos óleos de peixe provindos destas capturas. Uma alternativa à utilização dos óleos de peixe são os óleos de origem vegetal.

Porém os óleos vegetais são ricos em ácidos gordos polinsaturados da série n-3 (PUFA n-3), como o ácido linoleico (LA) e o ácido- $\alpha$ -linoleico (ALA) e pobres em HUFA n-3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), abundante nos óleos de peixe. Além disso, a capacidade dos peixes converterem os PUFA C<sub>18</sub> em EPA e DHA é diferente. Os peixes de água doce, que têm naturalmente uma dieta pobre em HUFA, são mais eficientes a biossintetizar HUFA comparativamente com as espécies marinhas, que têm uma dieta rica em HUFA e são normalmente carnívoros.

O DHA e o EPA são ácidos gordos essenciais que estão envolvidos na manutenção da estrutura da membrana celular, na atividade das proteínas membranares, no sistema monoaminérgico do cérebro, entre outras funções. Estes ácidos gordos são tão importantes que representam mais de metade do peso seco do cérebro.

Porém, o aumento do grau de saturação dos ácidos gordos aumenta a suscetibilidade das membranas celulares sofrerem a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica ocorre pela ação dos radicais livres sobre as membranas celulares e por isso, a suplementação da dieta com antioxidantes, como é o caso do selênio, poderá ser importante no combate a este evento, que prejudica as membranas celulares.

Portanto, de forma a verificarmos a capacidade de biossíntese endógena dos HUFA, na corvina, bem como os benefícios que a suplementação das dietas com selênio poderão ter sobre a redução da peroxidação lipídica, propusemos dois objetivos para este trabalho:

- ✓ Estudar a influência da substituição total de 12% de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais (compostos por linhaça, colza e soja), na expressão dos genes, *fads2* (que codifica uma dessaturase) e da *elov15* (que codifica uma elongase), bem como sobre a concentração de alguns neurotransmissores, tais como: dopamina (DA), noradrenalina (NA), adrenalina (A) e serotonina (5-HT) bem como de alguns metabolitos destas monoaminas como: ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-Hidroxi-indol-acético (5-HIAA), no cérebro da corvina;
- ✓ Analisar o efeito do selênio na expressão dos genes *fads2* e *elov15* e na concentração de alguns neurotransmissores, tais como: DA, NA, A e 5-HT, bem

como de alguns metabolitos destas monoaminas como: DOPAC, HVA, 5-HIAA, no cérebro da corvina.

Para tal, após o respetivo período de ensaio (60 dias para a análise da expressão génica e 90 dias para a quantificação de monoaminas), procedeu-se à análise da expressão génica pela técnica de RT-PCR, e à quantificação da concentração de monoaminas por HPLC-DE.

Os nossos resultados permitiram-nos concluir que, a substituição de óleos tem um efeito positivo sobre a expressão génica, principalmente da *fads2*, que é a enzima envolvida no passo crítico da biossíntese de HUFA. Esta situação também conduziu ao aumento da concentração de monoaminas no cérebro, uma vez que a libertação de monoaminas pelos neurónios poderá ter sido afetada.

A suplementação das dietas com selénio favoreceu assim a expressão génica e teve um efeito sobre o sistema monoaminérgico nesta espécie, muito provavelmente pelo seu contributo na diminuição da peroxidação lipídica das membranas celulares.

## Abstract

Fish oil is the most important source of n-3 HUFA for humans. With the decline of fisheries, n-3 HUFA is being provided by rapidly expanding aquaculture (FAO, 2012), which is expanding rapidly but depends also of fish oil for growth. The use of vegetable oils (VO) as fish oil alternatives have been widely investigated.

Vegetable oils are rich in C<sub>18</sub> PUFA, like alpha linoleic acid (ALA) and linoleic acid (LA), but poor of the docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA).

The capacity of fish species to thrive on diets containing only the C<sub>18</sub> PUFA in EPA and DHA is different. Fresh water fish diets are naturally vegetarian and generally lack HUFA. Despite that, they are able to convert 18:2 *n*-6 and 18:3 *n*-3 to HUFA more efficiently than marine species, whose predominantly carnivorous diet is rich in HUFA.

DHA and EPA are essential fatty acids involved in the maintenance cell membrane structure, in the activity of membrane proteins, in monoaminergic system of brain, among other essential functions. These fatty acids are so important to the normal functioning of brain, that EPA and DHA represent almost half of the dry weight of the brain.

However, the increasing degree of saturation of the fatty acids increases the susceptibility of cellular membranes suffered lipid peroxidation. Lipid peroxidation is the result of the harmful action of free radicals on cell membranes. Therefore, dietary supplementation with antioxidants, such as selenium, may be important in preventing the event that damages the cell membranes.

Therefore, in order to verify the ability of HUFA biosynthesis and the benefits of antioxidant supplementation in the reduction of lipid peroxidation, propose two objectives for this study were proposed:

- to evaluate the effects of dietary lipid profile on *fads2* (fatty acyl desaturase gene) and *elovl5* (fatty acyl elongase gene) expression in liver and brain of meagre (*Argyrosomus regius*) and on the concentration of some neurotransmitters, such as dopamine, noradrenaline, adrenaline and serotonin and certain metabolites such as DOPAC, HVA and 5-HIAA;
- analyze the effects of selenium on *fads2* (fatty acyl desaturase gene) and *elovl5* (fatty acyl elongase gene) expression in liver and brain of meagre (*Argyrosomus regius*) and on the concentration of some neurotransmitters, such as dopamine, norepinephrine and serotonin and certain metabolites such as DOPAC, HVA and 5-HIAA.

Thus, after the trial period (60 days for the analysis of gene expression and 90 days for quantification of monoamines), we proceeded to the analysis of gene expression by RT-PCR and quantification of monoamines concentration by HPLC.



We conclude that substitution of oils has a positive effect on gene expression, especially *fads2*, which seems to be the rate limiting enzyme in this pathway. This situation also led to increase in the concentration of monoamines in the brain.

The selenium supplementation of diets probably also appears to benefit gene expression and monoaminergic system, because reduces lipid peroxidation of cell membranes.

# ÍNDICE

Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Gráficos.....	xiii
Abreviaturas.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estado da Aquacultura .....	1
1.1.1. Estado da Aquacultura no Mundo.....	1
1.1.2. Estado da aquacultura na Europa e na União Europeia.....	2
1.1.3. Estado da aquacultura da corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> , Asso 1801).....	3
1.2. A Corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> , Asso 1801) .....	4
1.3. A corvina como uma fonte importante de ácidos gordos para os humanos .	6
1.4. Caraterização e importância dos ácidos gordos .....	6
1.5. Suscetibilidade dos ácidos gordos à peroxidação lipídica.....	8
1.6. Selénio como protetor da peroxidação dos ácidos gordos da membrana ....	8
1.7. Biossíntese de ácidos gordos insaturados.....	9
1.7.1. Biossíntese de ácidos gordos monoinsaturados.....	9
1.7.2. Biossíntese de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA).....	9
1.7.3. Genes Adipogénicos.....	12
1.7.3.1. Dessaturases dos ácidos gordos dos peixes teleósteos.....	12
1.7.3.1.1. <i>fads2</i> e $\Delta 6$ dessaturase dos peixes teleósteos.....	13
1.7.3.2. Elongases dos ácidos gordos dos peixes teleósteos.....	14
1.7.3.2.1. <i>elov15</i> e elongase 5 dos peixes teleósteos.....	15
1.8. Importância dos ácidos gordos na neurotransmissão cerebral .....	17
1.8.1. Modo de ação dos neurotransmissores.....	18
1.8.2. Recetores pós-sinácticos das monoaminas.....	18
1.8.2.1. Recetores da dopamina.....	18
1.8.2.2. Recetores da noradrenalina e adrenalina.....	19
1.8.2.3. Recetores da serotonina (5-HT).....	20
1.8.3. Síntese de monoaminas.....	21
1.8.3.1. Síntese das catecolaminas: Dopamina, Noradrenalina e Adrenalina.....	21
1.8.3.2. Síntese da Serotonina.....	22
1.8.4. Armazenamento das monoaminas.....	22
1.8.5. Libertação das monoaminas.....	23

1.8.6. Manutenção dos níveis das monoaminas no cérebro.....	23
1.8.6.1. Manutenção dos níveis de Dopamina.....	23
1.8.6.2. Manutenção dos níveis de Noradrenalina e Adrenalina.....	23
1.8.7. Metabolização das monoaminas.....	24
1.8.7.1. Metabolização da Dopamina.....	24
1.8.7.2. Metabolização da Noradrenalina e Adrenalina.....	26
1.8.7.3. Metabolização da Serotonina.....	27
1.9. Modulação nutricional dos genes relacionados com a biossíntese de HUFA.....	28
1.9.1. Os Recetores Ativados pela Proliferação de Peroxissomas.....	28
1.9.2. As Proteínas de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol.....	30
1.9.3. Os ácidos gordos como reguladores dos fatores transcricionais.....	31
1.9.3.1. Influência dos ácidos gordos na regulação do PPAR $\alpha$ .....	32
1.9.3.2. Influência dos ácidos gordos na regulação da SREBP-1.....	33
1.9.4. Influência dos ácidos gordos na expressão da <i>Fads2</i> .....	34
1.9.5. Influência dos ácidos gordos na expressão da <i>fads2</i> dos peixes teleósteos.....	35
1.9.6. Influência dos ácidos gordos na expressão da <i>Elov5</i> .....	36
1.9.7. Influência dos ácidos gordos na expressão da <i>elov5</i> dos peixes teleósteos.....	36
1.9.8. Influência do selénio na expressão adipogénica.....	37
1.10. Efeito da substituição de óleo de peixe por óleo vegetal da dieta na expressão adipogénica.....	39
1.10.1. Efeito da substituição de óleo de peixe por óleo vegetal da dieta na expressão da <i>fads2</i> .....	39
1.10.2. Efeito da substituição de óleo de peixe por óleo vegetal da dieta na expressão da <i>elov5</i> .....	40
1.11. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema monoaminérgico do cérebro.....	40
1.11.1. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema dopaminérgico do cérebro.....	40
1.11.2. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema noradrenérgico e adrenérgico do cérebro.....	41
1.11.3. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema serotoninérgico do cérebro.....	41
1.11.4. Efeito dos antioxidantes no sistema monoaminérgico.....	42
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45

3.1. Animais experimentais.....	45
3.2. Instalações experimentais.....	45
3.3. Dietas.....	45
3.4. Amostragem.....	47
3.4.1. Amostragem para expressão génica.....	47
3.4.2. Amostragem para quantificação de monoaminas.....	47
3.5. Quantificação da expressão génica.....	47
3.5.1. Extração de RNA.....	47
3.5.2. Real-Time PCR.....	48
3.6. Deteção de monoaminas e metabolitos por HPLC-DE.....	49
3.7. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Expressão génica.....	51
4.2. Quantificação das monoaminas.....	55
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	68
7. TRABALHOS FUTUROS.....	69
8. BIBLIOGRAFIA.....	70
9. ANEXOS.....	85

## Índice de Figuras

- Fig. 1:** Mapa da distribuição nativa da Corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801).
- Fig. 2:** Exemplar de um juvenil de Corvina, *Argyrosomus regius*, Asso 1801.
- Fig. 3:** Características físicas dos ácidos gordos.
- Fig. 4:** Via da biossíntese dos ácidos gordos altamente insaturados (HUFA).
- Fig. 5:** Reação de alongação dos ácidos gordos.
- Fig. 6:** Esquema da estrutura dos recetores de dopamina D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>.
- Fig. 7:** Via da biossíntese das catecolaminas: dopamina, noradrenalina e adrenalina a partir da tirosina.
- Fig. 8:** Biossíntese da serotonina.
- Fig. 9:** Condução e transmissão neuronal.
- Fig. 10:** Vias do catabolismo da dopamina.
- Fig. 11:** Vias do metabolismo da noradrenalina.
- Fig. 12:** Biossíntese e degradação da serotonina.
- Fig. 13:** Representação esquemática das funções dos domínios dos recetores ativados pela proliferação de peroxissomas.
- Fig. 14:** Mecanismo da transcrição génica através dos recetores ativados pela proliferação de peroxissomas.
- Fig. 15:** Mecanismo da libertação das proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) a partir das membranas por processos proteolíticos mediados por esteróis.
- Fig. 16:** Mecanismos gerais da regulação dos genes pelos ácidos gordos polinsaturados (PUFA).
- Fig. 17:** Mecanismo de inibição do recetor de estrogénio e consequente inibição da progressão do ciclo celular pelo MSA.

## Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Produção em toneladas da pesca e aquacultura no Mundo e utilização do pescado.

**Tabela 2:** Algumas funções do selênio.

**Tabela 3:** Padrão de distribuição da expressão do gene *fads2* nos tecidos de diversas espécies.

**Tabela 4:** Variedade dos ácidos gordos metabolizados pela *Elovl5* dos peixes teleósteos.

**Tabela 5:** Famílias dos recetores da serotonina.

**Tabela 6:** Ingredientes e percentagem de inclusão dos diferentes lípidos que compõem as 4 dietas testadas.

**Tabela 7:** Composição nutricional das 4 dietas testadas em corvina (*Argyrosomus regius*).

**Tabela 8:** Primers e protocolo para o Real-Time PCR (F – Forward; R – Reverse).

**Tabela 9:** Impacto dos fatores: fonte lipídica (animal vs vegetal) e selênio, na expressão da *fads2* e *elovl5* do fígado e cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Tabela 10:** Impacto dos fatores: fonte lipídica (animal vs vegetal) e selênio (1 mg/kg), na concentração das monoaminas [dopamina (DA), 5-HT (serotonina), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)], no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

## Índice de Gráficos

**Gráfico 1:** Efeito da substituição total de 12% de óleo de peixe (OP) por 12% de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)], nas dietas suplementadas com 1 mg/kg de selênio (S), sobre a expressão dos genes *fads2* e *elov15* do fígado da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 2:** Efeito da substituição total de 12% de óleo de peixe (OP) por 12% de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)], nas dietas suplementadas com 1 mg/kg de selênio (S), sobre a expressão dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 3:** Efeito da suplementação das dietas de 12% de óleo de peixe (OP) com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do fígado da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 4:** Efeito da suplementação das dietas de 12% de óleo de peixe (OP) com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 5:** Efeito da suplementação das dietas de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)] com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do fígado da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 6:** Efeito da suplementação das dietas de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)] com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 7:** Efeito da substituição total de 12% de óleo de peixe com 1 mg/kg de selênio (OP-S) por 12% de misturas de óleos vegetais com 1 mg/kg de selênio [OV-S (colza, linhaça e soja)] sobre a concentração das monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)], no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 8:** Efeito das dietas de 12% de óleo de peixe sem selênio (OP-NS) vs dietas de 12% de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) sem selênio (OV-NS) na concentração das monoaminas [dopamina (DA), 5-HT (serotonina), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)], no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 9:** Efeito das dietas de 12% de óleo de peixe com 1 mg/kg de selênio (OP-S) vs dietas de 12% de óleo de peixe sem selênio (OP-NS) na concentração das monoaminas [dopamina (DA), 5-HT (serotonina), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)], no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

**Gráfico 10:** Efeito da suplementação das dietas de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) com 1 mg/kg de selênio na concentração das monoaminas [dopamina (DA), 5-HT (serotonina), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)], no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).



## Abreviaturas

- 3-MT** – Metoxitiramina
- 5-HIAA** – ácido 5-Hidroxi-indol-acético
- 5-HTP** – 5-Hidroxitriptofano
- 5-HT** – Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina
- A** - Adrenalina
- ARA** - Ácido araquidónico
- ACP** – Proteína transportadora de acil
- AD** – Aldeído desidrogenase
- ADH** – Álcool desidrogenase
- ALA** – Ácido- $\alpha$ -linoleico
- ALD-D** – Aldeído desidrogenase
- ALR** – Aldeído redutase
- AR** – Aldeído redutase
- cAMP** – Adenosina de monofosfato cíclico
- cDNA** – DNA complementar
- COMT** – Catecol- O-metiltransferase
- DA** - Dopamina
- DHA** - Ácido docosaheptaenóico
- DHMA** – Ácido 3,4-Dihidroximandelico
- DHPG** – 3,4-Dihidroxifeniglicol
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DOPAC** – Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético
- DOPAL** – 3,4-Dihidroxifenilacetaldeído
- DOPEGAL** – 3,4-Dihidroxifenilglicolaldeído
- DOPET** – 3,4-Dihidroxifeniletanol
- Elovl** - Elongases
- EPA** - Ácido eicosapentaenóico
- FAD** - Dessaturases
- Gpx** – Glutathiona peroxidase
- HPLC-DE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica
- HUFA** - Ácidos gordos altamente insaturados
- HVA** – Ácido homovanílico
- LA** – Ácido linoleico
- LC** – Locus coeruleus

**L-DOPA** – L-3,4-Dihidroxifenilalanina  
**MAO** – Monoamina oxidase  
**MHPG** – 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol  
**MOPEGAL** – 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol aldeído  
**MOPET** – 3-Metoxi-4-hidroxifeniletanol  
**NA** – Noradrenalina  
**NS** – Sem selénio  
**OP** – Óleo de peixe  
**OV** – Óleo vegetal  
**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PNMT** – Feniletanolamina-N-Metiltransferase  
**PPAR** – Recetor ativado pela proliferação de peroxissomas  
**PPRE** – Elemento regulador da proliferação dos peroxissomas  
**PUFA** – Ácidos gordos polinsaturados  
**RE** – Retículo endoplasmático  
**RE $\alpha$**  – Recetor de estrogénio  $\alpha$   
**RNA** – Ácido ribonucleico  
**ROS** – Espécies reativas de oxigénio  
**RT-PCR** – Real Time PCR  
**RXR** – Recetor X retinóide  
**S** – Com selénio  
**Sec** – Selenocisteína  
**SREBP** – Proteína de ligação ao elemento regulador de esteroide  
**TH** – Tirosina hidroxilase  
**Trx** – Tioredoxina  
**TrxR** – Tioredoxina redutase  
**VMA** – Ácido vanilmandélico  
**VMAT** – Transportador de monoaminas vesicular

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Estado da Aquacultura

### 1.1.1. Estado da Aquacultura no Mundo

Nas últimas três décadas (1980-2010), a produção mundial de peixe, proveniente da aquacultura aumentou a uma taxa média anual de 8,8%, sendo que em 2012 a produção aquícola mundial alcançou um recorde histórico de 66 milhões de toneladas (excluindo plantas aquáticas e produtos não alimentares) (FAO, 2014).

Em 2011, o conjunto das capturas da pesca e da produção de pescado em aquacultura atingia já os 154 milhões de toneladas. Deste total, a aquacultura foi responsável por 63,6 milhões de toneladas (Tabela 1). No entanto, interessa referir que a China foi responsável pela maior parte da produção de pescado mundial, pois a sua produção cresceu de 7% em 1961 para 35% em 2010. Concomitantemente com a expansão da produção de peixe oriunda da aquacultura observou-se um aumento no consumo mundial de peixe *per capita* (FAO, 2012).

É de destacar ainda que os 10 maiores países produtores de pescado apresentam um crescimento de produção superior aos restantes países produtores, tanto em peso como em valor, representando cerca de 88% da produção total no mundo (70,1 milhões de toneladas) (Apromar, 2012).

Dentro dos organismos produzidos em aquacultura, os peixes de água doce dominam a produção mundial, seguidos pelos moluscos, crustáceos, peixes diádrómicos, peixes marinhos e outros animais aquáticos (FAO, 2012).

**Tabela 1:** Produção em toneladas da pesca e aquacultura no Mundo e utilização do pescado. Fonte: FAO, 2014).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Produção (Milhões de toneladas)</b>						
<b>Captura</b>						
<b>Água Doce</b>	10.1	10.3	10.5	10.3	11.1	11.6
<b>Marinha</b>	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
<b>Total das capturas</b>	<b>90.8</b>	<b>90.1</b>	<b>90.1</b>	<b>89.1</b>	<b>93.7</b>	<b>91.3</b>
<b>Aquacultura</b>						

<b>Água Doce</b>	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
<b>Marinha</b>	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
<b>Total da produção</b>	<b>49.9</b>	<b>52.9</b>	<b>55.7</b>	<b>59.0</b>	<b>62.0</b>	<b>66.6</b>
<b>Capturas e Produção</b>	140.7	143.1	145.8	148.1	155.7	158.0
<b>Utilização</b>						
<b>Consumo humano</b>	117.3	120.9	123.7	128.2	131.2	136.2
<b>Outros fins</b>	23.4	22.2	22.1	19.9	24.5	21.7

A aquacultura tem assim um impacto cada vez maior no abastecimento de pescado às populações, mas a produção de pescado e crustáceos através da aquacultura está ainda altamente dependente da pesca para a produção de rações, as quais incorporam farinha de peixe e óleo de peixe de baixo valor. Esta dependência de farinha e óleos de peixe é particularmente forte no que concerne à produção de espécies marinhas (Tacon, Hasan & Subasinghe, 2006). Acresce que, além do consumo de 5-6 milhões de toneladas de peixe proveniente do by-catch de diversas pescarias como alimento direto de peixes de viveiro, estima-se que o sector da aquacultura consumiu em 2003 o equivalente a aproximadamente 20-25 milhões de toneladas de peixe no fabrico de rações, para uma produção total de cerca de 30 milhões de toneladas de peixe e crustáceos (Tacon, Hasan & Subasinghe, 2006).

Nas últimas décadas as capturas provindas da pesca estabilizaram em redor das 80-100,000,000 toneladas (FAO, 2012), nível este que é considerado como o limite tendo em conta as atuais tecnologias da pesca e a produção possível pelos oceanos. Assim, e por forma a podermos responder à dicotomia entre o aumento da procura de pescado e a estagnação das capturas da pesca é necessário produzirmos pescado de uma forma mais sustentável.

### **1.1.2. Estado da aquacultura na Europa e na União Europeia**

Na Europa, a produção de pescado em água marinha e salobra tem vindo a aumentar nos últimos anos. Entre 1990 e 2010 registou-se um aumento da produção dos produtos de água doce e salobra de 55,6% para 81,5%. Esta evolução deve-se principalmente ao importante contributo da produção de salmão em offshore, isto é, em jangadas flutuantes. Por outro lado, a indústria dos bivalves tem sofrido uma estagnação ou até mesmo um

decréscimo na sua produção. Assim, em 2010, a produção europeia foi dominada pelos peixes, que representaram três quartos da produção total de pescado, enquanto que os bivalves representaram apenas um quarto (FAO, 2012). Na Europa meridional as principais espécies marinhas produzidas são a dourada (*Sparus aurata*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*), o rodovalho (*Psetta máxima*) e a corvina (*Argyrosomus regius*) (Apromar, 2012).

Porém, o aumento da aquacultura na Europa, e principalmente na União Europeia, não tem sido suficiente para compensar o aumento da procura e o decréscimo dos desembarques provenientes da pesca. Assim, a União Europeia vê-se obrigada a importar, por ano, um saldo de 17 milhões de toneladas de pescado, originando um défice de 13.500 milhões de euros anuais (Apromar, 2012). Na última década, as médias anuais de crescimento da aquacultura na Europa foram de 2,4%, o que revela a dificuldade que a Europa tem sentido em evoluir em termos de produção, comparativamente com os outros países do mundo (Apromar, 2012).

### **1.1.3. Estado da aquacultura da corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801)**

A espécie *Argyrosomus regius* reúne potencial para ser produzida em larga escala, contribuindo assim para a diversificação das espécies marinhas produzidas em aquacultura (Jiménez *et al.*, 2005). De facto esta espécie apresenta elevadas taxas de fecundidade, ampla distribuição geográfica (Fig. 1), um crescimento rápido e bons índices de conversão alimentar. Além disso, a corvina apresenta pouca gordura mesentérica e muscular, o que torna o seu músculo ideal para o processamento industrial, pois assim o período de conservação em refrigeração é maior (Poli *et al.*, 2003). Acresce que este é um peixe apreciado pelo consumidor e com um preço de mercado bastante elevado (5-6 euros/kg). Um outro aspeto importante são as suas taxas de crescimento quando em jangadas flutuantes. Assim, a utilização desta tecnologia de jangadas flutuantes para produção de corvina permite obter pesos de 1850 gramas em apenas 8 meses, iniciando-se a engorda com exemplares de apenas 110 gramas. Além disso, e por ser eurihalina, esta espécie consegue adaptar-se a diferentes condições de produção (Cárdenas, 2012). Contudo, mesmo com todas as potencialidades de produção exibidas por esta espécie, a sua aquacultura é algo muito recente, tendo sido a França a pioneira da sua produção comercial em 1997 (Quémener *et al.*, 2002).

Atualmente esta espécie, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), já é produzida em 6 países da bacia do Mediterrâneo, nomeadamente: Espanha, França, Itália, Marrocos, Turquia e

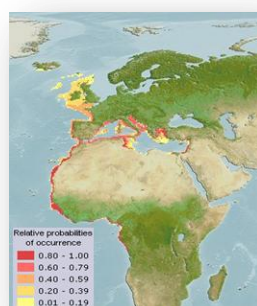
Egito (Jiménez *et al.*, 2005; Cárdenas, 2012). Com o crescente interesse da sua comercialização, em 2010 a corvina atingiu um record de produção de 10 000 toneladas (Monfort, 2010). O país com maior produção de corvina é a Espanha, que em 2010 produziu 3 250 toneladas (o que representa 84% do total europeu) (Monfort, 2010).

Relativamente à forma de comercialização da corvina, ela é vendida a fresco, inteira e com a cabeça, não eviscerado ou eviscerado, dependendo do fim a que se destina. Normalmente não são vendidos exemplares abaixo de 1 kg e por isso, mais de 50% do peixe é vendido com um peso entre 1-2 kg. As gamas de peso entre as 400-700 gramas não são comercializadas, porque o peixe tem uma cabeça muito grande, o que significa que possui pouco músculo (Monfort, 2010) e os maiores tamanhos (> 2.5 kg) são vendidos para a restauração, sendo posteriormente processado em filetes (Monfort, 2010). De forma global, o volume de produção para congelamento é baixo. É de referir ainda que os principais países onde se comercializa este peixe são Espanha, Itália e Portugal, tendo recentemente o Egito iniciado a sua comercialização para Israel (Monfort, 2010).

## 1.2. A Corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801)

A espécie *Argyrosomus regius* pertence à classe Actinopterygii, pois possui raios nas barbatanas (Fishbase, 2010), e à família *Sciaenidae*. Em Portugal, o nome comum desta espécie é corvina e que advém do facto destes peixes terem a capacidade de produzirem sons, utilizando para tal a bexiga natatória como câmara de ressonância (Cárdenas, 2010; Fishbase, 2010).

A corvina tem uma distribuição geográfica alargada (Fig.1), sendo uma espécie semi-pelágica costeira, com tendência demersal (Quéro & Vayne, 1987).



**Fig. 1:** Mapa da distribuição nativa da Corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). Fonte: Fishabase, 2010.

Morfologicamente a corvina apresenta um corpo comprido, coberto por escamas grandes e ciclóides (Cárdenas, 2010). A linha lateral é curva e formada por cerca de 50 escamas ctenóides (Cárdenas, 2010), sendo bem evidente pelo seu brilho e terminando na barbatana caudal (FAO, 2013). A boca das corvinas é grande e amarela e os seus dentes estão inseridos em várias séries, sendo que os maiores e mais fortes estão localizados na parte mais interna (Cárdenas, 2010) (Fig. 2).



**Fig. 2:** Exemplar de um juvenil de Corvina, *Argyrosomus regius*, Asso 1801. Fonte: <http://www.diversifyfish.eu/meagre-argyrosomus-regius.html>

Dentro da família *Sciaenidae*, esta espécie destaca-se pelas suas elevadas taxas de crescimento e tamanho máximo atingido, uma vez que pode chegar aos 200 cm de comprimento (comprimento total) e 50 kg de peso (Quéro & Vayne, 1987). As maiores taxas de crescimento registam-se durante o verão diminuindo quando as temperaturas estão abaixo dos 13-15 °C. Assim, a temperatura ideal para o crescimento da corvina é entre os 17-21 °C, sendo que um crescimento moderado é atingido entre as temperaturas 14-17 °C e 21-23 °C (Cárdenas, 2012; FAO, 2013).

A corvina é uma espécie anádroma pois reproduz-se em água salobras. Durante a época de reprodução (entre Março e Agosto), as corvinas migram para os estuários, onde desovam. No primeiro tempo de vida os juvenis mantêm-se nos estuários e depois migram para as águas costeiras, onde permanecem durante os 2-3 anos de vida. Após este período, com 70-110 cm, os indivíduos atingem a maturidade sexual e migram então para os estuários, para se reproduzirem (González-Quirós *et al.*, 2011).

Relativamente aos hábitos alimentares, a corvina (*Argyrosomus regius*) é uma espécie muito voraz e alimenta-se de poliquetas, crustáceos, equinodermes, moluscos e outras espécies de peixes mais pequenos como clupeídeos e mugílidios (Jiménez *et al.*, 2005). Isso está de acordo com as observações de Gill, Grau & Riera (2009) que constataram que a corvina apresenta um trato digestivo curto, correspondendo a 75% do total da longitude do corpo, que é uma característica típica das espécies carnívoras.

### **1.3. A corvina como uma fonte importante de ácidos gordos para os humanos**

O peixe representa uma fonte alimentar altamente nutritiva, pois é rico em proteína e uma fonte de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA). Estes ácidos gordos insaturados são importantes na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro do cólon e da mama, entre outras patologias. Além disso, o peixe também contém micronutrientes como iodo, selénio e vitaminas lipossolúveis (A e D) benéficos para a saúde humana (Hasan, 2001).

A corvina, em particular, é uma espécie cujo músculo tem um valor nutricional muito elevado pois é magro e os seus lípidos de alta qualidade (Poli *et al.*, 2003). O perfil e composição dos ácidos gordos do músculo dos peixes está intimamente relacionado com a dieta dos animais. Neste sentido, os peixes marinhos e particularmente os carnívoros necessitam de uma dieta rica em HUFA das série n-3 e n-6 para um óptimo crescimento e saúde, dado que não apresentam taxas de bioconversão de PUFA C<sub>18</sub> em HUFA C<sub>20</sub> e C<sub>22</sub> suficientes para suprirem as suas exigências fisiológicas (Hasan, 2001).

### **1.4. Caracterização e importância dos ácidos gordos**

Os lípidos são biomoléculas compostas por átomos de carbono, hidrogénio e oxigénio e, ao contrário do que sucede com outras biomoléculas, não apresentam uma estrutura típica. Porém, todas as famílias de lípidos caracterizam-se por possuírem uma baixa solubilidade na água (Cook & McMaster, 2002; Leaver *et al.*, 2008a).

Nos organismos eucariotas, a grande maioria dos lípidos são derivados da acetil-CoA e pertencem a três classes principais (Leaver *et al.*, 2008a):

- ✓ ácidos gordos de cadeia linear;
- ✓ ácidos gordos de cadeia ramificada, cíclica, e outros ácidos gordos especializados;
- ✓ compostos poliprenóides que incluem os carotenóides e os esteróis e seus derivados.

Além disso, os lípidos são constituídos por diversas famílias, sendo a mais importante, a família dos ácidos gordos (Tocher, 2003; Quintas, Freire & Halpern, 2008). Assim, esta importante família de lípidos apresenta uma estrutura linear, constituída por uma cadeia hidrogenocarbonatada alifática que poderá ser insaturada ou saturada na presença ou ausência de ligações duplas (Duplus, Glorian & Forest, 2000). Nesta molécula o grupo

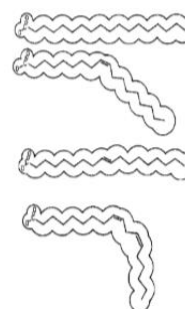


funcional é o grupo carboxilo e estão separados por um grupo  $-CH_2-$  (Los e & Murata, 1998; Tocher, 2003; Quintas, Freire & Halpern, 2008).

Na verdade, a importância dos lípidos é elevada, pois desempenham importantes papéis em todos os organismos, a saber: função estrutural da membrana, armazenamento (no tecido adiposo) para obtenção de energia (Tocher, 2003; Quintas, Freire & Halpern, 2008) e, ainda, funcionam como precursores de moléculas biologicamente ativas como eicosanóides, feromonas e hormonas (Pereira, Leonard & Mukerji, 2003). Relativamente à função que desempenham na membrana celular, é sabido que a coesão entre os diversos lípidos membranares é garantida pela interação de forças, sendo a mais importante a de London-Van der Waals, que tem um grande impacto nas cadeias de ácidos gordos. Esta força é tanto maior quanto mais grupos metilo possuírem os ácidos gordos e diminui com o afastamento destes grupos. Por conseguinte, quanto maior for a cadeia de ácidos gordos, maior é a interação entre os grupos metilo. Esta interação contrasta com as ligações de hidrogénio e electrostáticas que são pequenas nos grupos polares da molécula. Desta feita, esta interação é de extrema importância para a estabilidade da membrana das células (Cook & McMaster, 2002).

A par disso, também o comprimento e o grau de saturação dos ácidos gordos das membranas influenciam a solubilidade e o ponto de fusão da membrana celular, já que quanto maior a cadeia de grupos metilo, menor a solubilidade e maior o ponto de fusão (Carlier, Bernard & Caselli, 1991; Cook & McMaster, 2002; Quintas, Freire & Halpern, 2008) (Fig. 3). Por outro lado, estes efeitos podem ser contrariados com a introdução de ligações duplas, o que leva a uma diminuição do ponto de fusão (Fig. 3). Este efeito é consequência do facto da introdução de ligações duplas conduzir à alteração da conformação das ligações Cis, e portanto a molécula deixa de ser linear, diminuindo a eficácia da interação intermolecular, e consequentemente aumentando a fluidez membranar (Srinivasarao *et al.*, 1997; Cook & McMaster, 2002; Haag, 2003; Quintas, Freire & Halpern, 2008).

Fatty acid	Abbreviation	Melting point
Astearic Acid	18:0	70°
Oleic acid	c-18:1 n-9	16°
Elaidic acid	t-18:1 n-9	43°
Linoleic acid	c,c-18:2 n-6	-5°



**Fig. 3:** Características físicas dos ácidos gordos. Fonte: Cook & McMaster, 2002.

Importa ainda ressaltar que a saturação dos ácidos gordos é especialmente importante nos animais poiquilotérmicos, uma vez que com a diminuição da temperatura tem de ocorrer um aumento do grau de insaturação dos ácidos gordos da membrana, para que a fluidez da mesma não seja afetada (Los & Murata, 1998).

### **1.5. Suscetibilidade dos ácidos gordos à peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica resulta da ação nociva dos radicais livres sobre os tecidos (Montine *et al.*, 2002). Este fenómeno tem como principal alvo os ácidos gordos que compõem os fosfolípidos das membranas celulares (Huang, Huang & Hou, 1998; Varghese, Lakshmy & Oommen, 2001). Como consequência, as membranas celulares são danificadas e a sua estrutura alterada, acabando por comprometer a atividade das proteínas ligadas à membrana. Estes desequilíbrios podem ser responsáveis pela origem de diversas patologias (Montine *et al.*, 2002).

Este fenómeno é tanto maior quanto maior for o grau de insaturação dos ácidos gordos (Huang, Huang & Hou, 1998; Varghese, Lakshmy & Oommen, 2001). Por isso, todos os HUFA aumentam a suscetibilidade das membranas sofrerem a peroxidação lipídica, sendo que o cérebro é particularmente susceptível, devido à presença simultânea de ferro e ácidos gordos insaturados em abundância (Ferreira, Militão & Freitas, 2009).

### **1.6. Selénio como protetor da peroxidação dos ácidos gordos da membrana**

A importância do selénio foi inicialmente relacionada com o facto de ser um componente essencial à Glutathione peroxidase. Mais tarde confirmou-se que é um elemento primordial para a formação de diversas outras selenoproteínas, onde este micronutriente se apresenta sob a forma do aminoácido selenocisteína (Sec) (Hesketh, 2008). Alguns exemplos de selenoproteínas são as Glutathione peroxidases (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4) e a tioredoxina redutase. Estas enzimas têm funções antioxidantes funcionando como protetoras dos lípidos das membranas celulares, tal como mostra a tabela 2 (Rayman & Dphil, 2000).

**Tabela 2:** Algumas funções do selênio. Fonte: Rayman & Dphil, 2000.

<b>Selenoproteínas</b>	<b>Função</b>
<b>Glutationa peroxidases (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)</b>	Enzimas antioxidantes: removem o peróxido de hidrogénio, peróxidos lipídicos e lípidos (tornando-se importantes na manutenção da integridade dos lípidos da membrana), modulação da síntese de eicosanóides e impedem danos oxidativos nas biomoléculas como lípidos, lipoproteínas e DNA.
<b>Tioredoxina redutase</b>	Regeneração do sistema antioxidante; manutenção do estado redox intracelular; regulação da expressão génica por controlo redox da ligação dos fatores de transcrição ao DNA.

## **1.7. Biossíntese de ácidos gordos insaturados**

A existência de um fornecimento regular de ácidos gordos por forma a suprir as necessidades de um organismo está dependente não só da dieta, bem como da sua síntese endógena (Cook & McMaster, 2002).

A síntese de ácidos gordos insaturados envolve a intervenção de enzimas designadas de dessaturases e elongases que realizam, respetivamente a dessaturação e alongação (Quintas, Freire & Halpern, 2008).

### **1.7.1. Biossíntese de ácidos gordos monoinsaturados**

Todos os organismos são capazes de sintetizar o ácido oleico (18:1 n-9), que resulta da introdução e uma ligação dupla na posição  $\Delta 9$  da cadeia acilo. Esta reação é levada a cabo pela  $\Delta 9$  dessaturase, uma enzima de dessaturação (Cook & McMaster, 2002; Leaver *et al.*, 2008a).

### **1.7.2. Biossíntese de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA)**

As plantas e alguns invertebrados possuem as enzimas  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$  dessaturases. Estas enzimas atuam sobre o substrato 18:1 n-9 (ácido oleico) e formam o 18:2 n-6 (ácido linoleico, LA) e o 18:3 n-3 (ácido- $\alpha$ -linoleico, ALA), respetivamente (Leaver *et al.*, 2008a). Ora, é a partir destes dois novos substratos que se torna possível sintetizar HUFA (Fig. 4). Contudo, os mamíferos e alguns peixes têm uma capacidade limitada de sintetizar

HUFA [como o ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido araquidónico (AA)] a partir de ácidos gordos das séries n-3 e n-6. Por conseguinte, necessitam do fornecimento alimentar das moléculas finais ou dos seus precursores (Cook & McMaster, 2004; Leaver *et al.*, 2008a; Sargente *et al.*, 2002, citado por Vagner & Santigosa, 2011). Nestes animais o LA e o ALA são considerados ácidos gordos essenciais (Leaver *et al.*, 2008a).

Nos vertebrados, a biossíntese de HUFA ocorre no retículo endoplasmático das células, através de processos de dessaturação e alongação sequenciais do LA e do ALA (Leaver *et al.*, 2008a).

A síntese de ARA é desencadeada pela ação da  $\Delta 6$  dessaturase sobre o substrato LA que resulta na formação do 18:3 n-6 (ácido- $\gamma$ -linolénico). Posteriormente este substrato é alongado ao 20:3 n-6 (ácido-dihomo- $\gamma$ -linolénico) e, por último, dessaturado pela  $\Delta 5$  dessaturase originando-se o 20:4 n-6 (ácido araquidónico) (Cook & McMaster, 2004).

A síntese de EPA, a partir de ALA, é em tudo semelhante à síntese de ARA. Por outro lado, a biossíntese de DHA é um pouco mais complexa, pois depende da formação inicial do EPA (20:5 n-3), que necessita de ser posteriormente alongado ao 24:5 n-3 (ácido tetracosapentaenóico). Este último, quando dessaturado pela  $\Delta 6^*$  dessaturase, forma o 24:6 n-3 (ácido tetracosahexaenóico) que posteriormente, através de uma reação de encurtamento da cadeia (oxidação) nos peroxissomas, pode formar o 22:6 n-3 (ácido docosahexaenóico, DHA) (Sprecher, 2000). Esta via é designada de “Via de Sprecher”. Portanto, a biossíntese de HUFA requer a especificidade da  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$  dessaturases, já que estas atuam numa posição específica da cadeia de ácido gordos (Sprecher, 2000).

Ao contrário do que se pensava, que todos vertebrados utilizavam a via Sprecher para formar o DHA Li *et al.* (2010) demonstraram a existência de uma via alternativa em *Siganus canaliculatus*, um peixe marinho herbívoro, envolvendo a atividade da  $\Delta 4$  dessaturase. Assim, a produção de DHA pode ocorrer através da alongação do EPA e posterior dessaturação pela  $\Delta 4$  dessaturase (Fig 4).

Park *et al.* (2009) realizou a primeira descrição de uma outra via envolvendo a  $\Delta 8$  dessaturase, em babuíños. Mais tarde, esta via foi confirmada em teleósteos, quando Monroig, Li & Tocher (2011) provaram, através de análise da expressão heteróloga, que a expressão do cDNA do gene putativo da  $\Delta 6$  dessaturase promove a atividade  $\Delta 8$  dessaturase. Ficou assim identificada mais uma via alternativa em que os substratos 20:3 n-3 (ácido eicosatrienóico) e o 20:2 n-6 (ácido eicosadienóico), anteriormente considerados produtos terminais, originam o 20:4 n-3 (ácido eicosatetraenóico) e o 20:3 n-6 (ácido-dihomo- $\gamma$ -linolénico), respectivamente (Fig. 4) (Monroig, Li & Tocher, 2011).

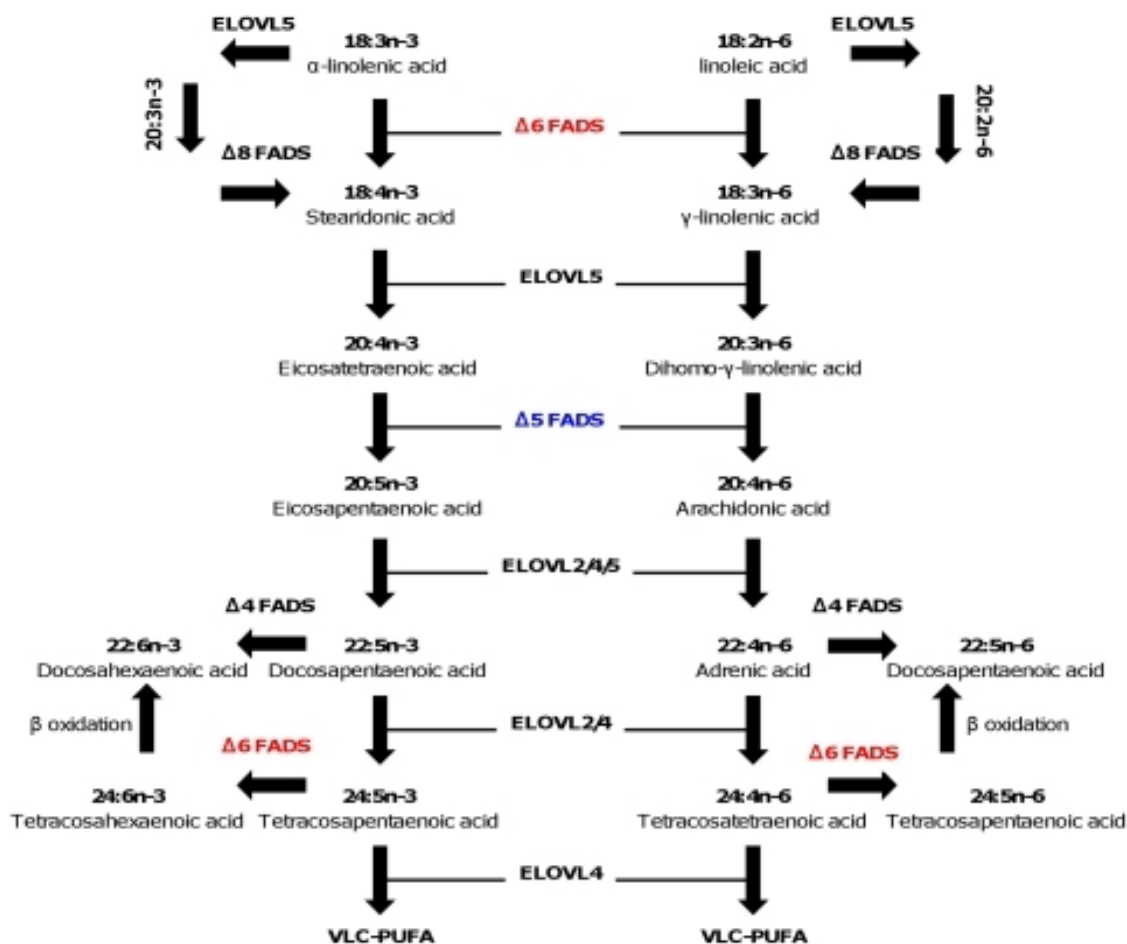


Fig. 4: Via da biossíntese dos ácidos gordos altamente insaturados (HUFA).

Fonte: Castro *et al.*, 2012.

A capacidade das espécies converterem PUFA C<sub>18</sub> em HUFA é variável e está dependente de fatores como a atividade relativa das elongases e dessaturases dos ácidos gordos (Tocher, 2003; Leaver *et al.*, 2008a; Castro *et al.*, 2012).

Tendo por base esta premissa, demonstrou-se que os peixes marinhos produzem DHA a partir do ALA a uma taxa fisiologicamente insignificante (Leaver *et al.*, 2008a) quando comparados com os peixes de água doce (Tocher, 2003).

### 1.7.3. Genes Adipogénicos

#### 1.7.3.1. Dessaturases dos ácidos gordos dos peixes teleósteos

As dessaturases dos ácidos gordos são enzimas que catalizam a introdução de duplas ligações *cis* em posições específicas da cadeia de ácidos gordos (Los & Murata, 1998), sendo este um processo aeróbico (Pereira, Leonard & Mukerji, 2003).

Na membrana celular das células animais a enzima responsável por este processo é a acil-CoA dessaturase (Los & Murata, 1998; Pereira, Leonard & Mukerji, 2003). Nos peixes a sequência de proteínas das dessaturases é muito semelhante à dos mamíferos (Sayanova, Shewry & Napier, 1999; Sayanova *et al.*, 2000; Hastings *et al.*, 2005; González-Rovira *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2004a, 2009; Vagner & Santigosa, 2011).

Nos humanos, as dessaturações  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$  são catalizadas, respetivamente, por produtos dos genes *Fads1* e *Fads2* (Marquardt *et al.*, 2000). A comparação dos genes que codificam as dessaturases dos peixes teleósteos com os genes *Fads1* e *Fads2* dos humanos permitiu concluir que todos as dessaturases dos peixes teleósteos, independentemente da espécie e atividade descrita, são mais próximas filogeneticamente da *Fads2* dos mamíferos do que da *Fads1* (Monroig, Li & Tocher, 2011). Além disso, os cDNAs dos genes que codificam as dessaturases dos peixes são ortólogos do gene *Fads2* dos mamíferos (Zheng *et al.*, 2004a; González-Rovira *et al.*, 2009; Monroig, Li & Tocher, 2011). Por isso, nos teleósteos é observada a perda completa do gene *fads1*, com o recrutamento ocasional da função  $\Delta 5$  nos genes *fads2* (Castro *et al.*, 2012).

Assim, quando foi analisada a atividade das dessaturases dos teleósteos, verificou-se que estas apresentam uma maior diversidade de substratos específicos do que as dos mamíferos. Deste modo, a maioria dos cDNAs isolados a partir dos peixes, foram caracterizados como monofuncionais. Por exemplo em *Dicentrarchus labrax* foi descrita a atividade  $\Delta 6$  (Zheng *et al.*, 2004a; González-Rovira *et al.*, 2009), em *Salmo salar* identificou-se a atividade  $\Delta 5$  (Hastings *et al.*, 2005) e a atividade  $\Delta 4$  dessaturase foi observada em *Siganus canaliculatus* (Li *et al.*, 2010). Por outro lado, no peixe-zebra (Hastings *et al.*, 2001) e no *Siganus canaliculatus* (Li *et al.*, 2010) foi descrita a bifuncionalidade  $\Delta 6/\Delta 5$  dessaturase, e mais recentemente, a bifuncionalidade  $\Delta 6/\Delta 8$  dessaturase (Monroig, Li & Tocher, 2011), também evidenciada na corvina (Monroig *et al.*, 2013).

Esta variabilidade na atividade das dessaturases tem sido associada a pressões nutricionais combinadas com perdas e ganhos de genes (Castro *et al.*, 2012). Com efeito, os peixes de água doce têm dietas ricas em LA e ALA, enquanto que os peixes marinhos têm uma dieta abundante em EPA, DHA e ARA. Como consequência, os peixes de água doce e diadrómicos possuem dessaturases com atividade  $\Delta 6$  e  $\Delta 5$  dessaturase (Hastings

*et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005a; Monroig, Li & Tocher, 2011), enquanto que a menor capacidade das espécies marinhas em biossintetizarem HUFA tem sido associada à falta de algum passo na cadeia de alongação ou da enzima  $\Delta 5$  dessaturase (Leaver *et al.*, 2008a; González-Rovira *et al.*, 2009). Por exemplo, em robalo, não foi detetada qualquer atividade das enzimas  $\Delta 4$  ou  $\Delta 5$  dessaturases (González-Rovira *et al.*, 2009).

Genericamente estas enzimas são mais eficientes a dessaturar os substratos n-3 do que os n-6 (Tocher, 2003; Zheng *et al.*, 2004a; Tocher *et al.*, 2006; González-Rovira *et al.*, 2009).

#### **1.7.3.1.1. *fads2* e $\Delta 6$ dessaturase dos peixes teleósteos**

Nos mamíferos a  $\Delta 6$  dessaturase é codificada pelo gene *Fads2* e catalisa o primeiro passo da reação de biossíntese de ácidos gordos de cadeia longa, tornando-se assim um passo limitante neste processo (Cho, Nakamura & Clarke, 1999; Park *et al.*, 2009). A  $\Delta 6$  dessaturase é conhecida por atuar nos substratos  $C_{18}$  e  $C_{24}$  (Cho, Nakamura & Clarke, 1999). Coincidentemente, nos peixes teleósteos, a  $\Delta 6$  dessaturase atua sobre o ALA e o LA originando o 18:4 n-3 e o 18:3 n-6, respetivamente, (Cook & McMaster, 2004; González-Rovira *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2004a, 2009), bem como sobre o 24:4 n-6 e o 24:5 n-3 formando, respectivamente o 24:5 n-6 e o 24:6 n-3 (Li *et al.*, 2010).

O facto de a maioria das  $\Delta 6$  dessaturases dos peixes serem monofuncionais, reforça a estreita relação entre as sequências dos genes dos peixes e dos mamíferos (Zheng *et al.*, 2004a, 2009).

As sequências proteicas das  $\Delta 6$  dessaturase dos peixes assemelham-se mais com a  $\Delta 6$  dessaturase dos humanos do que com a  $\Delta 5$  dessaturase (Tocher *et al.*, 2006), mesmo quando a proteína apresenta atividade  $\Delta 5$  dessaturase, como acontece com o *Salmo salar* (Hastings *et al.*, 2005).

A atividade da enzima  $\Delta 6$  dessaturase dos peixes marinhos é mais baixa do que a atividade medida em hepatócitos e enterócitos de salmonídeos (Tocher *et al.*, 2006). Esta evidência está de acordos com a distribuição da expressão destes genes, que se apurou ser variável entre as espécies de peixes teleósteos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Padrão de distribuição da expressão do gene *fads2* nos tecidos de diversas espécies.

<b>Espécie</b>	<b>Nível de expressão nos tecidos</b>	<b>Referência</b>
<b>Robalo</b>	Coração> cérebro> ovários> rim> tecido adiposo> fígado	González-Rovira <i>et al.</i> , 2009
<b>Bacalhau</b>	Cérebro> fígado> rim	Tocher <i>et al.</i> , 2006
<b>Cobia</b>	Cérebro> coração> fígado	Zheng <i>et al.</i> , 2009
<b>Truta</b>	Fígado> intestino> cérebro	Seiliez <i>et al.</i> , 2001
<b>Corvina</b>	Cérebro> fígado> cecos pilóricos> estômago	Monroig <i>et al.</i> , 2013
<b>Salmão</b>	Intestino> fígado> cérebro	Zheng <i>et al.</i> , 2005a; Monroig <i>et al.</i> , 2010

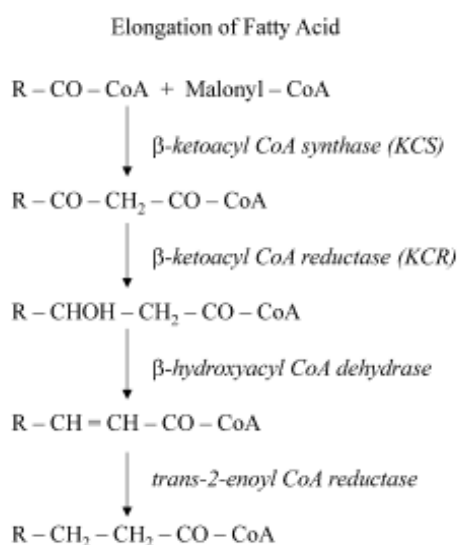
Neste sentido, nos peixes marinhos a *fads2* é intensamente expressa no cérebro a fim se assegurar a quantidade de DHA, independentemente das flutuações na dieta de EPA e de DHA, especialmente em momentos cruciais do desenvolvimento (Cho, Nakamura & Clarke, 1999; Sargent *et al.*, 2002, citado por Zheng *et al.*, 2009). Este facto reforça a importância que esta enzima assume na síntese de EPA e DHA no cérebro dos peixes (Zheng *et al.*, 2009).

### **1.7.3.2. Elongases dos ácidos gordos dos peixes teleósteos**

O sistema de elongases, ou apenas elongases, diz respeito às enzimas que são responsáveis pela introdução de duas unidades de carbono no fim da cadeia de ácidos gordos. Nas plantas e nos animais o sistema de elongases é composto por quatro enzimas: a enzima de condensação ( $\beta$ -cetoacil CoA sintase), a  $\beta$ -cetoacil CoA redutase, a  $\beta$ -hidroxiacil CoA desidrase e a trans-2-enoil CoA redutase (Leonard *et al.*, 2004). Este sistema multienzimático está localizado no retículo endoplasmático (Leaver *et al.*, 2008a) e cataliza diversas reações sequenciais que se podem observar na figura 5. Esta via microsomal é ativada tanto por ácidos gordos saturados como por ácidos gordos insaturados, sendo o ácido- $\gamma$ -linolénico (18:3 n-6) o substrato mais eficaz (Cook & McMaster, 2002). A elongação microsomal é particularmente importante na formação de ácidos gordos de cadeias superiores a 16 carbonos, sendo estes importantes constituintes dos fosfolípidos que irão contribuir principalmente para a formação das membranas celulares. Os ácidos gordos com 18 a 24 carbonos, tanto saturados como



monoinsaturados, e aos ácidos gordos polinsaturados com 20 e 22 carbonos, são indispensáveis para a formação do tecido neural (Cook & McMaster, 2002).



**Fig. 5:** Reação de elongação dos ácidos gordos. Fonte: Leonard *et al.*, 2004.

Todas as elongases caracterizadas em mamíferos e peixes obedecem à mesma estrutura. No que concerne aos mamíferos, foram identificados 7 genes envolvidos na elongação dos ácidos gordos, embora os genes responsáveis pela síntese de HUFA sejam a *Elovl2* e *Elovl5* (Leonard *et al.*, 2002). A ELOVL5 está envolvida na elongação dos PUFA C<sub>18</sub> e C<sub>20</sub>, sendo que os substratos C<sub>18</sub> são os preferenciais (Leaver *et al.*, 2008a) e a ELOVL2 atua sobre os substratos C<sub>20</sub> e C<sub>22</sub>, com especial preferência para os substratos C<sub>22</sub> (Leonard *et al.*, 2002; Jakobsson, Westerberg & Jakobsson, 2006).

Todas as sequências dos genes putativos clonados a partir de peixes mostraram que as elongases dos peixes são mais próximas, filogeneticamente, dos mamíferos do que dos restantes grupos (Agaba *et al.*, 2005). Assim, os estudos de PCR com primers degenerados concluíram que o cDNA isolado, a partir de genes putativos de elongases de diversas espécies de peixes, é muito semelhante ao da *Elovl5* dos humanos (com homologia pelo menos 61%) (Agaba *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012).

#### 1.7.3.2.1. *elov5* e elongase 5 dos peixes teleósteos

A caracterização funcional das elongases de ácidos gordos (Elovl) em peixes tem sido reportada a partir de diversas espécies (Agaba *et al.*, 2004, 2005; Hastings *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2009; Gregory *et al.*, 2010).

A especificidade dos substratos das elongases varia entre as espécies de teleósteos, revelando-se muito versáteis dentro deste grupo de animais, tal como mostra a tabela 4.

**Tabela 4:** Variedade dos ácidos gordos metabolizados pela Elovl5 dos peixes teleósteos.

<b>Espécies</b>	<b>Substratos de metabolização</b>	<b>Referência</b>
<i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Clarius gariepinus</i> , <i>Gadus morhua</i> , <i>Sparus aurata</i> , <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Danio rerio</i> <i>Salmo salar</i> <i>Argyrosomus regius</i> <i>Lates calcarifer</i> <i>Rachycentron canadum</i>	18:4 n-3 (ácido estearidónico) 18:3 n-6 (ácido-γ-linolénico) 20:4 n-6 (ácido araquidónico) 20:5 n-3 (ácido eicosapentaenóico) 22:5 n-3 (ácido docosapentaenóico) 22:4 n-6 (ácido adrénico)	Agaba <i>et al.</i> , 2005 Agaba <i>et al.</i> , 2004 Hastings <i>et al.</i> , 2005 Monroig <i>et al.</i> , 2013 Mohd-Yusof <i>et al.</i> , 2010 Zheng <i>et al.</i> , 2009
<i>Danio rerio</i> <i>Thunnus maccoyii</i> <i>Salmo salar</i>	16:1 n-7 (ácido palmitoleico) 18:1 n-9 (ácido oleico) 18:1 n-7 (ácido vacénico)	Agaba <i>et al.</i> , 2004 Gregory <i>et al.</i> , 2010 Hastings <i>et al.</i> , 2005
<i>Argyrosomus regius</i>	16:3 n-3 (ácido hexadecatrienóico)	Monroig <i>et al.</i> , 2013
<i>Thunnus maccoyii</i> <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	18:3 n-6 (ácido-γ-linolénico) 20:4 n-6 (ácido araquidónico ) 20:5 n-3 (ácido eicosapentaenóico)	Kim <i>et al.</i> , 2012 Agaba <i>et al.</i> , 2004 Gregory <i>et al.</i> , 2010
<i>Ictalurus Melas</i> <i>Oreochromis niloticus</i> <i>Scophthalmus maximus</i>	16:1n-7 (ácido palmitoleico)	Agaba <i>et al.</i> , 2005
<i>Danio rerio</i> <i>Thunnus maccoyii</i>	16:0 (ácido palmítico)	Agaba <i>et al.</i> , 2004; Gregory <i>et al.</i> , 2010

A taxa de conversão tende a diminuir com o aumento da cadeia de ácidos gordos (Agaba *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012).

Como já se referiu, nalgumas espécies como a *Argyrosomus regius* (Monroig *et al.*, 2013), *Lates calcarifer* e *Rachycentron canadum* (Mohd-Yusof *et al.*, 2010) a *elovl5* é

mais expressa no cérebro do que no fígado. Este padrão contrasta com as espécies tipicamente de água doce onde esta enzima é mais expressa no fígado e intestino (Zheng *et al.*, 2005a; Morais *et al.*, 2009). Portanto, estes padrões distintos poderão querer dizer que os peixes marinhos expressam mais intensamente as enzimas relacionadas com a síntese de HUFA no tecido neural de forma a manterem os níveis de DHA no cérebro (Zheng *et al.*, 2009; Mohd-Yusof *et al.*, 2010).

### **1.8. Importância dos ácidos gordos na neurotransmissão cerebral**

Os lípidos são um dos principais constituintes do cérebro representando 50-60% do seu peso seco, sendo que 35% deste são ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) como o ARA, DHA e EPA (Wainwright, 2002). Frequentemente, o DHA pode constituir até cerca de 30-40% do peso seco dos fosfolípidos das células do córtex cerebral e fotorreceptores na retina (Tanaka *et al.*, 2012), tecidos que requerem um alto grau de insaturação (Youdim, Martin & Joseph, 2000). Mais ainda, foi demonstrado que o cérebro é o último órgão a sofrer o declínio dos níveis de DHA, em situações de deficiência de ALA na dieta, o que revela a importância deste ácido gordo para o cérebro (Bourre *et al.*, 1992).

Os lípidos influenciam as propriedades físicas das membranas e conseqüentemente interferem com diversas funções relacionadas com os recetores membranares (Tanaka *et al.*, 2012), canais iônicos e de transporte, endo e exocitose, atividade das proteínas de ligação à membrana e neurotransmissão (Wainwright, 2002).

A composição de ácidos gordos na dieta condiciona a composição de ácidos gordos dos fosfolípidos das membranas dos diversos tipos celulares cerebrais e, por conseguinte, a atividade de diferentes enzimas membranares (Srinivasarao *et al.*, 1997; Marteinsdottir *et al.*, 1998; Arsenault *et al.*, 2012). Entre os mecanismos que influenciam a atividade funcional do cérebro, aqueles relacionados com o transporte de neurotransmissores são cruciais.

Portanto, a dieta condiciona a composição em ácidos gordos das membranas regulando as funções monoaminérgicas do cérebro e, por conseguinte, o comportamento dos animais (Chalon *et al.*, 1998). Alguns dos neurotransmissores mais importantes e frequentemente estudados são classificados como monoaminas, pois derivam da descarboxilação de aminoácidos. Este é o caso das catecolaminas a saber: dopamina (DA), noradrenalina (NA, ou norepinefrina) e adrenalina (A, ou epinefrina), originadas a partir da tirosina e a serotonina (5-HT), derivada do triptofano (Wainwright, 2002).

### 1.8.1. Modo de ação dos neurotransmissores

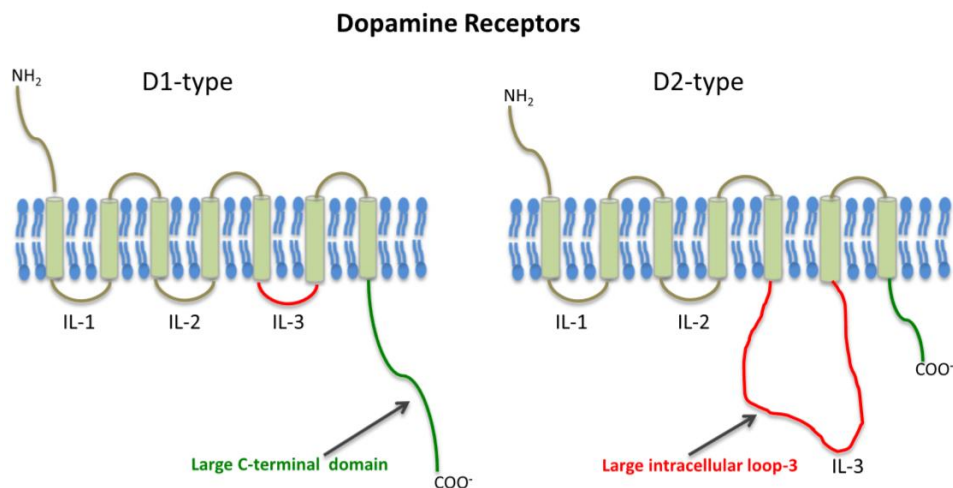
As monoaminas exercem a sua função através da sua ligação a recetores membranares, que são específicos para o neurotransmissor, bem como para a ação que desencadeiam no organismo. Porém, todos eles são caracterizados por pertencerem à família de recetores ligados à proteína G e por produzirem uma resposta celular quando ativados por uma monoamina (Docherty, 1998; Calzada & Artiñano, 2001; Wallukat, 2002). Assim, após ativação do recetor, ocorre a estimulação de um segundo mensageiro designado de adenosina de monofosfato cíclico (cAMP), localizado no lado interno da dupla camada de fosfolípidos e que é usado para a transdução de sinal intracelular (Wallukat, 2002). Ou seja, o sistema de sinalização das monoaminas está dividido em 3 fases (Pandey, Mersha & Dhillon, 2013):

- ✓ Ativação dos recetores na superfície da célula por um ligando;
- ✓ Interação do recetor com o heterotrímero de proteínas G;
- ✓ Transdução do sinal através de moléculas efetoras que geram resposta celular.

### 1.8.2. Recetores pós-sinápticos das monoaminas

#### 1.8.2.1. Recetores da dopamina

Existem cinco recetores de dopamina designados de D<sub>1</sub> a D<sub>5</sub>. Contudo, e com base nas suas propriedades bioquímicas e farmacológicas, estes recetores são frequentemente classificados como recetores do tipo D<sub>1</sub> e que englobam os recetores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> e recetores do tipo D<sub>2</sub>, que englobam os recetores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (Fig. 6) (Jaber *et al.*, 1996; Elsworth & Roth, 1997; Pandey, Mersha & Dhillon, 2013).



**Fig. 6:** Esquema da estrutura dos recetores de dopamina D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Fonte: Pandey, Mersha & Dhillon, 2013.

A partir do momento em que são ativados, os recetores do tipo D<sub>1</sub> estimulam a atividade da adenilato ciclase (enzima que ativa a cAMP), enquanto que a ativação dos recetores do tipo D<sub>2</sub> inibe a atividade desta mesma enzima (Jaber *et al.*, 1996; Elsworth & Roth, 1997; Schmitz *et al.*, 2003; Pandey, Mersha & Dhillon, 2013).

Os recetores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> localizados no hipocampo e na região pré-frontal desempenham importantes funções, como por exemplo na memória de trabalho (Jaber *et al.*, 1996; Picetti & Borrelli, 2000; Chalon *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2008; Vallone, Pandey, Mersha & Dhillon, 2013). Além disso, os recetores da DA localizados nessa e nas restantes áreas cerebrais regulam o metabolismo celular neuronal, incluindo as funções dos canais iónicos, bem como a dessensibilização dos recetores acoplados à proteína G e que leva à resposta celular e libertação de neurotransmissores. Os recetores D<sub>2</sub>, mais especificamente, modelam a concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, o que pode ser importante na biossíntese de DA (Vallone, Picetti & Borrelli, 2000).

### **1.8.2.2. Recetores da noradrenalina e adrenalina**

Os recetores pós-sinácticos da NA e A são designados de adrenérgicos e dividem-se em dois grupos: adrenérgicos  $\alpha$  e adrenérgicos  $\beta$  (Docherty, 1998; Calzada & Artiñano, 2001).

Os recetores adrenérgicos  $\alpha$  dividem-se em 2 tipos:  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Eles estão ligados às funções excitatórias, sendo que o subtipo  $\alpha_1$  medeia a resposta nos órgãos efetores, enquanto que o  $\alpha_2$ , que se localiza essencialmente na região pré-sináctica, controla a libertação dos neurotransmissores (Docherty, 1998; Calzada & Artiñano, 2001; Morilak *et al.*, 2005). Além disso, os recetores  $\alpha_1$  participam na manutenção do tónus vascular basal, pressão do sangue arterial dos animais conscientes e na resposta a estímulos agonísticos exógenos. Já os recetores  $\alpha_2$ , estão envolvidos no controlo da contração arterial e vasoconstrição das veias (Docherty, 1998; Calzada & Artiñano, 2001). Um segundo grupo de recetores importantes na resposta destes neurotransmissores são os recetores  $\beta$ -adrenérgicos, que desempenham funções como: vasodilatação, relaxamento da musculatura uterina, broncodilatação e uma função excitatória relacionada com as funções cardíacas (Calzada & Artiñano, 2001).

Em suma, os recetores  $\alpha$  estão essencialmente ligados às funções excitatórias e os recetores  $\beta$  às funções inibitórias (Docherty, 1998; Calzada & Artiñano, 2001).

### 1.8.2.3. Recetores da serotonina (5-HT)

A 5-HT produz o seu efeito através de sete tipos de recetores (Tabela 5), todos eles compostos por uma multiplicidade de subtipos de recetores que, quando ativados, desempenham diferentes funções (Pytliak *et al.*, 2011). A 5-HT é a única monoamina que atua em recetores ligados à proteína G e também em recetores associados a canais iónicos (Tabela 5). Importa ainda saber que alguns recetores, como o 5-HT<sub>3</sub>, que estão presentes nos terminais nervosos pré-sinápticos, funcionam como mediadores ou moduladores da liberação de neurotransmissores (Hoyer, Hannon & Martin, 2002; Pytliak *et al.*, 2011).

**Tabela 5.** Famílias dos recetores da serotonina.

<b>Família</b>	<b>Potencial</b>	<b>Tipo</b>	<b>Mecanismo de acção</b>
5-HT <sub>1</sub>	Inibitório	Acoplado à proteína G	Decresce a concentração de cAMP
5-HT <sub>2</sub>	Excitatório	Acoplado à proteína G	Aumenta a concentração intracelular de IP3 e DAG
5-HT <sub>3</sub>	Excitatório	Ligante do canal iónico Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	Despolarização da membrana plasmática celular
5-HT <sub>4</sub>	Excitatório	Acoplado à proteína G	Aumenta a concentração de cAMP
5-HT <sub>5</sub>	Inibitório	Acoplado à proteína G	Decresce a concentração de cAMP
5-HT <sub>6</sub>	Excitatório	Acoplado à proteína G	Aumenta a concentração de cAMP
5-HT <sub>7</sub>	Excitatório	Acoplado à proteína G	Aumenta a concentração de cAMP

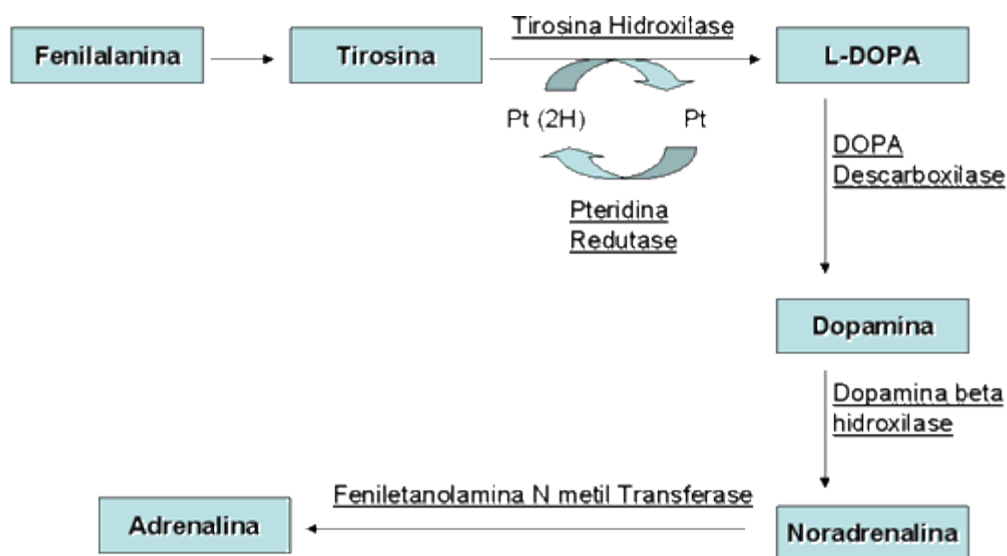
IP3: inositol trifosfato; DAG: Diacilglicerol; cAMP: monofosfato adenosina ciclina. Adaptado: (Pytliak *et al.*, 2011).

O sistema serotogénico está então envolvido na regulação da ingestão de alimento e metabolismo energético, comportamento agonístico, respiração, nocicepção, memória e locomoção, entre outros (Pytliak *et al.*, 2011).

### 1.8.3. Síntese de monoaminas

#### 1.8.3.1. Síntese das catecolaminas: Dopamina, Noradrenalina e Adrenalina

A via de biossíntese de qualquer catecolamina tem em comum a reação inicial, dado que todas elas derivam da tirosina (Elsworth & Roth, 1997; Pandey, Mersha & Dhillon, 2013). Desta feita, após a entrada deste aminoácido no neurónio, ele é hidroxilado a L-3,4-Dihidroxifenilalanina (L-DOPA), uma reação catalizada pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Seguidamente, a L-DOPA é descarboxilada a DA, pela enzima L- aminoácido aromático descarboxilase. Os neurónios que contêm a enzima adicional, DA- $\beta$ -hidroxilase, convertem a DA em NA. Os neurónios que utilizam a A como neurotransmissor possuem ainda uma outra enzima designada de feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), para converterem a NA em A (Fig. 7) (Fuller, 1982; Fernstrom & Fernstrom, 2007).



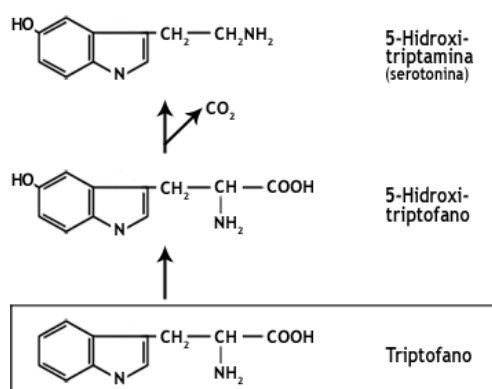
**Fig. 7:** Via da biossíntese das catecolaminas: dopamina, noradrenalina e adrenalina a partir da tirosina.

Fonte: [http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia\\_id=256&materiaver=1](http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia_id=256&materiaver=1).

O passo inicial representa o passo limitante desta via e controla a taxa de síntese de toda a via (Elsworth & Roth, 1997; Fernstrom & Fernstrom, 2007).

### 1.8.3.2. Síntese da Serotonina

A serotonina é uma monoamina derivada do triptofano. Este aminoácido serve de substrato à enzima triptofano hidroxilase formando o 5-Hidroxitriptofano (5-HTP). O 5-HTP é alvo da enzima L-aminoácido aromático descarboxilase que, por intermédio do processo de descarboxilação, forma a 5-HT (Fig. 8) (Kema, Vries & Muskiet, 2000).



**Fig. 8:** Biossíntese da serotonina. As enzimas envolvidas na sua biossíntese são: a triptofano hidroxilase, que forma o 5-Hidroxitriptofano (5-HTP) a partir do triptofano e a enzima L-aminoácido aromático descarboxilase, que converte o 5-HTP em serotonina.

Fonte: [http://www.orgone.com.br/a\\_thumor1.html](http://www.orgone.com.br/a_thumor1.html).

### 1.8.4. Armazenamento das monoaminas

As monoaminas são armazenadas nos neurónios através de vesículas de armazenamento, capazes de manter os neurotransmissores a uma concentração de 0,1M, o que representa uma concentração de 10-1000 vezes maior do que aquela existente no citoplasma da célula (Elsworth & Roth,1997). Tal acumulação é possível devido a um sistema antiporte, efetuado pelo transportador de monoaminas vesicular (VMAT), que introduz uma monoamina no interior da vesícula por cada protão que é expulso para o citoplasma. As vesículas localizam-se essencialmente nas dendrites e retículo endoplasmático liso dos neurónios (Elsworth & Roth,1997). Este processo é comum à dopamina, adrenalina, serotonina e outras monoaminas, uma vez que o VMAT é um transportador inespecífico.



### **1.8.5. Liberação das monoaminas**

O principal mecanismo de liberação das monoaminas armazenadas nos terminais nervosos pode ser genericamente explicado pelo facto de após a propagação de um impulso nervoso ocorrer localmente um potencial de ação no neurónio que culmina numa mudança da conformação das proteínas de membrana, facto que permite o influxo de iões de cálcio. Esta ocorrência provoca a fusão das vesículas de armazenamento de neurotransmissores com a membrana neuronal e, através de processos de exocitose, as vesículas libertam os neurotransmissores na fenda sinática (Elsworth & Roth,1997).

### **1.8.6. Manutenção dos níveis das monoaminas no cérebro**

#### **1.8.6.1. Manutenção dos níveis de Dopamina**

A manutenção dos níveis de dopamina é assegurada pela recaptação dos neurotransmissores por transportadores dopaminérgicos. Assim, dependendo da concentração de dopamina no interior do neurónio, esse transportador recapta a dopamina libertada caso a concentração seja baixa, ou então liberta dopamina se a concentração no seu interior for muito elevada (Elsworth & Roth,1997).

Outro mecanismo é assegurado pelos autorreceptores. Estes receptores são capazes de reconhecer a dopamina libertada pelo neurónio (Elsworth & Roth,1997) e dependendo da região do cérebro, os autorreceptores possuem capacidade de regular a liberação de dopamina e até a sua síntese (Elsworth & Roth,1997).

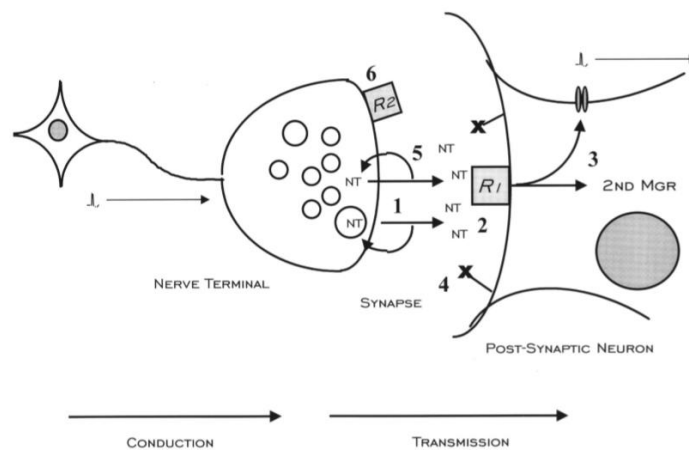
Em geral, todos os autorreceptores da dopamina podem ser classificados como receptores de dopamina do tipo D<sub>2</sub> (Elsworth & Roth,1997; Schmitz *et al.*, 2003) e são mais sensíveis à dopamina do que os receptores pós-sinápticos (Elsworth & Roth,1997). Contudo, a ativação eficiente dos autorreceptores está dependente da acumulação extracelular da DA, originada pela liberação de dopamina (Benoit-Marand, Borrelli & Gonon, 2001), sendo que o mesmo se passa com os receptores pós-sinápticos D<sub>1</sub> (Schmitz *et al.*, 2003).

#### **1.8.6.2. Manutenção dos níveis de Noradrenalina e Adrenalina**

Após a liberação da noradrenalina para a fenda sinática, a noradrenalina pode difundir-se pela fenda sinática e entrar na circulação sanguínea, ser metabolizado na fenda

sinática pela enzima Catecol-O-metiltransferase (COMT) associada à membrana, ou então ligar-se aos recetores  $\alpha_2$  dos nervos pré-sinácticos e exercer um efeito de feedback negativo no impulso nervoso e na libertação de neurotransmissores (Fig. 9) (Fernstrom, 1999; Vincent & Robertson, 2002).

Quando a NA entra no citoplasma, ela pode ser novamente incluída nas vesículas a fim de ser reutilizada aquando da ocorrência do próximo potencial de ação. Outra alternativa é a NA ser oxidada pela MAO, localizada na mitocôndria neuronal, sendo os metabolitos produzidos excretados pela urina (Vincent & Robertson, 2002).



**Fig. 9:** Condução e transmissão neuronal. A despolarização ocorre ao longo do axónio, a partir do corpo celular para o terminal do nervo (condução). Os neurotransmissores (NT) são libertados para a sinapse (1), onde são difundidos, e alguns ligam-se aos recetores pós-sinácticos ( $R_1$ ) (2) que conduz à despolarização neuronal e/ou aos eventos celulares mediados pelos mensageiros secundários (3). Outras moléculas interatuam com enzimas catabólicas (5) e são destruídas, com transportadores de recaptção pré-sináctica (5) ou com recetores pré-sinácticos ( $R_2$ ) (6). Fonte: Fernstrom, 1999.

## 1.8.7. Metabolização das monoaminas

### 1.8.7.1. Metabolização da Dopamina

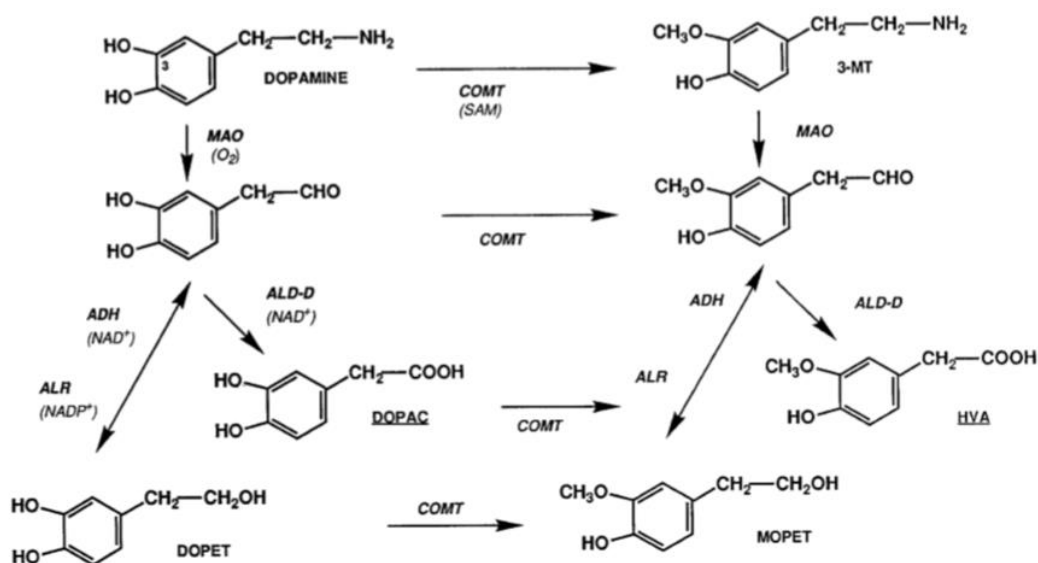
A metabolização da DA envolve a ação de diferentes enzimas (Elsworth & Roth, 1997; Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004). Uma das enzimas que atua diretamente sobre esta catecolamina é a monoamina oxidase (MAO) e a sua ação envolve dois passos principais. O primeiro passo relaciona-se com a formação de aldeídos desaminados, que são metabolitos das catecolaminas de curta duração. O segundo passo é a conversão desses metabolitos em álcoois mais estáveis ou metabolitos de ácido desaminado (Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004).

Então, a ação da MAO sobre a DA originará a formação de 3,4-Dihidroxiacetilfenilacetaldeído (DOPAL), que serve de substrato à ação de duas enzimas designadas de: aldeído redutase e aldeído desidrogenase. Estas duas enzimas formam, respetivamente, o 3,4-Dihidroxi-β-feniletanol (DOPET) e o ácido 3,4-Dihidroxi-β-fenilacético (DOPAC) (Elsworth & Roth, 1997; Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004).

Um outro metabolito importante é o ácido homovanílico (HVA) e a formação deste metabolito envolve reações sequenciais que se iniciam com a ação direta de uma outra enzima (COMT) sobre a DA. Esta reação forma 3-Metoxitiramina (3-MT) que posteriormente é metabolizada pela MAO e de seguida pela aldeído desidrogenase (ALD-D), formando-se então o HVA (Elsworth & Roth, 1997).

A enzima COMT poderá ainda atuar diretamente sobre o DOPET a fim de formar um outro metabolito designado de 3-Metoxi-4-hidroxi-β-feniletanol (MOPET) (Fig. 10).

Na verdade, o principal produto do metabolismo da dopamina é o HVA no caso dos primatas, e o DOPAC no caso dos ratos. Importa também referir que o ácido 3,4-Dihidroxi-β-fenilacético (DOPAC) é formado tanto intraneuronalmente como extraneuronalmente, enquanto que o HVA é formado extraneuronalmente já que o COMT se localiza extraneuronalmente (Elsworth & Roth, 1997).



**Fig. 10:** Vias do catabolismo da dopamina. As enzimas envolvidas estão representadas a itálico e são a monoamino oxidase (MAO), catecol O-metiltransferase (COMT), aldeído desidrogenase (ALD-D), aldeído redutase (ALR) e a álcool desidrogenase (ADH). Os metabolitos formados são designados de 3-Metoxitiramina (3-MT), Ácido 3,4-Dihidroxi-β-fenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), 3,4-Dihidroxi-β-fenil-1-propanol (DOPET), 3-Metoxi-4-hidroxi-β-fenil-1-propanol (MOPET). Fonte: Elsworth & Roth, 1997.

### 1.8.7.2. Metabolização da Noradrenalina e Adrenalina

A NA e a A também podem sofrer a ação da MAO resultando na formação do composto 3,4-Dihidroxifenilglicolaldeído (DOPEGAL). Como se pode observar na Fig. 11, este substrato pode sofrer a ação de duas enzimas, nomeadamente da aldeído redutase (AR) e da aldeído desidrogenase, formando-se 3,4-Dihidroxifenilglicol (DHPG) e ácido 3,4-Dihidroximandélico (DHMA), respetivamente. O DHPG pode ser metabolizado pela enzima COMT no sentido de formar 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG). A ação sequencial das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (AD) resulta na subsequente conversão do MHPG em 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicolaldeído e formação de ácido vanilimandélico (VMA). A COMT pode ainda atuar diretamente sobre a NA ou A e formar metabolitos designados de normetanefrina e metanefrina, respetivamente, e que após a ação da MAO são transformados em 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol aldeído (MOPEGAL). Nesta via, o DOPEGAL e MOPEGAL são aldeídos intermediários de curta duração (Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004).

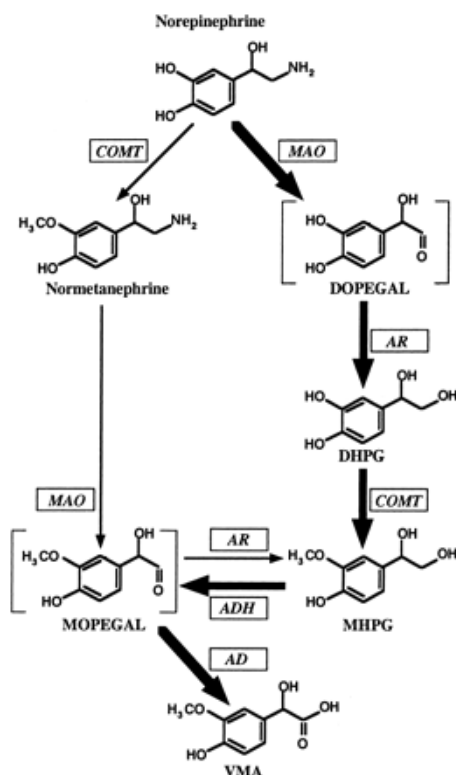


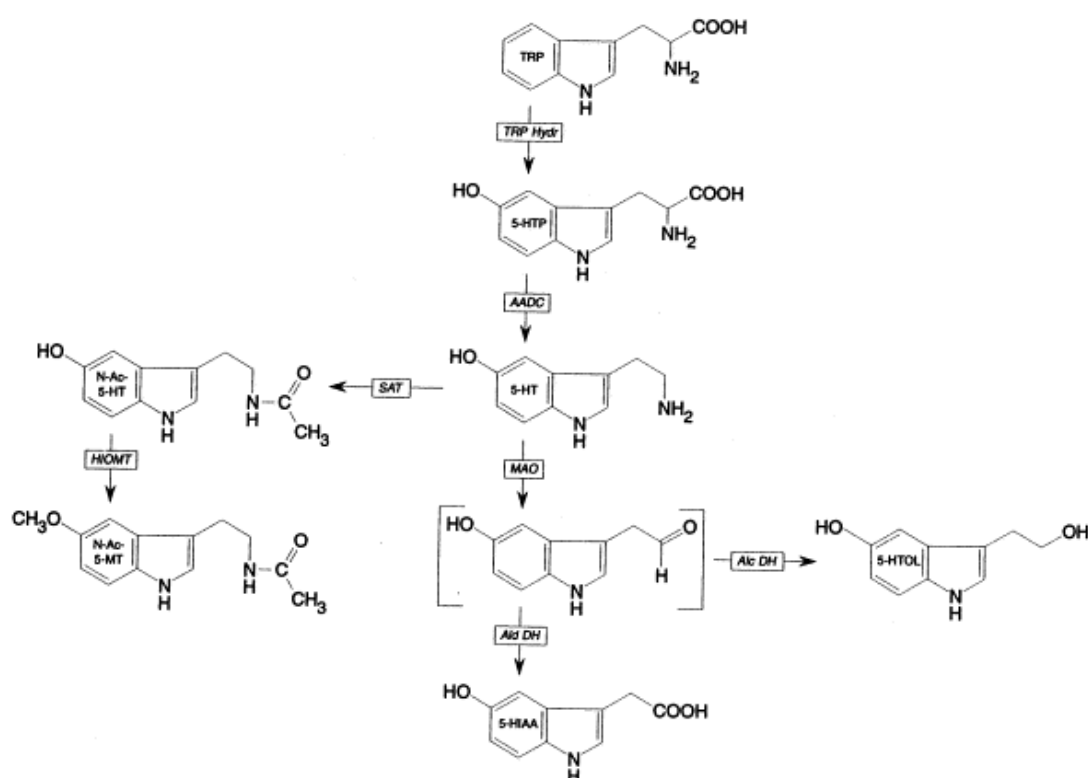
Fig. 11: Vias do metabolismo da norepinefrina. Fonte: Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004.

A ação da MAO sobre a NA com a formação de DOPEGAL e subsequente redução para DHPG pela AR ocorre principalmente nos nervos simpáticos, sendo a principal via de metabolismo da NA. Portanto, o DHPG e o VMA são os principais metabolitos resultante da degradação de NA e A (Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004).

Além disso, importa saber que a enzima COMT encontra-se nos tecidos extraneuronais e, por isso, as reações que envolvem a sua ação ocorrem fora das células (Eisenhofer, Kopin & Goldstein, 2004).

### 1.8.7.3. Metabolização da Serotonina

À semelhança das restantes monoaminas, a 5-HT também é metabolizada pela MAO, mais especificamente pela MAO-B, que tem maior afinidade para a serotonina e noradrenalina. Esta enzima cataliza a reação de desaminação oxidativa da 5-HT formando o produto 5-Hidroxiindoleacetaldeído. Este último pode ser depois oxidado a ácido 5-Hidroxi-indol-acético (5-HIAA) ou reduzido a 5-Hidroxitriptofol. Outras enzimas podem atuar sobre o 5-Hidroxiindoleacetaldeído e formar outros substratos (Kema, Vries & Muskiet, 2000) (Fig. 12)



**Fig.12:** Biossíntese e degradação da serotonina. AADC, L-aminoácido aromático descarboxilase; Alc DH, alcooldihidrogenase; Ald DH, aldehidrogenase; HIOMT, hidroxindol-O-metil transferase; MAO, monoamina oxidase; N-Ac-5-HT, N-acetil-5-hidroxitriptamina; N-Ac-5-Mt, N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina; TRP, triptofano; TRP Hydr, triptofano hidroxilase; 5-HIAA, ácido 5-Hidroxi-indol-acético; 5-HT, serotonina; 5-HT, 5-Hidroxitriptamina; 5-HTOL, 5-Hidroxitriptofol; 5-HTP, 5-Hidroxitriptofano. Fonte: Kema, Vries & Muskiet, 2000.

## **1.9. Modulação nutricional dos genes relacionados com a biossíntese de HUFA**

Entre outros mecanismos, os ácidos gordos conseguem produzir efeitos sobre a transcrição de genes através de recetores nucleares, como os recetores ativados pela proliferação de peroxissomas (PPAR) e através de fatores de transcrição, como a proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) (Cook & McMaster, 2002; Sampath & Ntambi, 2006; Vagner & Santigosa, 2011).

### **1.9.1. Os Recetores Ativados pela Proliferação de Peroxissomas**

Os PPAR são transdutores de proteínas que pertencem a uma superfamília de recetores nucleares (Lemberger, Desvergne & Wahli, 1996) que, quando ativados por nutrientes, hormonas ou metabolitos, controlam a expressão de genes alvo (Wahli, Braissant & Desvergne, 1995; Cook & McMaster, 2002; Nakamura *et al.*, 2004).

A subfamília dos PPAR é composta por três isoformas diferentes designadas de: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  ou  $\delta$  e PPAR $\gamma$  (Lemberger, Desvergne & Wahli, 1996; Yoshikawa *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Kota, Huang & Roufogalis, 2005).

O PPAR $\alpha$  representa a isoforma hepática predominante em mamíferos. Esta isoforma controla os genes envolvidos na absorção intestinal de HUFA, na  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos nas mitocôndrias e nos peroxissomas, bem como na biossíntese de ácidos gordos (Yoshikawa *et al.*, 2003; Rakhshandehroo *et al.*, 2010; Vagner & Santigosa, 2011). O PPAR $\beta$  está envolvido na diferenciação dos queratinócitos onde o metabolismo lipídico é muito ativo (Vagner & Santigosa, 2011). Finalmente o PPAR $\gamma$  está envolvido na adipogénese, estimulação da diferenciação de adipócitos e indução de enzimas lipogénicas (Willson, Lambert & Kliewer, 2001; Sampath & Ntambi, 2006; Vagner & Santigosa, 2011).

No entanto, e independentemente da função, todas as isoformas possuem características estruturais e funcionais semelhantes e foram já identificados 4 domínios diferentes, designadamente: A/B, C, D e E/F (Fig. 13) (Wahli, Braissant & Desvergne, 1995; Lemberger, Desvergne & Wahli, 1996; Kota, Huang & Roufogalis, 2005). O domínio A/B é pouco conservado (Lemberger, Desvergne & Wahli, 1996), localiza-se na região N-terminal, próximo do sítio de ativação transcricional independente do ligante (AF-1), e o seu estado de fosforilação contribui para o controlo da atividade do PPAR (Werman *et al.*, 1997, citado por Kota, Huang & Roufogalis, 2005). O domínio C, ou domínio de ligação ao DNA, promove a ligação do PPAR ao elemento de resposta ao proliferador de

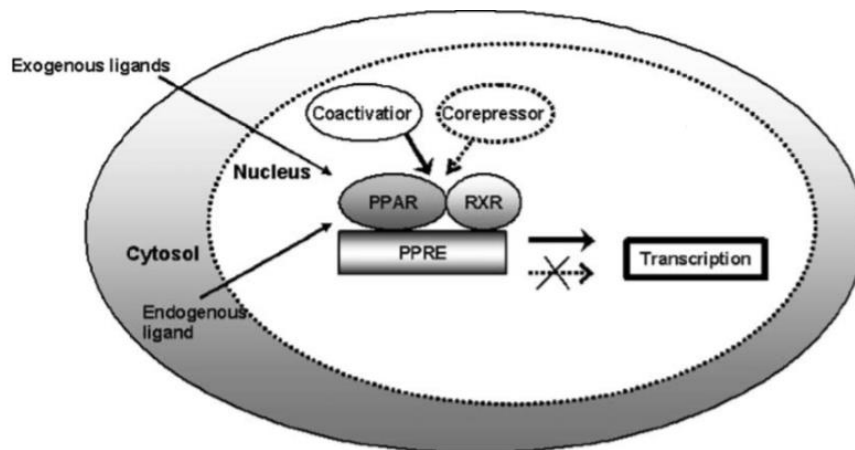
peroxissomas (PPRE), situado na região promotora dos genes alvo (Kliwer *et al.*, 1992, citado por Kota, Huang & Roufogalis, 2005). O domínio D é a região de acoplamento dos cofatores. Por último, o domínio E, ou domínio de ligação ao ligante, é responsável pela ligação específica ao ligando e pela indução da ligação do PPAR ao PPRE, que possibilitará a expressão dos genes-alvo. O recrutamento de cofatores do PPAR, que auxiliam o processo de transcrição dos genes-alvo, é levada a cabo pelo sítio de ativação transcricional dependente de ligante (AF-2) que está localizado no domínio E/F (Rakhshandehroo *et al.*, 2010).



**Fig. 13.** Representação esquemática das funções dos domínios dos recetores ativados pela proliferação de peroxissomas (PPAR). Os PPAR possuem 4 domínios. O domínio A/B, localizado na região N-terminal e que contém a AF-1, o domínio C que é a região de ligação ao DNA, o domínio D que é a região de acoplação dos cofatores e o domínio E/F que é o domínio específico do ligando e contém a AF-2, que promove o recrutamento dos cofatores necessários à transcrição dos genes. Fonte: Kota, Huang & Roufogalis, 2005.

Os ligandos dos PPAR incluem os HUFA (como EPA, DHA e ARA), mas também os eicosanóides, prostaglandinas, leucotreinas e o ácido linoleico conjugado (Vagner & Santigosa, 2011).

Quando o PPAR não se encontra acoplado a nenhum ligando existe a interação do PPAR com complexo antirepressor, o qual apresenta atividade histona deacetilase, e por isso o correpressor inibe a transcrição de genes. Contudo, quando um ligando natural ou sintético se liga ao PPAR, os recetores nucleares sofrem uma alteração conformacional que leva à sua dissociação do correpressor e facilita o recrutamento de proteínas coativadoras, o que possibilita a ativação da transcrição (Schitz & Ecker, 2008). Simultaneamente forma-se um heterodímero composto pelo PPAR e pelo recetor X retinóide (RXR) que interage com os coativadores transcricionais, que apresentam atividade histona acetilase e, por isso facilitam a transcrição de genes (Kota, Huang, Roufogalis & 2005; Shimizu & Moriwaki, 2008; Rakhshandehroo *et al.*, 2010) culminando na ligação do heterodímero ao PPRE (Fig. 14). Os PPRE consistem numa repetição direta de elementos de dois hexanucleótidos com a sequência AGGTCA, separados por um único espaço de nucleotídeos (Wahli, Braissant & Desvergne, 1995; Rakhshandehroo *et al.*, 2010) e que se encontra na região promotora dos genes-alvo (Wahli, Braissant & Desvergne, 1995; Nakamura *et al.*, 2004; Kota, Huang & Roufogalis, 2005; Sampath & Ntambi, 2006).



**Fig. 14:** Mecanismo da transcrição gênica através dos receptores ativados pela proliferação de peroxissomas. No estado desativado, o PPAR interage com o complexo antirepressor; O corepressor apresenta atividade histona deacetilase inibindo a transcrição de genes. Com a ligação do ligando, forma-se o heterodímero PPAR/RXR e o recrutamento de coativadores que contém atividade histona acetilase que facilita a transcrição dos genes. Fonte: Kota, Huang & Roufogalis, 2005.

### 1.9.2. As Proteínas de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol

As proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) pertencem a uma família de fatores de transcrição designada de “basic helix-loop-helix–leucine zipper” (bHLH-Zip). As SREBP possuem a capacidade de se ligarem ao elemento regulador de esterol e, a partir daí, regularem a transcrição de vários genes envolvidos na síntese de colesterol e ácidos gordos (Xu *et al.*, 1999).

Os mamíferos contêm no seu genoma três isoformas da SREBP, denominadas de SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2. A SREBP-1a é capaz de ativar todos os genes de resposta à SREBP, onde se incluem genes responsáveis pela síntese de colesterol, ácidos gordos e triglicerídeos. Por outro lado, a SREBP-1c atua preferencialmente sobre os genes responsáveis pela síntese de ácidos gordos. Já a SREBP-2 atua essencialmente sobre os genes relacionados com a síntese de colesterol (Xu *et al.*, 1999; Horton, Goldstein & Brown, 2002; Nakamura *et al.*, 2004).

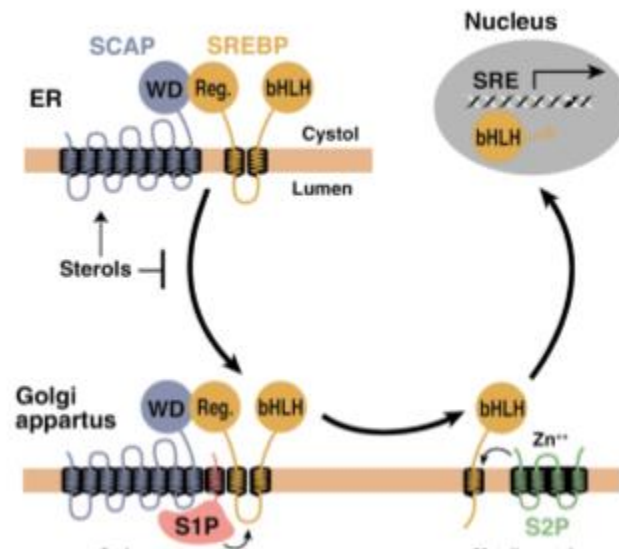
Os precursores SREBP possuem cerca de 1150 aminoácidos e estão organizados em três domínios (Xu *et al.*, 1999; Horton, Goldstein & Brown, 2002):

- ✓ um domínio NH<sub>2</sub>-terminal, contendo a região de bHLH-Zip para a ligação ao DNA;



- ✓ dois segmentos hidrofóbicos transmembranares que se projetam para o lúmen do RE (retículo endoplasmático);
- ✓ um domínio COOH-terminal com cerca de 590 aminoácidos que executa a função reguladora.

Para atingir o núcleo e agir como um fator de transcrição o domínio terminal NH<sub>2</sub>, de cada SREBP deve ser libertado da membrana do RE proteoliticamente, tal como é mostrado na Fig. 15.



**Fig. 15:** Mecanismo da libertação das proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) a partir das membranas por processos proteolíticos mediados por esteróis. A proteína de ativação da clivagem da SREBP (SCAP) é um sensor de esteróis e um acompanhante da SREBP. Quando as células têm falta de esteróis, a SCAP transporta as SREBP a partir do retículo endoplasmático até ao complexo de Golgi, onde estão as proteases do sítio 1 (S1P) e do sítio 2 (S2P), as quais atuam sequencialmente para libertar o domínio bHLH-Zip NH<sub>2</sub>-terminal a partir da membrana. Consequentemente, o domínio bHLH-Zip NH<sub>2</sub>-terminal entra no núcleo e liga-se ao elemento de resposta ao esterol, ativando a transcrição dos genes. Quando há muito esterol disponível, a SCAP é retida no retículo endoplasmático e as SREBP não vão até ao complexo de Golgi, resultando na inibição da expressão dos genes. Fonte: Horton, Goldstein & Brown, 2002.

### 1.9.3. Os ácidos gordos como reguladores dos fatores transcripcionais

Até agora, os estudos *in vivo* têm demonstrado que o PPAR $\alpha$  e a SREBP-1c regulam a transcrição dos genes alvo dos ácidos gordos (Jump, Tripathy & Depner, 2013). Porém,

tem de existir um mecanismo que controle os fatores de transcrição. Na verdade tem-se observado que os ácidos gordos são capazes de regular a atividade e abundância de fatores de transcrição como o PPAR e SREBP-1c (Jump, Tripathy & Depner, 2013).

### **1.9.3.1. Influência dos ácidos gordos na regulação do PPAR $\alpha$**

Tal como referido, de todas as isoformas de PPAR os PPAR $\alpha$  são os recetores de PUFA mais importantes, estando intimamente relacionados com a expressão de genes envolvidos na oxidação mitocondrial e peroxissomal (Georgiadi & Kersten, 2012).

Esta interação é conseguida porque os ácidos gordos funcionam como hormonas hidrofóbicas que controlam a função dos recetores nucleares, como é o caso da família dos PPAR (Jump, Tripathy & Depner, 2013). Todos os ácidos gordos de cadeia longa saturados e insaturados ligam-se aos PPAR (Yoshikawa *et al.*, 2003). A junção destes ligandos estimula a troca de correpressores por coativadores sobre os recetores ligados à cromatina e ao recrutamento de mais proteínas envolvidas na transcrição do gene, tais como o ácido ribonucleico (RNA) e a polimerase II (Georgiadi & Kersten, 2012). Deste modo, a ativação do PPAR $\alpha$  por ácidos gordos faz parte de um mecanismo “feed-forward” que não só induz a oxidação dos ácidos gordos que entram na célula, mas impede também que esses compostos lipotóxicos se acumulem na mesma (Georgiadi & Kersten, 2012).

Embora os PPAR sejam sensores intracelulares de ácidos gordos, importa referir que os PPAR respondem de modo diferente aos vários ácidos gordos, tendo diferentes efeitos na ativação do PPAR $\alpha$  ou na indução dos genes alvo do PPAR $\alpha$ . Na verdade, os ácidos gordos não esterificados são considerados os principais ligandos do PPAR $\alpha$ . O EPA e o DHA induzem um aumento significativo da transcrição dos genes-alvo do PPAR $\alpha$ , ao passo que o ácido oleico (18:1 n-9) tem um efeito menos significativo na indução da transcrição desses mesmos genes (Lemberger, Desvergne & Wahli, 1996; Jump, Tripathy & Depner, 2013). Isto significa que os ácidos gordos de cadeias maiores ativam mais eficientemente o PPAR $\alpha$  do que os de cadeia curta, tal como acontece com os ácidos gordos da série n-3 quando comparados com os da série n-6 (Wahli, Braissant & Desvergne, 1995).

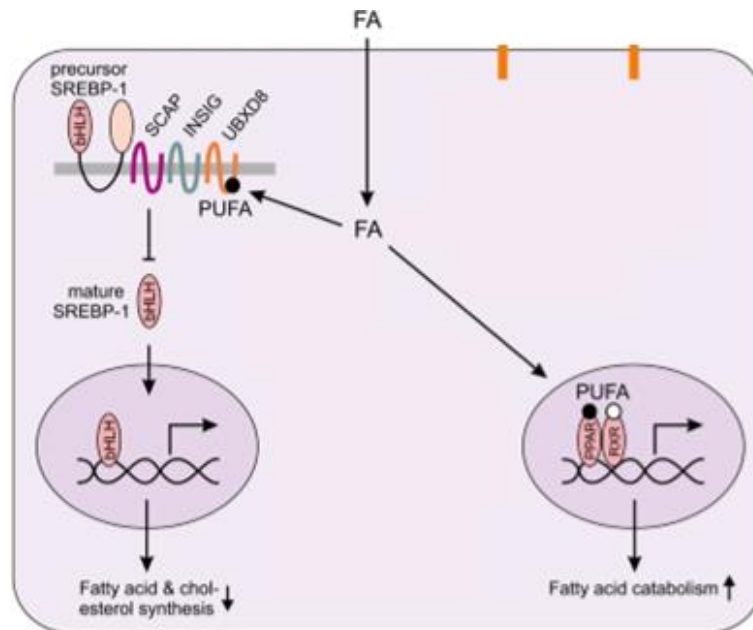
### 1.9.3.2. Influência dos ácidos gordos na regulação da SREBP-1

Os PUFA conseguem inibir a expressão dos genes relacionados com as SREBP (Xu *et al.*, 2001; Nakamura & Nara, 2003), dado que aumentam a taxa de degradação do mRNA das SREBP (Xu *et al.*, 2001; Nakamura & Nara, 2003). Porém, a capacidade destes ligandos atuarem a este nível é diferenciada, sendo maior sobre a SREBP-1 do que sobre a SREBP-2 (Xu *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2003). Além disso, a SREBP-1c é mais sensível à regulação dos PUFA do que a SREBP-1a (Xu *et al.*, 2001).

Na verdade, a SREBP-1 funciona como um regulador chave no controlo da transcrição de genes responsáveis pela síntese e transporte de ácidos gordos (Jump, Tripathy & Depner, 2013) através de um mecanismo que envolve duas fases. A primeira fase é rápida e tem como objetivo inibir o processo de libertação proteolítico. A segunda tem como objetivo reduzir o conteúdo de mRNA de SREBP-1, e conseqüentemente, reduzir a quantidade de precursores da proteína SREBP-1 (Xu *et al.*, 1999; Clarke, 2001; Jump *et al.*, 2005).

Além disso, também tem sido sugerido que apenas o DHA e não outros PUFA estimulam a remoção da SREBP-1 nuclear (nSREBP-1) (Georgiadi & Kersten, 2012). Este processo é conseguido pois as SREBP são fosfoproteínas e o seu estado de fosforilação controla a sua capacidade para ativar os genes, bem como a sua abundância nuclear. Assim, a fosforilação de SREBP dentro do domínio de ligação de DNA inibe a ligação ao SREBP (Fig. 16) (Georgiadi & Kersten, 2012; Jump, Tripathy & Depner, 2013).

O DHA regula, portanto, a abundância da nSREBP-1 por meio de mecanismos de fosforilação/desfosforilação e por degradação proteossomal (Jump, Tripathy & Depner, 2013), conseguindo assim inibir a transcrição de genes lipogénicos (Xu *et al.*, 1999; Clarke, 2001).



**Fig. 16.** Mecanismos gerais da regulação dos genes pelos ácidos gordos polinsaturados (PUFA). O mecanismo mostra que os PUFA reduzem a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de colesterol e ácidos gordos pela ligação e inativação da UBXD8, inibindo assim, as proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) por processos proteolíticos. Vários ácidos gordos, mas especialmente os PUFA, atuam como ligandos dos PPAR. A ativação do PPAR $\alpha$  pelos PUFA leva ao catabolismo dos ácidos gordos. Fonte: Georgiadi & Kersten, 2012.

#### 1.9.4. Influência dos ácidos gordos na expressão da *Fads2*

Nos mamíferos foi observado que a região promotora do gene da  $\Delta 6$  dessaturase é ativada pela SREBP-1 (Horton, Goldstein & Brown, 2002; Matsuzaka *et al.*, 2002).

Sendo assim, quando as dietas são incrementadas com PUFA, ocorre uma diminuição da abundância de nSREBP-1, bem como dos seus genes-alvo hepáticos, como as dessaturases (por exemplo *Fads1* e *Fads2*) e as elongases (tal como *Elovl5* e *Elovl6*) (Jump, Tripathy & Depner, 2013). Existe então uma diminuição do mRNA do gene que codifica a  $\Delta 6$  dessaturase quando a dieta é suplementada com PUFA e, contrariamente a deficiência em ácidos gordos essenciais induz a transcrição do gene *Fads2* (Cho, Nakamura & Clarke, 1999).

Relativamente ao papel dos PPAR, sabe-se que os ácidos gordos atuam como ligando agonístico do PPAR $\alpha$ , o qual atua sobre os genes da oxidação lipídica. Assim, quando os PUFA se ligam ao PPAR $\alpha$ , este último liga-se ao PPRE da região promotora dos genes

da oxidação lipídica, induzindo a oxidação dos ácidos gordos, tanto nos peroxissomas como nas mitocôndrias. Por outras palavras, o aumento de PUFA na dieta promove a oxidação dos ácidos gordos pela ação do PPAR $\alpha$  (Nakamura & Nara, 2003; Tang *et al.*, 2003).

#### **1.9.5. Influência dos ácidos gordos na expressão da *fads2* dos peixes teleósteos**

Os mecanismos e processos envolvidos na regulação da expressão da *fads2* são menos conhecidos nos peixes do que nos mamíferos (Vagner & Santigosa, 2011). Apesar disso, já há alguns estudos que revelam a importância dos PPAR na modulação nutricional em peixes.

O estudo levado a cabo por Kennedy *et al.* (2006) constatou que, no salmão, o incremento de óleo de peixe na dieta diminuiu a expressão do gene que codifica a  $\Delta 6$  dessaturase do fígado. Coincidentemente, a expressão do PPAR $\alpha$  e do PPAR $\beta$  diminuiu com o aumento da quantidade de óleo de peixe na dieta (Kennedy *et al.*, 2006). Neste mesmo estudo, a expressão do gene do PPAR $\alpha$  excedeu em muito a do PPAR $\beta$ , facto que evidencia a maior importância do PPAR $\alpha$  naquela regulação (Kennedy *et al.*, 2006). Trabalhos desenvolvidos em outras espécies têm confirmado esses resultados. Por exemplo, em *Fugu rubripes*, *Dicentrarchus labrax* (robalo), *Sparus aurata* (dourada) e *Pleuronectes platessa* (solha), a clonagem e caracterização dos genes que codificam os PPAR revelaram elevada homologia com os PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$  e  $\gamma$  dos mamíferos (Maglich *et al.*, 2003; Boukouvala *et al.*, 2004; Leaver *et al.*, 2005).

No peixe-zebra também foi caracterizado o cDNA, que codifica duas proteínas homólogas ao PPAR $\beta$  dos mamíferos, sugerindo a existência de mais do que três genes para os PPAR (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001). Por outro lado, em *S. aurata* e em *P. platessa* não foram encontrados mais do que três genes para o PPAR (Leaver *et al.*, 2005).

Tal como nos mamíferos, é provável que nos peixes os isotipos também formem um heterodímero com o RXR e se liguem aos elementos de resposta do PPAR (PPRE) (Boukouvala *et al.*, 2004; Leaver *et al.*, 2005).

Além disso, confirmou-se que os ácidos gordos também são ligandos do PPAR $\alpha$  e  $\beta$ , podendo atuar por mecanismos semelhantes aos PPAR dos mamíferos (Boukouvala *et al.*, 2004; Leaver *et al.*, 2005). Aliás, em *S. aurata*, a ativação do PPAR $\gamma$  só foi conseguida pelos HUFA (como EPA, DHA e ARA), já que os ácidos gordos saturados ou monoinsaturados não produziram qualquer efeito significativo (Leaver *et al.*, 2005).

Estudos mais recentes, realizados em larvas de peixe, confirmaram que esta modulação nutricional é bem evidente mesmo em estágios de desenvolvimento precoces (Vagner *et al.*, 2007b; Vagner *et al.*, 2009).

#### **1.9.6. Influência dos ácidos gordos na expressão da *Elov15***

Nos mamíferos, a *Elov15* é regulada pela SREBP (Jakobsson, Westerberg & Jacobsson, 2006; Quin *et al.*, 2009), tendo alguns estudos demonstrado que o aumento da expressão da SREBP-1 conduz ao aumento dos níveis de mRNA da *Elov15* (Horton *et al.*, 2003). Na verdade, os níveis transcricionais da *Elov15* são regulados, mais especificamente, pela SREBP-1c (Quin *et al.*, 2009).

Por outro lado, os PUFA inibem a transcrição dos genes envolvidos na lipogénese, dado que eles próprios inibem a expressão do gene da SREBP-1 através da redução dos níveis de nSREBP-1 (Quin *et al.*, 2009).

Este efeito inibitório apenas é conseguido por determinados ácidos gordos, já que em hepatócitos isolados de ratos, este efeito foi evidente com o ARA, mas esteve ausente com o ácido oleico (Xu *et al.*, 1999). De facto, mais tarde, Botolin *et al.* (2006) constataram que o EPA e o DHA suprimem a lipogénese por fosforilação do nSREBP-1.

Por outro lado, a diminuição da atividade da ELOVL5 diminui a quantidade de HUFA C<sub>20-22</sub>. Este fenómeno origina a ativação da SREBP-1c e, conseqüentemente, estimula os genes envolvidos na síntese de ácidos gordos e triglicéridos (Moon, Hammer & Horton, 2009; Quin *et al.*, 2009).

O PPAR $\alpha$  também regula a expressão da *Elov15*, tendo sido observado que a estimulação do PPAR $\alpha$  promove também a expressão da *Elov11*, *Elov13*, e *Elov16* (Jakobsson, Westerberg & Jacobsson, 2006).

Em suma, a expressão da *Elov15* é controlada nutricionalmente pois os HUFA inibem a síntese de ácidos gordos (Horton, Goldstein & Brown, 2002; Wang *et al.*, 2005; Espenshade, 2006).

#### **1.9.7. Influência dos ácidos gordos na expressão da *elov15* dos peixes teleósteos**

Até ao momento, alguns estudos demonstraram que os mecanismos envolvidos no controlo do metabolismo lipídico dos peixes são similares à dos mamíferos, na medida descreveram uma forte correlação entre os níveis de mRNA dos genes do metabolismo

lipídico com os níveis de mRNA das SREBP e dos PPAR (Morais *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2013)

De facto, Leaver *et al.* (2008b) constataram que a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de colesterol, assim como o gene que codifica a SREBP-2, aumentou no fígado dos peixes alimentados com dietas cujo óleo de peixe da dieta foi substituído por óleos vegetais como o óleo de colza, de soja ou de linhaça. Esta observação demonstra a importância da SREBP-2 no metabolismo lipídico. Além disso, a substituição de óleo de peixe por óleo vegetal originou o aumento significativo da expressão do gene da SREBP-1 no fígado de salmões (Morais *et al.*, 2011). Por outro lado, a mesma substituição influenciou ainda de forma negativa a expressão quer do gene do PPAR $\alpha$  quer do gene do PPAR $\beta$ , indicando a intervenção de ambos na regulação nutricional. Já o gene do PPAR $\gamma$  não demonstrou qualquer alteração na sua expressão, uma vez que se relaciona com a diferenciação de adipócitos (Morais *et al.*, 2011). Um outro trabalho constatou que a transcrição da maior parte dos genes envolvidos no metabolismo dos ácidos gordos tem uma forte correlação com os níveis de mRNA dos PPAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  durante o desenvolvimento das larvas do *Scophthalmus maximus* (Cunha *et al.*, 2013),

Desta forma, a modulação nutricional dos peixes parece seguir os mecanismos descritos para os mamíferos, sendo que o PPAR $\alpha$ , o PPAR $\beta$  e a SREBP-1 parecem desempenhar um papel crucial na modulação nutricional dos ácidos gordos no metabolismo dos ácidos gordos.

#### **1.9.8. Influência do selénio na expressão adipogénica**

Os ácidos gordos não são os únicos nutrientes capazes de influenciar a expressão de genes-alvo. Até ao momento tem-se verificado que a suplementação da dieta com selénio aumenta a atividade das selenoproteínas e potencia a expressão dos seus respetivos genes (Bermano *et al.*, 1995).

Trabalhos recentes sobre terapias oncológicas (Cho *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Rayman, 2005; Chun *et al.*, 2006) mostraram que o “Methylseleninic acid” (MSA), um metabolito do selénio, altera a expressão de diversos genes envolvidos na regulação da apoptose (Dong *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004), tendo também efeitos no controlo do ciclo celular e em moléculas de sinalização (como as ciclinas A e D<sub>1</sub>) (Dong *et al.*, 2002).

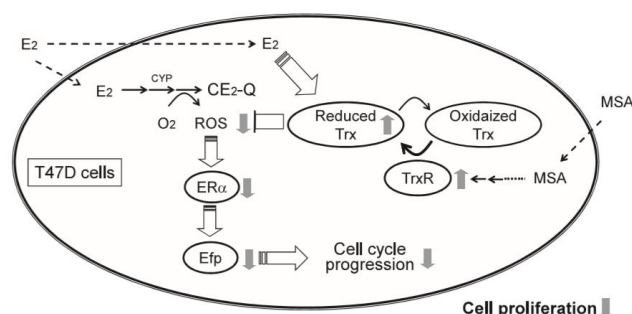
O selénio tem sido apontado como podendo desempenhar um potencial papel no tratamento de alguns tipos de cancro com base no seu efeito na disrupção dos recetores

de estrogénios. Os recetores de estrogénio, em particular o recetor de estradiol são fatores de transcrição hormono-dependentes que pertencem à família de receptores de esterol (Lee *et al.*, 2005).

Neste sentido, a suplementação da dieta com selénio diminui a expressão do recetor de estrogénio  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), bem como a ligação do estradiol a esse recetor de estrogénio (Lee *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2005). A mesma relação foi estabelecida para os recetores de androgénios (Dong *et al.*, 2004; Zhao *et al.* 2004).

Além destas evidências, o selénio foi considerado importante na diminuição da estabilidade do mRNA do recetor de androgénios, na aceleração da degradação da proteína do recetor de androgénios e como bloqueador da translocação do recetor de androgénios nucleares. O selénio inibe também o recrutamento de coativadores e mantém os correpressores ligados aos promotores dos genes-alvo (Dong *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 2006).

Porém, o mecanismo pelo qual o selénio inibe o recetor de estrogénio  $\alpha$  não é totalmente conhecido. Okuno *et al.* (2012) propuseram um possível mecanismo que poderá explicar essa interação, baseado na capacidade antioxidativa deste micronutriente. Segundo os esses autores, o MSA é conhecido por diminuir os níveis das espécies reativas de oxigénio (ROS) que provocam danos nas células e no DNA (Rayman, 2005). Dentro dos sistemas envolvidos neste mecanismo, destaca-se o sistema tioredoxina (Trx)/tioredoxina redutase (TrxR) que é a chave da regulação do estado redox das células. Neste contexto, a ação do MSA dever-se-á ao fato deste aumentar a expressão da TrxR bem como a sua atividade enzimática. Assim, a Trx oxidada é inativada, mas é convertido à forma reduzida ativa pela TrxR que se liga às ROS e protege as células do stress oxidativo (Okuno *et al.*, 2012). Por conseguinte, as baixas concentrações de ROS modelam a expressão do RE $\alpha$  que culmina na diminuição da proteína RE $\alpha$ . Como consequência ocorre a disrupção da sinalização do RE $\alpha$  (Fig. 17) (Okuno *et al.*, 2012).



**Fig. 17:** Mecanismo de inibição do recetor de estrogénio e consequente inibição da progressão do ciclo celular pelo MSA. E2: 17 $\beta$ -estradiol; CE2-Q: catecol E quinona; CYP: cotocromo p-450; ER $\alpha$ : recetor de



estrogênio  $\alpha$ ; Efp: proteína indicadora do recetor de estrogênio; ROS: espécies reativas de oxigênio; MAS: Methylseleninic acid; Trx: tioredoxina; TrxR: tioredoxina redutase. Fonte: Okuno *et al.*, 2012.

Okuno *et al.* (2012) concluíram então que o selênio é importante no combate do stress oxidativo das células e poderá ser crucial na modulação da expressão dos genes regulados pelos recetores nucleares.

## **1.10. Efeito da substituição de óleo de peixe por óleo vegetal da dieta na expressão adipogénica**

### **1.10.1. Efeito da substituição de óleo de peixe por óleo vegetal da dieta na expressão da *fads2***

A modulação nutricional dos genes que codificam as dessaturases em peixes tem sido extensamente reportada (Seilliez *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2005a, 2005b; Leaver *et al.*, 2008b). Na truta, a substituição de óleo de peixe por óleo de linhaça levou ao aumento da expressão do gene da  $\Delta 6$  dessaturase (Seilliez *et al.*, 2001) e resultados semelhantes foram obtidos também em salmão (Zheng *et al.*, 2005a, 2005b; Leaver *et al.*, 2008b; Monroig *et al.*, 2010).

Nos peixes marinhos, este tipo de estudos foram realizados em diversas espécies e revelaram a mesma tendência descrita para os salmonídeos (Seilliez *et al.*, 2003; Tocher *et al.*, 2006; Vagner *et al.*, 2007a). Porém, nas espécies marinhas, o aumento da expressão do gene da  $\Delta 6$  dessaturase nem sempre foi suficiente para garantir o “turnover” dos fosfolípidos da membrana (Vagner *et al.*, 2007a).

Outros trabalhos têm concluído que nalgumas espécies marinhas a atividade da  $\Delta 6$  dessaturase hepática é tendencialmente baixa (Mourente & Dick, 2002; Tocher *et al.*, 2006; González-Rovira *et al.*, 2009). Além disso, a sua atividade não se alterou, tanto nos hepatócitos como dos enterócitos, quando os óleos de peixe foram substituídos por óleos vegetais na dieta (Deveras, Mourente & Dick, 2002; Mourente *et al.*, 2005; Tocher, 2006). Estas evidências contrastam com os resultados obtidos nos peixes de água doce e salmonídeos, espécies em que o aumento da expressão génica tende a repercutir-se no aumento da atividade enzimática (Zheng *et al.*, 2005b; Vagner & Santigosa, 2011).

### **1.10.2. Efeito da substituição de óleo de peixe por óleo vegetal da dieta na expressão da *elov15***

A substituição de óleo de peixe por óleo vegetal afecta a expressão dos genes envolvidos na síntese de ácidos gordos polinsaturados, incluindo no gene que codifica a *Elov15* (Geay et al., 2011).

Este efeito tem sido particularmente bem estudado no salmão. Diversos estudos comprovaram que o grau crescente de substituição (50%, 75% e 100%) de óleo de peixe por óleo vegetal aumenta, progressivamente, a expressão do gene da *elov15* no fígado desta espécie (Zheng et al., 2004b, 2005a, 2005b; Jordal et al., 2005; Miller et al., 2008; Morais et al., 2009).

Este mecanismo também tem sido estudado em espécies tipicamente de água doce como são o caso do *Xiphophorus helleri* e do *Danio rerio*. Em reprodutores de *Xiphophorus helleri*, a substituição de 50% e 100% de óleo de peixe por óleo de linhaça provocou o crescente aumento dos níveis de mRNA da *Elov15* no fígado, músculo e ovários (Ling et al., 2006), sendo que tais condições experimentais revelaram um efeito similar em reprodutores de *Danio rerio* (Jaya-Ram et al., 2008).

Por conseguinte, em espécies de água doce, a atividade das elongases no fígado é potenciada pelo aumento de lípidos C<sub>18</sub> na dieta (Bell et al., 2001).

### **1.11. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema monoaminérgico do cérebro**

#### **1.11.1. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema dopaminérgico do cérebro**

A influência da dieta no sistema dopaminérgico do cérebro também tem sido estudada. Alguns estudos têm concluído que a deficiência em ácidos gordos essenciais na dieta conduz à diminuição da libertação de dopamina a partir das vesículas sináticas secretoras (Zimmer et al., 1999, 2000a). Esta diminuição leva a alterações dos níveis basais de DA bem como dos seus metabolitos (DOPAC e HVA) (Zimmer et al., 2000a).

Essa condição também se revelou importante na diminuição da densidade de VMAT<sub>2</sub> (Zimmer et al., 1999; Kudas et al., 2002b) e de vesículas pré-sináticas em diversas regiões cerebrais (Yoshida et al., 1997; Zimmer et al., 1998, 1999; 2000b). A diminuição do compartimento de armazenamento de DA nas vesículas pré-sináticas também foi observada (Chalon et al., 2001; Zimmer et al., 1999, 2000a, 2000b).

Estas modificações têm sido associadas com a alteração da composição dos fosfolípidos da membrana neuronal que acaba por influenciar a dinâmica da reciclagem das vesículas sináticas, diminuindo a velocidade da sua síntese, bem como a internalização das monoaminas nas vesículas de armazenamento (Yoshida *et al.*, 1997; Zimmer *et al.*, 1998; Kudas *et al.*, 2002b). As consequências destas modificações cumulativas são diversificadas, mas podem ser, por exemplo, alterações comportamentais (Kudas *et al.*, 2002a) ou diminuição das capacidades cognitivas (Arsenault *et al.*, 2012).

### **1.11.2. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema noradrenérgico e adrenérgico do cérebro**

No hipotálamo e córtex cerebral dos ratos alimentados com dietas suplementadas com PUFA verificou-se um aumento dos níveis de NA e A (Varghese *et al.*, 2001).

Por outro lado, a administração de uma dieta pobre em PUFA n-3 conduziu a valores de NA mais baixos no córtex cerebral, hipocampo e corpo estriado, em comparação com as mesmas regiões cerebrais em ratos alimentados com as quantidade adequados de DHA (Takeuchi, Fukumoto & Harada, 2002).

### **1.11.3. Influência dos ácidos gordos da dieta no sistema serotoninérgico do cérebro**

A homeostasia da 5-HT também é afetada pelo perfil de ácidos gordos na dieta. Com efeito, alguns trabalhos reconheceram que os níveis basais de 5-HT (Kudas *et al.*, 2004; Vancassel *et al.*, 2008), bem como a sua libertação, são alterados pelas dietas pobres em PUFA n-3 (Kudas *et al.*, 2004; Vancassel *et al.*, 2008). Além disso, estas dietas culminaram em concentrações basais extracelulares de 5-HT mais elevadas, pois a sua libertação foi afetada (Kudas *et al.*, 2004). Curiosamente a deficiência de PUFA n-3 na dieta não se tem revelado tão importante na influência da metabolização da 5-HT, nomeadamente na formação do metabolito 5-HIAA (Varghese *et al.*, 2001).

Efetivamente considera-se que as dietas pobres em PUFA n-3 prejudicam o pool vesicular de 5-HT (Kudas *et al.*, 2004). Aliás, tem-se sugerido que a diminuição da libertação de neurotransmissores está relacionada com a deficiência em sintetizar vesículas sináticas devido a transtornos no transporte, endocitose ou biogénese das vesículas sináticas (Lesca *et al.*, 2003; Marza *et al.*, 2008).

Além disso, a 5-HT possui uma enorme diversidade de recetores, alguns dos quais com funções antogónicas. O aumento do rácio n-6/n-3 tem sido associado à redução da densidade desses receptores (Bois *et al.*, 2006).

#### **1.11.4. Efeito dos antioxidantes no sistema monoaminérgico**

Existe a evidência de que a diminuição da peroxidação lipídica conduz ao aumento dos níveis de monoaminas, designadamente a DA e a NA. Estas alterações poderão estar relacionadas com a estimulação da síntese e/ou libertação de monoaminas e diminuição da metabolização das mesmas (Ferreira, Militão & Freitas, 2009).

A administração de antioxidantes na dieta, como por exemplo de selénio, um componente estrutural de muitas enzimas com atividade antioxidante, poderá ser determinante na homeostasia do sistema monoaminérgico (Hesketh, 2008; Ferreira, Militão & Freitas, 2009).

## 2. OBJETIVOS

A corvina é uma excelente candidata à diversificação das espécies a produzir em aquacultura. No entanto, a produção de espécies carnívoras, como é o caso da corvina, está altamente dependente dos produtos extraídos da pesca (farinhas e óleos) e dos seus desperdícios, que por sua vez se encontra estagnada (FAO, 2014). Por isso, é imperativo encontrarmos alternativas às fontes de óleo de peixe. Recentemente têm sido estudados os óleos vegetais como fonte alternativa aos óleos de peixe (Estévez *et al.*, 2011). Estes óleos são, porém, ricos em PUFA C<sub>18</sub>, como o LA e o ALA, mas desprovidos de HUFA da série n-3, como o EPA e o DHA, que são abundantes no óleo de peixe (Tocher, 2003; Leaver *et al.*, 2008a). Desta forma, a substituição de óleo de peixe por óleo vegetal pode comprometer o valor nutricional do pescado, principalmente das espécies marinhas, as quais se têm revelado menos eficazes em converter o LA e o ALA em HUFA (Tocher *et al.*, 2006; Geay *et al.*, 2010). Contudo, a corvina é uma espécie diadrômica e este comportamento poderá oferecer benefícios relacionados com a biossíntese de HUFA a partir de LA e ALA, tal como acontece com o salmão (Monroig *et al.*, 2013).

Os benefícios dos HUFA da série n-3, tais como EPA e DHA, têm sido extensamente descritos. Estes ácidos gordos são extremamente importantes para as funções cerebrais, especialmente na manutenção da fluidez membranar e normal funcionamento da mesma. Além disso, o défice destes ácidos gordos tem sido relacionado com as perturbações das funções cerebrais que podem resultar em alterações comportamentais. Sendo a composição das membranas celulares o reflexo da composição dos ácidos gordos da dieta, o défice de ácidos gordos essenciais, como LA, ALA, EPA e DHA, poderá culminar na alteração do sistema monoaminérgico e serotoninérgico do cérebro dos animais.

Por outro lado, e como vimos, os PUFA são suscetíveis à peroxidação lipídica e esta susceptibilidade aumenta com o aumento do grau de insaturação dos mesmos. Por isso, o fornecimento de antioxidantes na dieta poderá contribuir para a integridade das membranas celulares e, conseqüentemente, para o normal funcionamento cerebral.

Até ao momento, o funcionamento desses mecanismos e a importância dos seus efeitos no sistema nervoso dos peixes é pouco conhecido.

Por isso, com base nestes pressupostos teóricos, formulamos duas hipóteses de trabalho:

- ✓ A substituição de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais potencia a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de HUFA, nomeadamente da *fads2* e da *elov15*, assim como compromete as funções do sistema monoaminérgico e serotoninérgico do cérebro;

- ✓ A suplementação das dietas com selênio favorece a expressão dos genes *fads2* e *elov15* e minimiza os danos sobre o sistema monoaminérgico devido à sua influência nos processos antioxidativos das células.

Deste modo, os nossos objetivos específicos foram:

- ✓ Estudar a influência da substituição total de 12% de óleo de peixe por 12% de misturas de óleos vegetais, compostos por linhaça, colza e soja, na expressão dos genes *fads2* e *elov15*, envolvidos, respetivamente, nos passos críticos da dessaturação e alongação dos ácidos gordos, bem como na concentração de alguns neurotransmissores centrais na corvina, tais como DA, 5-HT, NA e A e seus metabolitos como DOPAC, HVA e 5-HIAA.
- ✓ Analisar o efeito do selênio na expressão dos genes *fads2* e *elov15* e na concentração de alguns neurotransmissores centrais na corvina, tais como DA, 5-HT, NA e A e seus metabolitos como DOPAC, HVA e 5-HIAA.

Como este é um dos primeiros trabalhos executados no âmbito da influência da dieta sobre a modulação adipogénica e neurotransmissão em corvina, e uma vez que o conhecimento destas temáticas em peixes é ainda exíguo, este trabalho também tem como objetivo fazer uma extensa revisão bibliográfica sobre os temas abordados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais experimentais**

Um total de 552 juvenis de *Argyrosomus regius*, com  $20,45 \pm 1,4$ g foram transportados do Instituto Português do Mar e da Atmosfera/Sul, Olhão para as instalações experimentais de Produção Aquática do ICBAS (Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar), da Universidade do Porto.

#### **3.2. Instalações experimentais**

O sistema experimental foi constituído por 12 tanques cónicos, com uma capacidade de 80 litros. No início do ensaio foram colocados 23 peixes com o peso individual de aproximadamente 20 gramas em cada tanque. A renovação de água foi feita com um caudal de 6l/min, através de um sistema de recirculação que incluiu um filtro mecânico, composto por esponjas e filtro de areia, por um escumador, por um sistema de filtração biológica por percolação e por um sistema de desinfecção por UV. Os parâmetros físico-químicos da água, tais como temperatura, salinidade e compostos azotados, foram monitorizados e controlados diariamente. Assim, a temperatura foi mantida entre os  $20,7 \pm 0,7$  °C, os níveis de oxigénio próximos dos 6 mg/l, o pH entre os 8-8,5 e o fotoperíodo foi controlado artificialmente com lâmpadas fluorescentes (12 horas de luz e 12 horas de escuridão). Os níveis de amónia e nitritos foram mantidos dentro da gama de concentrações aceites para a corvina.

#### **3.3. Dietas**

O ensaio experimental foi delineado com a finalidade de testar dietas com diferentes formulações em juvenis de corvina. Foram testadas, em triplicado (n=3 tanques), 4 dietas isoproteicas e isolipídicas (50% de proteína e 12% de lípidos) com óleo de peixe (OP) ou misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)] cada uma com selénio (S, 1mg/kg) ou sem selénio (NS). Os ingredientes e a composição química das 4 dietas estão apresentados nas tabelas 6 e 7. A alimentação foi feita até à saciedade aparente, 2 vezes ao dia, 6 vezes por semana.

**Tabela 6:** Ingredientes e percentagem de inclusão dos diferentes lípidos que compõem as 4 dietas testadas.

	Soja concentrada	Visceras. Farinha de Aves	Penas. Farinha (56%)	Trigo. Farelo	Milho. Grão	Carne. Farinha (43%)	Trigo. Glúten	DL - Metionina	Binder	Fungistático	Vitamina C	Selénio	Óleo de Peixe	Óleo de Colza	Óleo de Linhaça	Óleo de Soja	Premix – Vit e Mineral (sem selénio)	Cloreto de Colina
<b>ÓLEO DE PEIXE 12% (%)</b>	28,4	17	12	8,8	6	5,61	4	0,5	0,5	0,2	0,01	0,0/0,1	6,16				0,35	0,15
<b>MISTURA VEG 12 % (%)</b>	28,4	17	12	8,8	6	5,61	4	0,5	0,5	0,2	0,01	0,0/0,1		1,85	3,08	1,23	0,35	0,15

**Tabela 7:** Composição nutricional das 4 dietas testadas em corvina (*Argyrosomus regius*).

	CÁLCIO (%)	ENERG. DIG. PEIXES (Mcal/kg)	FIBRA BRUTA (%)	FÓSFORO DISPONÍVEL (%)	FÓSFORO TOTAL (%)	GORDURA (%)	LISINA TOTAL (%)	MET. +CISTINA TOTAL (%)	METIONINA TOTAL (%)	PROTEÍNA BRUTA (%)
<b>ÓLEO DE PEIXE 12% (%)</b>	2,24	3,93	2,19	1,14	1,59	12	2,54	1,69	1,28	50
<b>MISTURA VEG 12 % (%)</b>	2,24	3,93	2,19	1,14	1,59	12	2,54	1,69	1,28	50



### **3.4. Amostragem**

#### **3.4.1. Amostragem para expressão génica**

Após 60 dias de ensaio (no dia 10 de outubro de 2013), 6 peixes de cada tratamento (2 peixes por tanque/réplica) foram previamente anestesiados, em gelo, e de seguida sujeitos a eutanásia por decapitação, tendo sido amostrados os seguintes órgãos: fígado (porção final do lobo direito) e cérebro. Após a extração dos órgãos, os mesmos foram imediatamente colocados em tubos de eppendorf com 1000 µl de RNA later. As amostras ficaram “overnight” a 4° C e depois foram armazenadas a -80 °C.

#### **3.4.2. Amostragem para quantificação de monoaminas**

Após 90 dias de ensaio (no dia 15 de novembro de 2013), 8 peixes de cada tratamento (2 a 3 peixes por tanque/réplica) foram anestesiados por imersão em benzocaína (100 mg/l). Foram secos numa toalha, medidos (comprimento total), pesados e sujeitos à eutanásia por decapitação, num processo com duração total de 3 minutos. Os cérebros inteiros foram rapidamente removidos e confirmou-se sempre se a hipófise era removida juntamente com o mesmo. Após esta etapa, os cérebros foram colocados num tubo de eppendorf de 1,5 mL e pesados. De seguida, os tubos de eppendorf contendo os cérebros foram transferidos para azoto líquido. Desde a decapitação até ao congelamento, o processo não demorou mais do que 1 minuto. Por fim, as amostras foram armazenadas a -80 °C até ao seu uso para posterior análise. A amostragem iniciou-se às 14 horas e teve uma duração de 6 horas.

### **3.5. Quantificação da expressão génica**

#### **3.5.1. Extração de RNA**

O ácido Ribonucleico (RNA) foi extraído a partir de dois tecidos, fígado e cérebro, recorrendo ao Kit “RNAspin Mini RNAIsolation Kit (GE Healthcare)”. Este procedimento inclui o passo com a DNase I que tem o objectivo de remover o DNA presente na amostra. De seguida foi avaliada a integridade do RNA extraído por electroforese em

agarose. A concentração de RNA foi obtida por espectofotometria utilizando um aparelho Nanodrop.

Posteriormente o RNA total foi transcrito para cDNA (DNA complementar) utilizando o Kit “iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR” da Bio-Rad, seguindo as instruções do fabricante.

### 3.5.2. Real-Time PCR

A expressão dos genes *fads2* e *elov15* foram analisadas através da técnica de RT-PCR.

A análise de PCR foi realizada com o sistema de detecção “System iCycler iQ RT-PCR (BioRad)”. O volume final da reação foi de 20 µL que incluiu o “SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes”, para marcação do segmento alvo, os primers “forward” e “reverse”, o cDNA e água. Todas as amostras foram realizadas em duplicado e incluído sempre um controle negativo a fim de confirmar a ausência de contaminações, tendo sido realizada sempre uma reta de calibração para monitorização da eficiência da reação nas diferentes placas.

As condições utilizadas durante a experiência estão descritas na tabela 8.

Adicionalmente foi realizada uma curva de fusão para confirmarmos a especificidade do ensaio e despistarmos a presença de “primer dimmers”.

O valor de “threshold cycle” (Ct), para cada amostra foi normalizado com o gene de referência “*β-actina*”, já que a sua expressão é constante em todas as amostras, independentemente do tratamento (Monroig *et al.*, 2013).

O método utilizado para determinar a expressão do gene em cada amostra foi o de Pfaffl, que assume que todos os genes alvos e genes de referência possuem a mesma eficiência de amplificação e baseia-se na seguinte equação (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}},$$

onde  $\Delta\Delta\text{Ct}$  significa a diferença entre o  $\Delta\text{Ct}$  (teste) e o  $\Delta\text{Ct}$  (calibrador). O Ct significa o “cycle threshold”, ou seja, o número de ciclos do PCR a partir do qual o amplicon é detetado.

**Tabela 8:** Primers e protocolo para o Real-Time PCR (F – Forward; R – Reverse).

Fonte: Monroig *et al.*, 2013.

Nome	Q-PCR Primer (5´-3´)	Annealing (Q-PCR) T (°C)	Protocolo
<b><i>fads2</i></b>	TGACTGGGTGACAATGCAGT TGGTGCTAACTTTGTGCCCT	60°C durante 30 s	95°C - 1 min, (95°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C - 1 min) × 35 ciclos 72° C - 5 min
<b><i>elov15</i></b>	CATCACACAGTTACAGCTGGTC GAATTGTGTGCACGGTTTCT	60°C durante 30 s	95°C - 1 min, (95°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C - 1 min) × 35 ciclos 72° C - 5 min
<b><i>β-actina</i></b>	CCATCGAGCACGGTATTGT CAGCTTCTCCTTGATGTCACG	60°C durante 30s	95°C - 1 min, (95°C – 30 s, 60°C – 30 s, 72°C - 1 min) × 35 ciclos 72° C - 5 min

### 3.6. Detecção de monoaminas e metabolitos por HPLC-DE

Foram utilizados 8 animais de cada tratamento dietético para a análise neuroquímica. O cérebro inteiro, incluindo a hipófise, foi desintegrado a 4 °C usando um ultrasonicador (Sonifier W-250, Branson Ultrasonics, Danbury, CT) em 200 µl de ácido perclórico 0,2M frio .

O homogenado foi centrifugado a 13,000 × g a 4 °C durante 15 minutos e o sobrenadante foi filtrado através de de um microfiltro de Nylon-66 com uma malha de 0,2 µm.

Alíquotas de 50 µl do filtrado foram utilizadas para a análise de deteção de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com deteção electroquímica (DE).

O sistema de HPLC utilizado é composto por um auto-injetor LC234, uma bomba de distribuição LC307, um eletrodetetor LC142, um sistema controlador de dados do HPLC 712 versão 1.30 software de gestão (tudo da “Gilson Medical”, Middleton, WI).

A fase móvel consistiu num buffer monobásico de fosfato de potássio a 70 mM (pH = 3 ajustado por adição de ácido fosfórico), ácido 1-heptanosulfónico a 1 mM, EDTA de sódio 107,5 µM e metanol a 10% (v/v). O fluxo foi mantido a 0,8 ml/min. A separação

cromatográfica foi conseguida utilizando uma coluna de fase reversa supelcosil LC (7,5 cm x 4,6 cm, 3 µm).

A detecção foi efetuada com um detetor electro-químico equipado com um eléctrodo de trabalho de carbono fixado nos +0,75V e a quantificação foi realizada com um padrão externo. Os resultados foram expressos por ng/mg de peso fresco do cérebro.

### **3.7. Análise estatística**

A análise estatística, foi levada a cabo recorrendo ao programa SPSS Statistics 21. O teste Levene's foi adotado para testarmos a homogeneidade de variância. A homogeneidade de variância para os dados da quantificação da expressão génica foi conseguida após transformação dos mesmos com a função "Log10". Uma vez que se verificou a homogeneidade de variância, partiu-se para uma "two-way ANOVA", a fim de verificarmos interações entre os fatores: fonte de óleo (animal vs vegetal) e selénio para cada uma das variáveis. Posteriormente a comparação entre pares foi feita pelo teste post hoc LSD (ou teste de fisher). As diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Expressão génica

Foi testado o efeito que cada uma de quatro dietas isoproteicas e isolipídicas (50% de proteína e 12% de lípidos), formuladas com 12% de óleo de peixe ou 12% de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) e na presença (1mg/kg) ou ausência de selénio, exerce sobre a expressão relativa dos genes *fads2* e *elov15* no fígado e cérebro de juvenis de corvina.

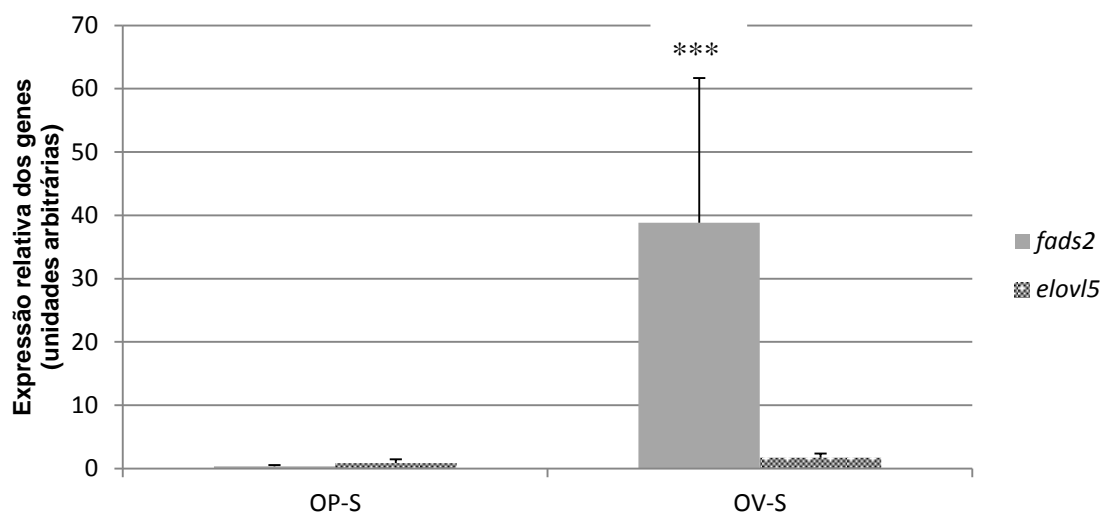
Neste trabalho, a expressão relativa dos genes em estudo foi normalizada com gene de referência *β-actina*, uma vez que este não altera a sua expressão em diferentes condições ambientais. Além disso os níveis de transcrição foram standardizados com os níveis de transcrição do grupo alimentado com a dieta OP-S (óleo de peixe com selénio). A análise de variância (ANOVA) a 2 fatores permitiu verificar interações entre os fatores fonte de óleo (animal vs vegetal) e selénio para a variável *fads2* do fígado ( $P < 0,05$ ), indicando que a expressão da *fads2* é influenciada não só pela fonte lipídica, mas também pela interação entre a fonte lipídica e a presença ou ausência de selénio na dieta (Tabela 9).

**Tabela 9:** Impacto dos fatores: fonte lipídica (animal vs vegetal) e selénio, na expressão da *fads2* e *elov15* do fígado e cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

	Fígado		Cérebro	
	<i>fads2</i>	<i>elov15</i>	<i>fads2</i>	<i>elov15</i>
	ANOVA ( <i>P</i> value)			
Fonte lipídica (L)	<0.0001	0.791	0.889	0.270
Selénio (S)	0.0875	0.382	0.821	0.235
L x S	0.0108	0.253	0.474	0.993

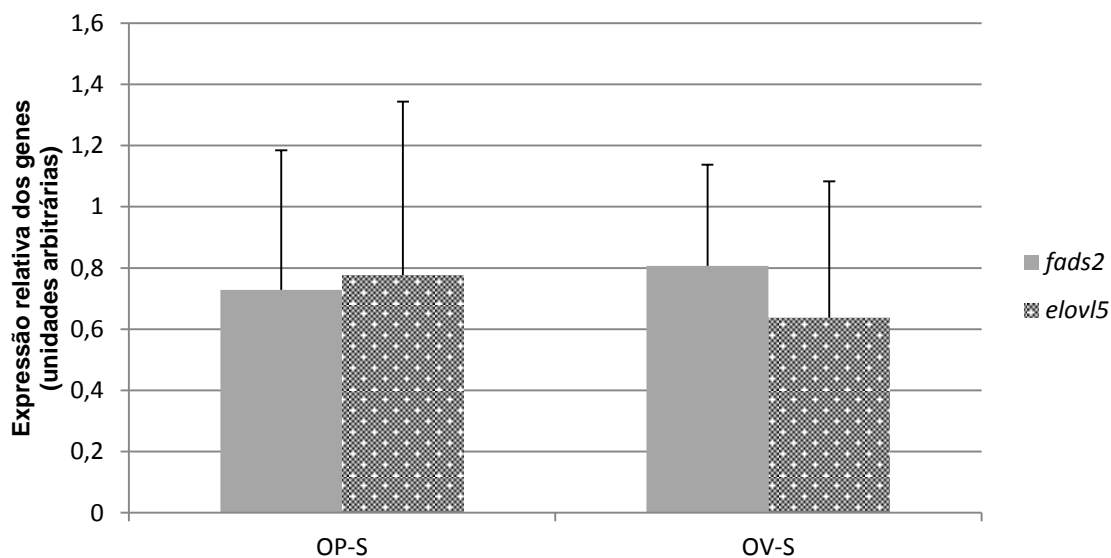
Por outro lado, a comparação entre pares através do teste LSD (ou teste de fisher), permitiu-nos analisar as diferenças entre os tratamentos, para cada uma das variáveis.

No gráfico 1 apresenta-se o efeito que a substituição total de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais, ambas suplementadas com 1mg/kg de selénio, tem sobre a expressão dos genes *fads2* e *elov15* no fígado da corvina. Segundo o mesmo, a substituição de OP-S por OV-S conduziu ao aumento significativo da expressão do gene *fads2*, correspondente a 114 vezes ( $P < 0,001$ ). Também os níveis de transcrição do gene *elov15* sofreram um aumento de cerca de 2 vezes, sem que, contudo, esse aumento fosse estatisticamente significativo.



**Gráfico 1:** Efeito da substituição total de 12% de óleo de peixe (OP) por 12% de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)], nas dietas suplementadas com 1 mg/kg de selênio (S), sobre a expressão dos genes *fads2* e *elov15* no fígado da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras representam a média de 6 amostras por tratamento  $\pm$  SD. As diferenças significativas entre os tratamentos estão marcadas com \*\*\* ( $P < 0,001$ , ANOVA).

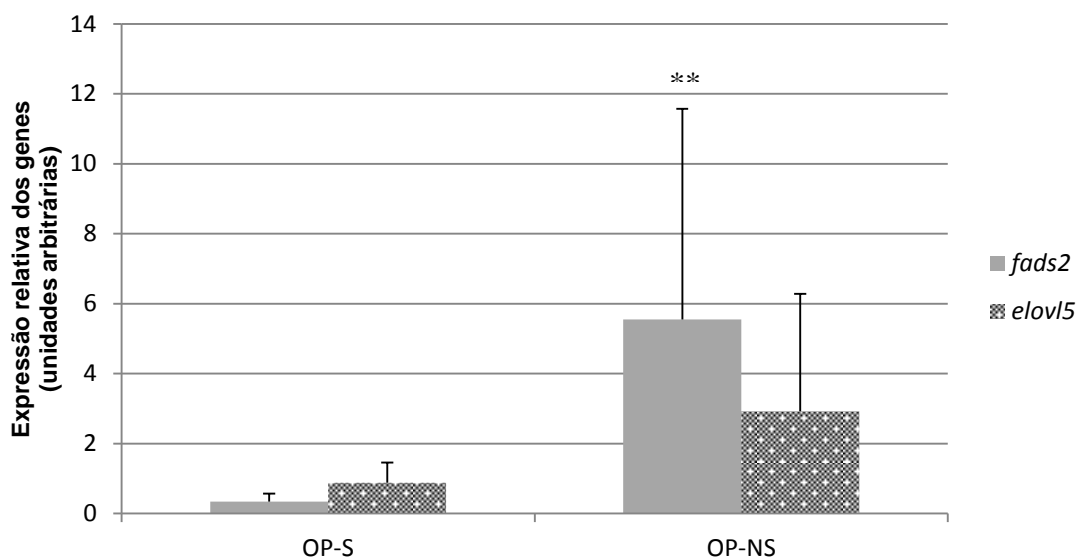
Quando a mesma análise foi realizada no cérebro, não se observaram diferenças significativas na transcrição de ambos os genes. Contudo, no grupo OV-S, quando comparado com o grupo OP-S, ocorreu um ligeiro aumento, correspondente a 1 vez, da expressão do gene *fads2*, ao passo que o nível de transcrição do gene *elov15* revelou um decréscimo de 1 vez (Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Efeito da substituição total de 12% de óleo de peixe (OP) por 12% de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)], nas dietas suplementadas com 1 mg/kg de selênio (S), sobre a expressão dos

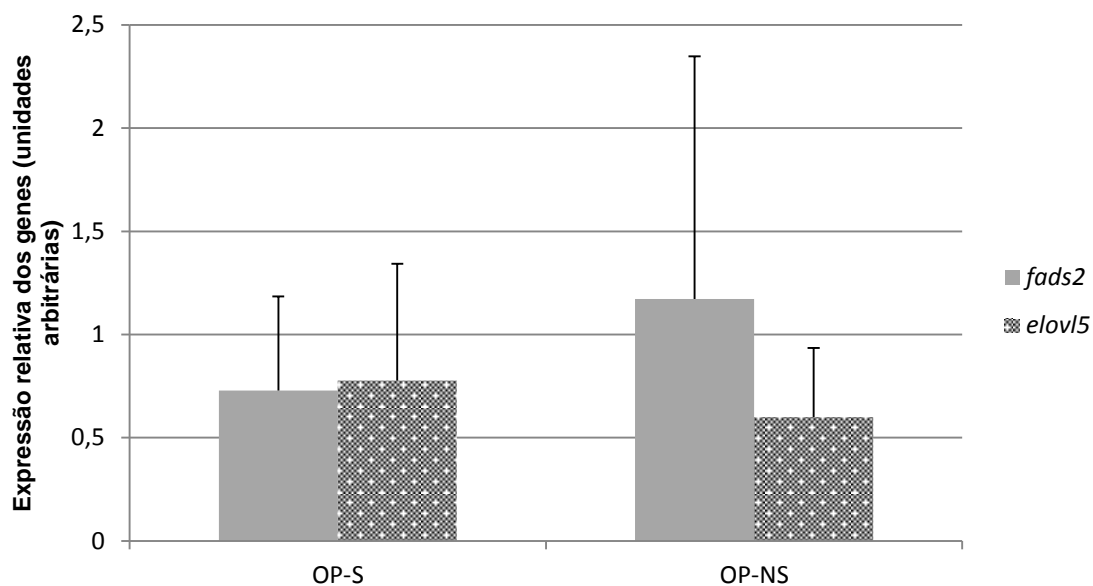
genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras representam a média de 6 amostras por tratamento  $\pm$  SD.

O efeito que a suplementação das dietas de 12% de óleo de peixe (OP) com 1 mg/kg de selênio tem sobre a expressão dos genes *fads2* e *elov15* no fígado da corvina está representado no gráfico 3. Assim, constatou-se uma diminuição de cerca de 16 vezes ( $P < 0,01$ ) dos níveis de expressão do gene *fads2* nas dietas OP-S em relação às dietas OP-NS, enquanto que na mesma condição o gene *elov15* revelou uma diminuição de expressão de cerca de 3 vezes ( $P > 0,05$ ) (Gráfico 3).



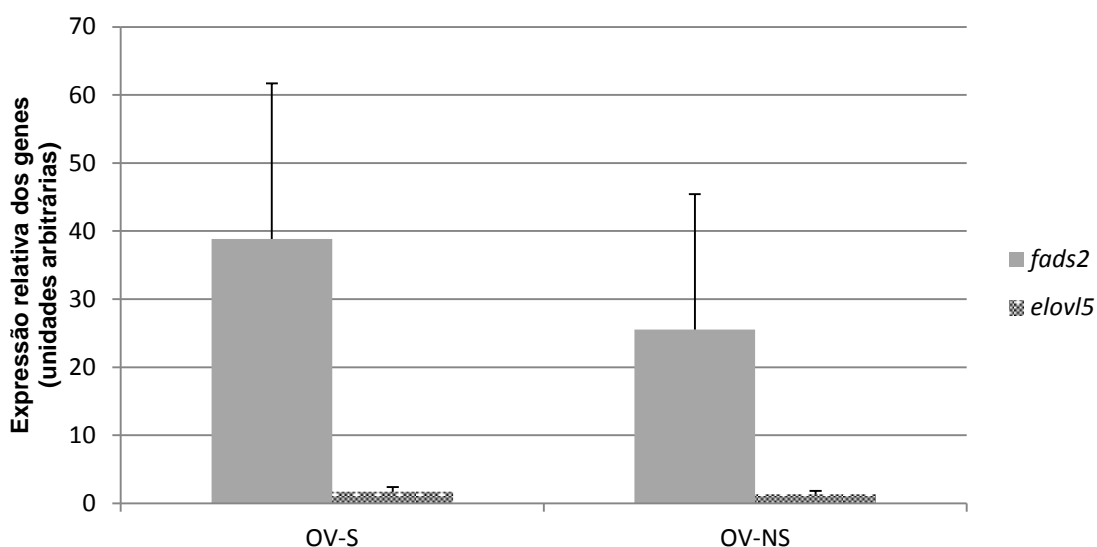
**Gráfico 3:** Efeito da suplementação das dietas de 12% de óleo de peixe (OP) com 1 mg/kg selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do fígado da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras representam a média de 6 amostras por tratamento  $\pm$  SD. As diferenças significativas entre os tratamentos estão marcadas com \*\* ( $P < 0,01$ , ANOVA).

A suplementação das dietas OP com 1 mg/kg de selênio parece não exercer efeitos significativos nos níveis de transcrição dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina. No entanto nas dietas com selênio observa-se uma tendência para a diminuição da transcrição do gene *fads2*, cuja expressão foi cerca de 2 vezes inferior nas dietas OP-S em relação ao grupo OP-NS. Este efeito não foi visível no genes *elov15*, pois a sua expressão aumentou cerca de 1 vez no grupo OP-S em comparação com o grupo OP-NS (Gráfico 4).



**Gráfico 4:** Efeito da suplementação das dietas de 12% de óleo de peixe (OP) com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras representam a média de 6 amostras por tratamento  $\pm$  SD.

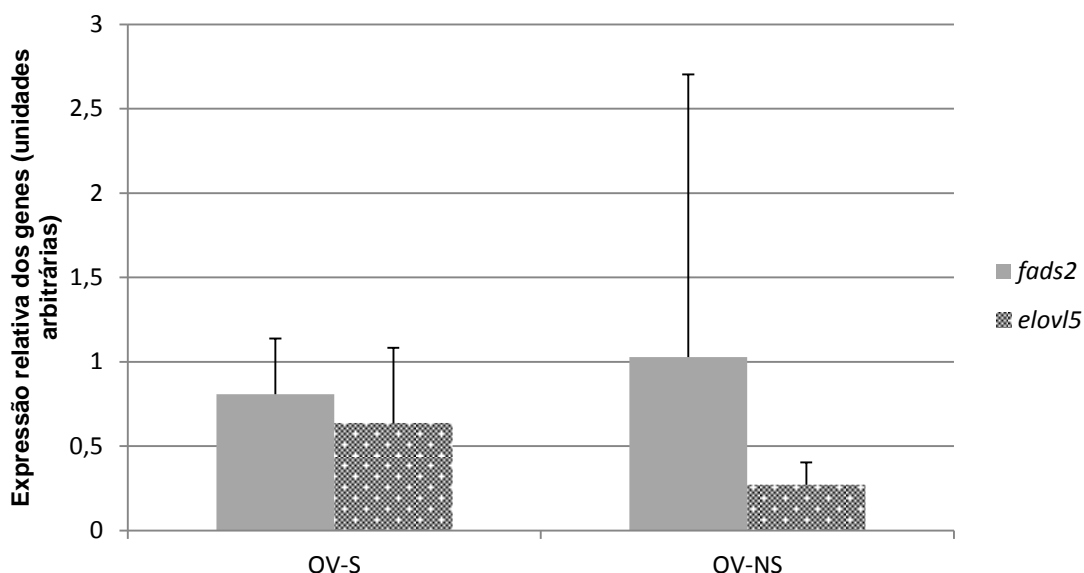
O efeito da suplementação das dietas OV com 1 mg/kg de selênio não influenciou de forma significativa nenhum dos genes. Porém graficamente, observa-se uma tendência para o aumento dos níveis de expressão tanto da *fads2* como da *elov15* hepáticas, cuja expressão foi cerca de 2 vezes e 1 vez maior nas dietas OV-S do que nas dietas OV-NS, respectivamente (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Efeito da suplementação das dietas de 12% de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)] com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do fígado da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras representam a média de 6 amostras por tratamento  $\pm$  SD.



A suplementação das dietas OV com 1 mg/kg de selênio não conduziu a diferenças significativas na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro. Porém, graficamente é notório que no grupo OV-S ocorreu uma diminuição do nível de expressão da *fads2* e um aumento do nível de expressão da *elov15*, de cerca de 1 vez e 2 vezes, respectivamente, em comparação com o grupo OV-NS (Gráfico 6).



**Gráfico 6:** Efeito da suplementação das dietas de 12% de misturas de óleos vegetais [OV (colza, linhaça e soja)] com 1 mg/kg de selênio (S) na expressão dos genes *fads2* e *elov15* do cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras representam a média de 6 amostras por tratamento  $\pm$  SD.

## 4.2. Quantificação das monoaminas

A fim de concretizar o segundo objetivo do nosso trabalho, foi testado o efeito que cada uma de quatro dietas isoproteicas e isolipídicas (50% de proteína e 12% de lípidos), formuladas com 12% de óleo de peixe ou 12% de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) e na presença (1mg/kg) ou ausência de selênio, exerce sobre a concentração de algumas monoaminas e os seus metabolitos a nível do sistema nervoso central.

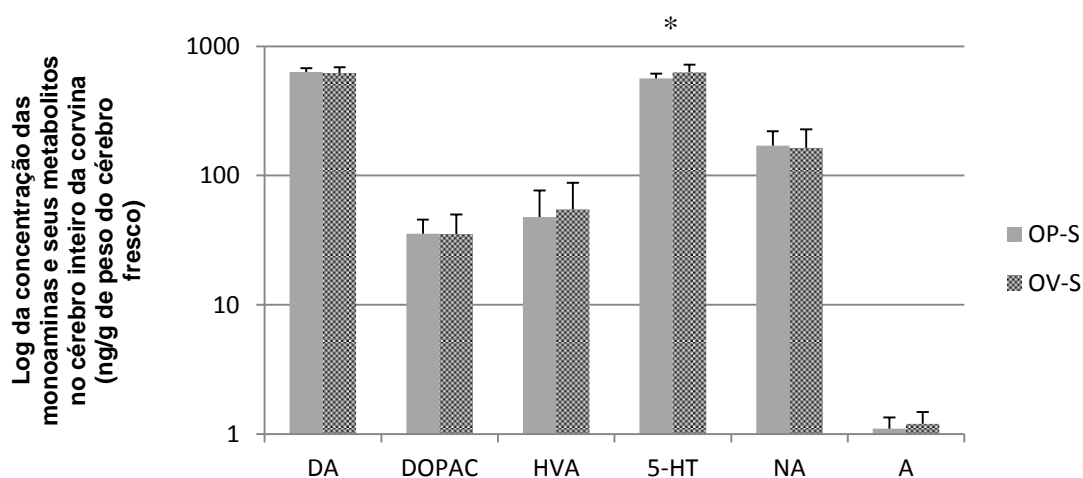
A análise de variância (ANOVA) a 2 fatores não detetou interação entre os fatores fonte lipídica (L) e selênio (S), que se revelaram independentes entre si (Tabela 10).

**Tabela 10:** Impacto dos fatores: fonte lipídica (animal vs vegetal) e selênio (1 mg/kg), na concentração das monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)], no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*).

	DA	DOPAC	HVA	5-HT	NA	A
	ANOVA (P value)					
Fonte lipídica (L)	0,576	0,396	0,893	0,012	0,997	0,354
Selênio (S)	0,275	0,031	0,511	0,749	0,333	0,181
L*S	0,285	0,386	0,708	0,853	0,757	0,737

No entanto, esse mesmo teste indicou que a fonte lipídica influenciou a concentração de 5-HT no cérebro da corvina (Tabela 10).

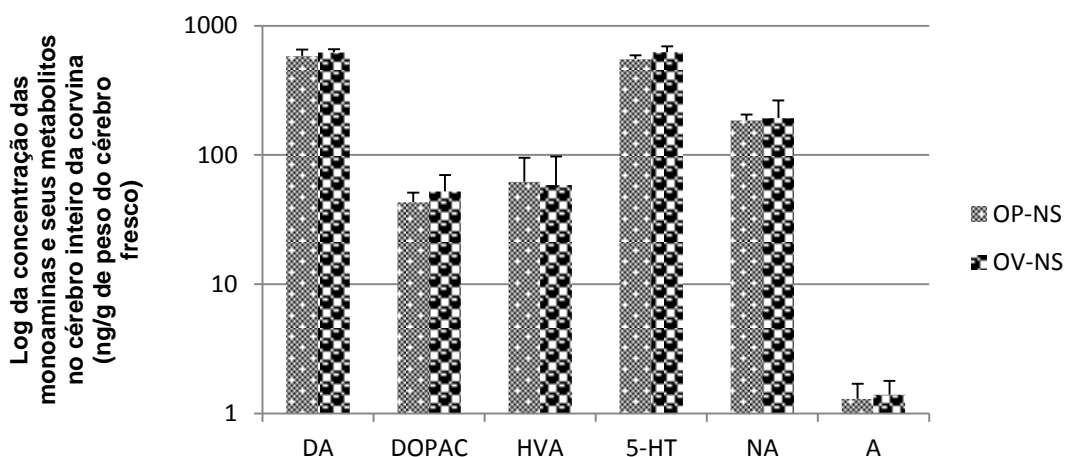
Segundo o teste post hoc LSD a substituição de OP-S por OV-S conduziu a um aumento da concentração de 5-HT no cérebro das corvinas ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, esta condição não influenciou de forma significativa a concentração de DA, DOPAC, HVA, NA e A no cérebro desses mesmos peixes (Gráfico 7).



**Gráfico 7:** Efeito da substituição total de 12% de óleo de peixe com 1 mg/kg de selênio (OP-S) por 12% de misturas de óleos vegetais com 1 mg/kg de selênio [OV-S (colza, linhaça e soja)] sobre a concentração de monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)] no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras indicam o logaritmo de base 10 (log) da média de 8 amostras por tratamento  $\pm$  SD. As diferenças significativas entre os tratamentos estão marcadas com \* ( $P < 0,05$ , ANOVA).

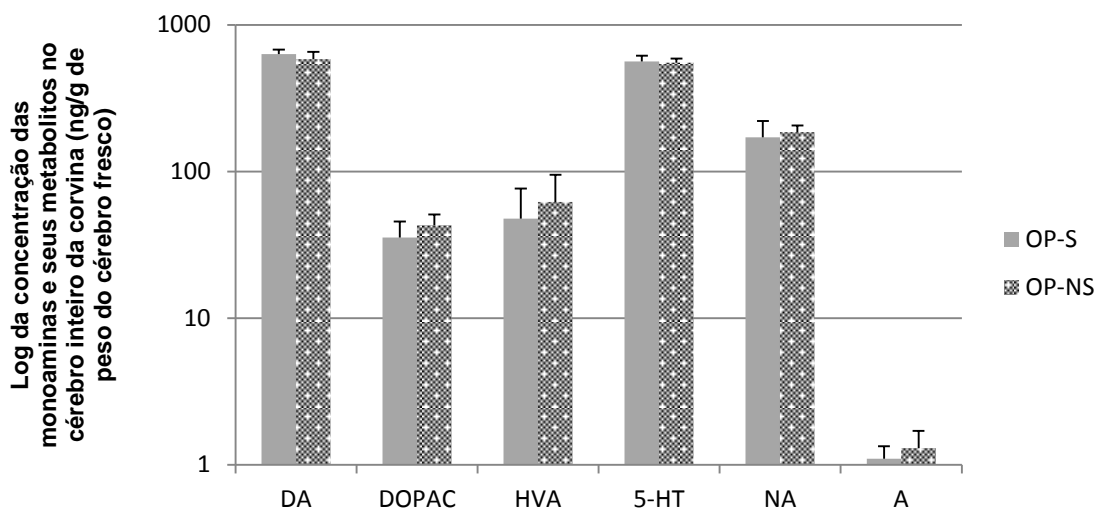
A substituição de OP-NS por OV-NS não conduziu a diferenças significativas na concentração das monoaminas e dos seus metabolitos, entre os tratamentos (Gráfico 8). Contudo, através da observação do gráfico 8 é possível detetar um aumento da concentração de DA, NA, A e em especial de 5-HT no cérebro dos peixes alimentados

com as dietas OV-NS em comparação com o tratamento OP-NS. Por outro lado, os nossos dados também apontam para que nas dietas OV-NS o cérebro dos peixes possa apresentar um conteúdo ligeiramente aumentado da concentração de DOPAC. (Gráfico 8).



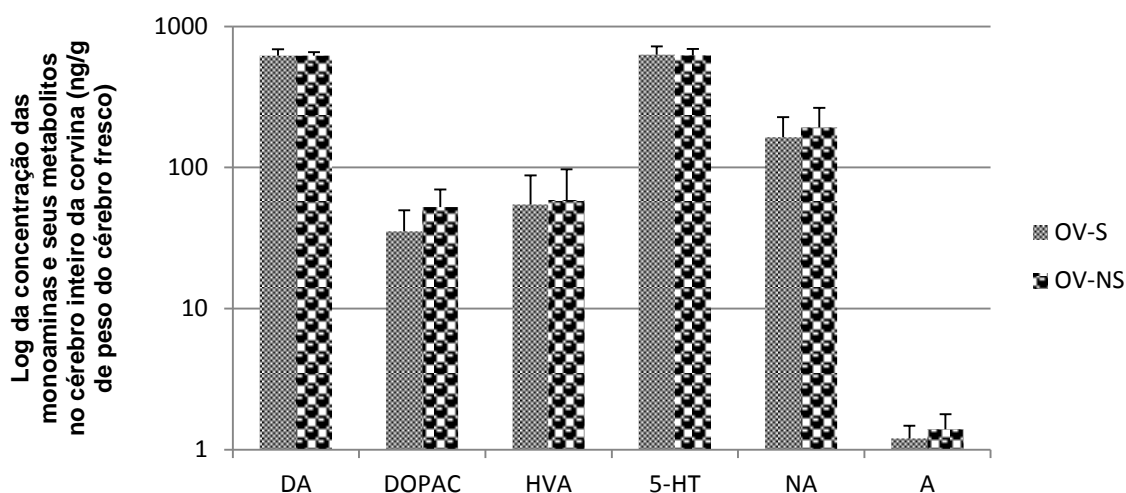
**Gráfico 8:** Efeito das dietas de 12% de óleo de peixe sem selênio (OP-NS) vs dietas de 12% de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) sem selênio (OV-NS) na concentração de monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)] no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras indicam o logaritmo de base 10 (log) da média de 8 amostras por tratamento  $\pm$  SD.

A suplementação das dietas OP com S não influenciou de forma significativa a concentração de monoaminas nem dos seus metabolitos no cérebro das corvinas. Porém, ainda que não de uma forma significativa, no grupo OP-S é possível observar um ligeiro aumento da concentração das monoaminas DA e 5-HT, mas não da NA e A. Além disso, no que se refere aos metabolitos DOPAC e HVA constatou-se a tendência inversa na medida em que, no grupo OP-S, observou-se uma ligeira diminuição das suas concentrações (Gráfico 9).



**Gráfico 9:** Efeito das dietas de 12% de óleo de peixe com 1 mg/kg de selênio (OP-S) vs dietas de 12% de óleo de peixe sem selênio (OP-NS) na concentração de monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxiifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)] no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras indicam o logaritmo de base 10 (log) da média de 8 amostras por tratamento  $\pm$  SD.

Segundo os nossos resultados, as dietas OV-S também não exerceu qualquer efeito significativo sobre a concentração das monoaminas e seus metabolitos (Gráfico 10). Graficamente observamos um aumento pouco acentuado da concentração de DOPAC e NA (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Efeito da suplementação das dietas de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) com 1 mg/kg de selênio na concentração de monoaminas [dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e adrenalina (A)] e seus metabolitos [(ácido 3,4-Dihidroxiifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA)] no cérebro da corvina (*Argyrosomus regius*). As barras indicam o logaritmo de base 10 (log) da média de 8 amostras por tratamento  $\pm$  SD.

## 5. DISCUSSÃO

A estagnação das capturas de pescado tem promovido o desenvolvimento da atividade da aquacultura (FAO, 2012). Porém, esta continua extremamente dependente da pesca devido à utilização de proteína e óleo de peixe na formulação das dietas dos animais de produção. Neste sentido, a continuação desta prática levará à insustentabilidade desta atividade, sendo por isso necessário encontrarmos alternativas às fontes de óleo de peixe. Uma das alternativas frequentemente apontadas são os óleos vegetais (Estévez *et al.*, 2011), muito embora a constituição nutricional destas duas fontes de óleo seja diferente. O óleo de peixe é rico em HUFA (como o DHA, EPA e ARA), enquanto que os óleos vegetais são ricos em PUFA C<sub>18</sub>, como o ALA e o LA (Tocher, 2003; Leaver *et al.*, 2008a). Assim, quando nas rações os óleos de peixe são substituídos por óleos vegetais, os animais terão de sintetizar os HUFA endogenamente. Para tal, algumas enzimas desempenham um papel fundamental, nomeadamente a  $\Delta 6$  dessaturase e a elongase 5 (Cook & McMaster, 2004; Leaver *et al.*, 2008a).

A expressão dos genes responsáveis pela síntese destas enzimas, bem como a sua atividade enzimática são reguladas nutricionalmente. De facto, na truta e no salmão, a substituição de óleo de peixe por óleo de linhaça conduziu a um aumento da expressão do gene que codifica a enzima  $\Delta 6$  dessaturase (Seiliez *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005a, 2005b). Em algumas espécies marinhas essa relação também foi evidente (Seiliez *et al.*, 2003; Vagner *et al.*, 2007a).

A substituição de óleo de peixe por óleo vegetal também regula a expressão do gene que codifica a enzima elongase 5 (Geay *et al.*, 2011), sendo que este efeito foi já descrito em espécies como o salmão (Zheng *et al.*, 2004b, 2005a, 2005b; Jordal *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2009).

Muitos trabalhos têm revelado um relação entre o aumento da expressão do gene *fads2* e o aumento da atividade da enzima  $\Delta 6$  dessaturase quando os animais são alimentados com dietas ricas em ALA e LA (Zheng *et al.*, 2004b, 2005b). Porém, esta relação não é igual em todas as espécies pois o aumento da expressão génica nem sempre se repercute num aumento da atividade enzimática, como se verificou no robalo (Mourente *et al.*, 2005), bem como noutras espécies marinhas em que a taxa de biossíntese de HUFA é fisiologicamente irrelevante (Leaver *et al.*, 2008a).

Por outro lado, a corvina é uma espécie marinha que apresenta um comportamento diadrómico (González-Quirós *et al.*, 2011). Esta evidência poderá influenciar a sua capacidade de biossíntese de HUFA (Monroig *et al.*, 2013), tal como acontece com o salmão (Zheng *et al.*, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b). De facto, o salmão, apesar de passar a maior parte do seu ciclo de vida no mar, exhibe uma capacidade de biossíntese

de HUFA semelhante à dos peixes tipicamente de água doce (Zheng *et al.*, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b).

Atualmente os dados obtidos sobre a corvina indicam que esta possui duas enzimas, codificadas pelos genes *fads2* e *elovl5*, as quais estão envolvidas no processo de biossíntese de HUFA e são responsáveis pelos processos de dessaturação e alongação, respetivamente (Monroig *et al.*, 2013). Através da análise da expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da *fads2* e *elovl5* da corvina foi possível caracterizar funcionalmente as duas enzimas. Concluiu-se que a dessaturase apresenta atividade  $\Delta 6/\Delta 8$ , ou seja, é capaz de converter os PUFA C<sub>18</sub> em 20:4 n-3 e 20:3 n-6 (Monroig *et al.*, 2013). Porém, para formar o EPA e o DHA seria ainda necessária a atuação da enzima  $\Delta 5$  dessaturase. A perda de função desta enzima tem sido muitas vezes associada à menor capacidade de biossíntese de HUFA por parte dos peixes marinhos (Tocher, 2003). Não obstante, e ao contrário da dessaturação, toda a atividade de alongação necessária para a produção de EPA e ARA a partir de PUFA C<sub>18</sub> foi encontrada na corvina. De facto, a *Elov15* revelou-se capaz de atuar sobre os substratos C<sub>18</sub> e C<sub>20</sub> e, menos eficientemente, sobre os substratos C<sub>22</sub> (Monroig *et al.*, 2013).

Estas observações indicam que, aparentemente, embora a corvina seja um peixe diadrómico como o salmão (Monfort, 2010), apresenta uma capacidade de biossíntese de HUFA semelhante à dos peixes tipicamente marinhos (Monroig *et al.*, 2013).

Com o objetivo de contribuir para a elucidação da capacidade desta espécie em biossintetizar os HUFA a partir de PUFA C<sub>18</sub> surge o nosso trabalho, no qual estudámos o efeito que a substituição total de óleo de peixe na ração por misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja) tem sobre a expressão da *fads2* e *elovl5* no fígado e no cérebro da corvina. Os nossos resultados indicam um efeito diferenciado entre os tecidos e os genes.

Desta forma, segundo os nossos resultados a substituição de OP-S por OVS conduziu ao aumento significativo da expressão do gene *fads2* hepático, cuja expressão aumentou cerca de 114 vezes na dieta OV-S em relação ao grupo OP-S. Os nossos resultados estão de acordo com as conclusões de outros trabalhos, quer em espécies de água doce/diadrómicas (Seilliez *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005a, 2005b; Leaver *et al.*, 2008b) quer em espécies tipicamente marinhas, como a dourada (*Sparus aurata*) (Seilliez *et al.*, 2003). Importa salientar que no salmão, a substituição de óleo de peixe por óleo vegetal nas dietas levou a um aumento da expressão relativa do gene *fads2* de 1 para 2,2 (Zheng *et al.*, 2005a) e, neste trabalho, o aumento foi de 114 vezes, nas dietas com selénio e de 5 vezes nas dietas sem selénio. Esta discrepância poderá ter origem em dois fatores. Um destes fatores estará relacionado com o facto da  $\Delta 6$  dessaturase da corvina ser bifuncional (Monroig *et al.*, 2013) enquanto que a do salmão é monofuncional,

apresentando estes genes isolados para a atividade  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$  (Hastings *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005a). Por outro lado, a corvina, mesmo sendo um peixe diadrômico, apresenta características típicas de peixes marinhos, pelo que a atividade enzimática da enzima  $\Delta 6$  dessaturase é baixa (Monroig *et al.*, 2013). Por conseguinte, este facto poderá ter levado a uma maior estimulação génica, de forma a compensar a baixa eficiência da enzima. Esta amplitude de expressão não foi evidente no robalo, que também revelou aumento da expressão do gene *fads2* (de cerca de 4 vezes), sem que tivesse havido o aumento da atividade enzimática (Geay *et al.*, 2010), nem no peixe zebra (cerca de 2 vezes), que é um peixe de água doce e que também apresenta bifuncionalidade da enzima, bem como alta eficiência enzimática (Jaya-Ram *et al.*, 2008). Apesar disto, é notória uma maior diferença de expressão entre as dietas que contêm selénio, sendo que as dietas sem selénio apresentam uma menor discrepância de expressão quando a substituição de óleos é feita. Esta observação poderá indicar que, na corvina, o selénio poderá desempenhar um papel importante na indução da expressão deste gene.

Relativamente à influência que a substituição total de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais (colza, soja e linhaça) teve sobre a expressão do gene *fads2* no cérebro, constatámos que esta condição não conduziu a diferenças significativas entre os tratamentos. Estes resultados são consistentes com o trabalho de Zheng *et al.* (2005a) realizado com salmão, cuja substituição de óleo de peixe por óleo vegetal, também não alterou significativamente o nível de expressão relativa do gene *fads2* no cérebro, embora no fígado sim. O facto da substituição de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais ter tido um efeito menos evidente no cérebro poderá estar relacionado com o facto da estimulação génica no fígado ter sido bastante pronunciada. Nesta medida, se esta expressão se repercutiu numa maior atividade enzimática, então os HUFAs seriam metabolizados no fígado e depois distribuídos pelos principais tecidos, como é o caso do cérebro. Esta hipótese relaciona-se também com a premissa de que o padrão típico de distribuição de expressão dos genes nos tecidos é distinto entre os grupos de peixes. Enquanto que nas espécies marinhas o gene *fads2* é intensamente expresso no cérebro (Tocher *et al.*, 2006; González-Rovira *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009), nas espécies de água doce (Seilliez *et al.*, 2001) e no salmão (Zheng *et al.*, 2005a) a expressão é maior nos órgãos de metabolização, como o fígado e o intestino. No que toca à corvina, esta apresenta um padrão típico dos peixes marinhos, pois revela maior nível de expressão no cérebro, seguido pelo fígado, cecos pilóricos e estômago (Monroig *et al.*, 2013). Neste trabalho, este padrão também foi evidente, dado que os animais das dietas OP-S também revelaram níveis de expressão deste gene mais elevados no cérebro comparativamente ao fígado. Esta distinta distribuição da expressão dos genes nos tecidos deve-se ao facto de os peixes marinhos não necessitarem de metabolizar os

HUFA, pois adquirem-nos na dieta. Por conseguinte, o nível de expressão deste gene é mais elevado no cérebro, por forma a assegurar a quantidade de DHA necessária, independentemente das flutuações de EPA e de DHA na dieta. Por outro lado, os peixes de água doce não obtêm esses ácidos gordos na dieta e têm de metabolizá-los intensamente no fígado (Cho, Nakamura & Clarke, 1999; Sargent *et al.*, 2002, citado por Zheng *et al.*, 2009). No presente trabalho e numa situação de privação de HUFA na dieta, a corvina revelou uma alteração no padrão de distribuição da expressão da *fads2*, ocorrendo um aumento da sua expressão no fígado mas sem que quaisquer alterações acontecessem no cérebro.

No que toca ao gene *elov15* do fígado, os nossos resultados indicam que este não sofreu alterações significativas na sua expressão quando comparamos os peixe submetidos às duas condições alimentares experimentais. Os nossos resultados não estão de acordo com os resultados obtidos para o salmão (Zheng *et al.*, 2004b, 2005a, 2005b; Jordal *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2008; Morais *et al.*, 2009) nem para outras espécies tipicamente de água doce como são o caso do *Xiphophorus helleri* (Ling *et al.*, 2006) e do *Danio rerio* (Jaya-Ram *et al.*, 2008). Segundo Monroig *et al.* (2013) a atividade enzimática da Elov15 é elevada e assemelha-se à de outras espécies de peixes (Agaba *et al.*, 2004, 2005; Morais *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009). Pelo contrário, a taxa de conversão da Fads2 da corvina foi baixa quando comparada com a  $\Delta 6$  Fads\_c do *Salmo salar* (Monroig, Li & Tocher, 2011). Assim, a sua baixa atividade poderá ter contrastado com as elevadas atividades da Elov15. Os produtos metabolizados pela Fads2 seriam rapidamente utilizados pela Elov15, sem que, ocorresse estimulação génica, pois os substratos não teriam tempo para se acumularem. Além disso, mesmo em peixes como o salmão cuja atividade enzimática é elevada, a transcrição génica das dessaturases é cerca de 8 vezes mais elevada do que das elongases (Zheng *et al.*, 2004b).

Nos mamíferos, os mecanismos pelos quais os ácidos gordos modelam a expressão génica estão relacionados com a intervenção de “sensores” endógenos, nomeadamente os recetores nucleares, como é o caso da família dos PPAR (Jump, Tripathy & Depner, 2013). Mais especificamente, o PPAR $\alpha$  faz parte de um mecanismo “feed-forward”, do qual resulta um incremento da oxidação de ácidos gordos que entram na célula (Georgiadi & Kersten, 2012). Como tal, o EPA, assim como o DHA, funcionam como os seus principais ligandos, indizindo um aumento significativo da transcrição dos genes-alvo do PPAR $\alpha$ , ao passo que o ácido oleico (18:1 n-9) produz um efeito menos significativo na indução da transcrição desses mesmos genes (Lemberger, Desvergne & Wahli, 1996; Jump, Tripathy & Depner, 2013). Nos peixes, estes mecanismos são menos conhecidos, mas tudo indica que os princípios são semelhantes aos descritos nos mamíferos. Com efeito, o estudo levado a cabo por Kennedy *et al.* (2006) constatou que,



no salmão, o incremento de óleo de peixe na dieta diminuiu a expressão do gene da  $\Delta 6$  dessaturase hepática, bem como do gene do PPAR $\alpha$  (Kennedy *et al.*, 2006). No nosso trabalho as dietas com óleo de peixe, ricas em EPA e DHA, poderão ter funcionado como estimuladoras da expressão de genes ligados à oxidação lipídica.

Por outro lado, existe uma família de fatores de transcrição à qual pertencem as SREBP e que possuem a capacidade de se ligarem ao elemento regulador de esterol e, a partir daí, regularem a transcrição de vários genes envolvidos na síntese de colesterol e ácidos gordos (Xu *et al.*, 1999). Por sua vez o DHA, mas não outros PUFA, regula a abundância da nSREBP-1 (proteína de ligação ao elemento regulador de esterol nuclear) por meio de mecanismos de fosforilação/desfosforilação e por degradação proteossomal (Jump, Tripathy & Depner, 2013). Desta forma, o DHA consegue inibir a transcrição de genes lipogénicos (Xu *et al.*, 1999; Clarke, 2001), já que poderá prejudicar a libertação proteolítica do SREBP-1 e/ou suprimir a expressão dos genes da SREBP-1 (Clarke, 2001). De facto, um ensaio com robalos, comprovou que as dietas com óleos vegetais levaram ao aumento dos níveis de mRNA do gene *fads2*, bem como da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1) (Geay *et al.*, 2010). Assim, a deficiência em ácidos gordos essenciais induz a transcrição do gene *Fads2* (Cho, Nakamura & Clarke, 1999), tal como se verificou neste trabalho.

Neste trabalho também avaliamos a influência da suplementação de selénio nas dietas de óleo de peixe bem como nas dietas de misturas de óleos vegetais. Os nossos resultados indicam que a suplementação deste micronutriente na dieta tem efeitos diferentes, dependendo do tipo de óleo presente na dieta. Assim, a suplementação de selénio na ração com óleo de peixe traduziu-se numa diminuição significativa da expressão do gene *fads2*, no fígado da corvina comparativamente com o tratamento de óleo de peixe sem suplementação com selénio. Porém, nas dietas com misturas de óleos vegetais foi notório o comportamento inverso, ou seja, o selénio parece ter favorecido, embora não significativamente, a expressão deste gene no fígado.

O mecanismo pelo qual o selénio interfere na modulação génica não é totalmente conhecido (Okuno *et al.*, 2012). A ingestão de selénio tem sido associada à alteração da expressão de genes relacionados com a progressão do ciclo celular e sinalização celular em células cancerígenas. Esta relação poderá dever-se à influência do selénio nos receptores de estrogénio. A suplementação deste micronutriente na dieta diminuiu a expressão do recetor de estrogénio  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), bem como a ligação do estradiol ao recetor de estrogénio nas células cancerígenas (Lee *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2005). Para além disso, o selénio também interfere directamente com os do RE $\alpha$  (Shah *et al.*, 2005). Recentemente, Okuno *et al.* (2012) formularam a hipótese de que o “methylseleninic acid” (MAS), um metabolito do selénio, poderá interferir com o sistema tioredoxina

(Trx)/tioredoxina redutase (TrxR). Este sistema é a chave da regulação do estado redox das células e a sua ativação promove a diminuição da concentração de ROS nas células. Por conseguinte, a diminuição de ROS modela a expressão do RE $\alpha$ , culminando na diminuição da proteína RE $\alpha$  das células. Desta forma os genes controlados pelo RE $\alpha$  são inibidos (Okuno *et al.*, 2012).

À semelhança dos RE $\alpha$  (Evans, 1998, citado por Okuno *et al.*, 2012) as SRBEP-1 também são fatores de transcrição (Xu *et al.*, 1999). Neste trabalho colocámos a hipótese do selénio poder interferir com as SREBP-1 da mesma forma que influencia os RE $\alpha$ . Neste sentido é de supor que na presença de óleos de peixe o selénio modela negativamente as SREBP-1, ao contrário do que acontecerá na presença de óleos vegetais. Esta hipótese baseia-se no facto de os lípidos também modelarem de forma diferenciada a atividade da GPx4. Em células endoteliais de mamíferos, a atividade desta enzima está reduzida na presença do DHA, aumentada na presença do ARA e não é afetada pelo ácido- $\alpha$ -linoleico conjugado (Sneddon *et al.*, 2003). Por outro lado, o número de ligações duplas potencia a peroxidação lipídica no fígado (Haggag, Elsanhoty & Ramadan, 2014). De facto, foi documentado que os ratos alimentados com dietas de óleo de peixe sofreram um aumento da peroxidação lipídica (D'Aquino *et al.*, 1991). Finalmente, níveis aumentados de peroxidação lipídica são acompanhados pelo decréscimo da atividade das enzimas envolvidas no mecanismo de defesa antioxidativa (Haggag, Elsanhoty & Ramadan, 2014).

Baseando-nos nestes resultados, a nossa hipótese é que nas dietas OP-S o selénio poderá ter protegido os ácidos gordos da peroxidação lipídica, e por isso o “turnover” fosfolipídico foi menos acentuado comparativamente às dietas OP-NS, onde a estimulação da biossíntese de HUFA teve de ser mais acentuada.

O stress oxidativo induzido pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS) tem sido associado com a expressão e níveis de proteína dos fatores de transcrição (Okuno *et al.*, 2012), e no presente trabalho foi observada uma redução das ROS em peixes alimentados com dietas de óleos vegetais suplementadas com 1mg/kg de selénio (dados não mostrados). Por isso, é plausível inferir que esta dieta promoveu a estimulação da expressão e níveis proteicos da SREBP-1 pela redução das ROS. Por conseguinte, uma vez que a SREBP-1 regula os genes envolvidos na biossíntese de HUFA, nomeadamente a *fads2* e a *elov15* (Jump, Tripathy & Depner, 2013), a suplementação de selénio modelou a expressão destes genes.

O segundo objetivo do nosso trabalho foi analisar o efeito que a substituição de 12% de óleo de peixe por 12% de misturas de óleos vegetais (colza, linhaça e soja), cada uma suplementada ou não com selénio, tem sobre a concentração de alguns

neurotransmissores no cérebro da corvina, tais como DA, 5-HT, NA e A e alguns dos metabolitos destes, como sejam DOPAC, HVA e 5-HIAA.

Este estudo é de extrema relevância na medida em que o sistema monoaminérgico é influenciado pela composição dos ácidos gordos da dieta. Com efeito, diversos trabalhos constataram um resultado negativo da administração de dietas pobres em ácidos gordos essenciais sobre o sistema monoaminérgico de mamíferos (Chalon *et al.*, 1998, 2001; Zimmer *et al.*, 1999, 2000a; Varghese *et al.*, 2001; Kodas *et al.*, 2002a, 2002b, 2004; Lesa *et al.*, 2003; Bois *et al.*, 2006; Marza *et al.*, 2008; Vancassel *et al.*, 2008). Pouco se sabe sobre os efeitos que aquelas substituições terão sobre os sistema neuronal dos peixes, mas verificou-se que a suplementação das dietas com selénio poderá ter um importante contributo na proteção dos ácidos gordos das membranas neuronais, contribuindo para a homeostasia do sistema monoaminérgico (Ferreira, Filitão & Freitas, 2009; El-Saeed *et al.*, 2013).

Posto isto, e segundo os nossos resultados, a 5-HT foi o único neurotransmissor que foi influenciado significativamente pela substituição de OP-S por OV-S, tendo a sua concentração aumentado nas dietas de OV-S. Também foi possível observar uma tendência para o aumento da concentração da DA e NA quando ocorre substituição de OP-NS por OV-NS, muito embora, neste caso, as diferenças não tenham sido significativas. Estes resultados corroboram outros trabalhos que também constataram um aumento da concentração de DA e 5-HT no espaço extracelular, quando os animais foram alimentados com uma dieta deficiente em PUFA n-3 (Zimmer *et al.*, 2000a; Kodas *et al.*, 2004). Esta evidência tem sido associada com a diminuição do armazenamento das monoaminas nas vesículas pré-sinápticas culminando em níveis de libertação basais de DA (Zimmer *et al.*, 2000a) e 5-HT (Kodas *et al.*, 2004) maiores. Com efeito, a deficiência em ácidos gordos essenciais reflete-se na diminuição do nível de DHA e no aumento dos níveis de PUFA n-6 (tal como o ácido docosapentaenóico [22:5n-6]) nas membranas do tecido neuronal (Delion *et al.*, 1997; Chalon *et al.*, 1998; Kodas *et al.*, 2002a, 2002b; Chalon, 2006). Esta alteração composicional das membranas neuronais tem como consequência a diminuição da reciclagem e síntese de vesículas sinápticas (Lesá *et al.*, 2003; Chalon, 2006; Marza *et al.*, 2008). Aliás, alguns estudos referem que, nos mamíferos, as dietas pobres em PUFA n-3 conduzem à diminuição da densidade de vesículas pré-sinápticas no hipocampo (Yoshida *et al.*, 1997) e córtex frontal (Zimmer *et al.*, 1998, 1999, 2000b), bem como à diminuição da densidade de VMAT<sub>2</sub>, o qual é importante no transporte de monoaminas para o interior das vesículas pré-sinápticas (Zimmer *et al.*, 1999; Kodas *et al.*, 2002b). Também foi observada uma diminuição do compartimento vesicular e do número das vesículas dopaminérgicas no córtex cerebral desses animais (Zimmer *et al.*, 1999, 2000b), indicando uma diminuição da libertação de

monoaminas a partir das mesmas (Zimmer *et al.*, 1998), uma vez que, a concentração de monoaminas é constante no interior das vesículas de armazenamento (Colliver *et al.*, 2000). Em suma, o aumento dos níveis basais de neurotransmissores será o resultado da diminuição da libertação dos neurotransmissores a partir das vesículas sináticas, que acabam por se acumular no espaço extracelular (Zimmer *et al.*, 2000a).

O facto de termos obtido diferenças significativas apenas num dos neurotransmissores estudados (5-HT), em contraste com trabalhos anteriores (Delion *et al.*, 1997; Chalon *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 2000a; Varghese *et al.*, 2001; Chalon, 2006), poderá justificar-se com dois fatores. O primeiro diz respeito à metodologia pois neste trabalho a quantificação da concentração das monoaminas foi feita com o cérebro inteiro. Ora todos os trabalhos realizados em ratos iniciaram a sua abordagem com a separação do cérebro nas suas respectivas regiões, que também foram analisadas separadamente (Delion *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997; Chalon *et al.*, 1998; Kudas *et al.*, 2002a, 2002b, 2004; Zimmer *et al.*, 1998, 1999, 2000a, 2000b; Varghese *et al.*, 2001; Takeuchi, Fukumoto & Harada, 2002; Chalon, 2006; Vancassel *et al.*, 2008). É portanto provável que os nossos resultados tenham sido afetados pela diluição ao homogenizar o cérebro inteiro, pois a capacidade de recaptação das monoaminas é variável nas diferentes regiões cerebrais o que resultará em concentrações extracelulares de monoaminas regionalmente diferentes (Schmitz *et al.*, 2003). O segundo fator relaciona-se com a duração do ensaio, que poderá ter sido reduzida para que fossem detectadas diferenças significativas, uma vez que nos trabalhos com ratos, citados anteriormente, os ensaios decorrem normalmente ao longo de 2 gerações (Delion *et al.*, 1997; Chalon *et al.*, 1998; Kudas *et al.*, 2002a, 2002b, 2004; Zimmer *et al.*, 1998, 1999, 2000a, 2000b; Takeuchi, Fukumoto & Harada, 2002; Chalon, 2006).

Relativamente à concentração dos metabolitos analisados, os nossos resultados não indicaram diferenças significativas quando comparamos os tratamentos OP-S e OV-S nem quando comparamos os tratamentos OP-NS e OV-NS. Por outro lado, alguns trabalhos associaram a diminuição do pool vesicular com o aumento dos níveis dos seus metabolitos (Zimmer *et al.*, 1998, 2000a). O aumento dos níveis de metabolitos, nomeadamente do DOPAC e HVA são fruto da acção da MAO sobre a DA, que se encontra na fenda sinática ou que não foi incluída nas vesículas pré-sináticas (Zimmer *et al.*, 1999; Zimmer *et al.*, 2000a). O facto de nós não termos encontrado diferenças nas concentrações de metabolitos poderá indicar-nos que a atividade da MAO não foi alterada com a substituição dos OP por OV.

No que toca à suplementação das dietas com selénio, importa referir que também não encontramos diferenças significativas entre os tratamentos. Porém, quando comparamos os resultados dos tratamentos OP-S e OP-NS podemos observar uma tendência para o

aumento da concentração da DA, ao mesmo tempo que há uma ligeira diminuição da concentração dos metabolitos DOPAC e HVA. Os nossos resultados estão de acordo com as observações de Ferreira, Militão & Freitas (2009), cuja administração do ácido- $\alpha$ -lipóico, um forte antioxidante, culminou na diminuição da peroxidação lipídica e no conseqüente aumento da concentração de NA e DA no hipocampo do cérebro de ratos sem que a concentração de metabolitos tenha sido alterada.

A explicação exacta para o facto da concentração de NA ter aumentado no presente trabalho não é óbvia, e este é claramente um dos aspectos que carece de mais investigação, mas uma das hipóteses poderá ser que, embora a sua libertação tenha aumentado, ela foi menos metabolizada ou menos recaptada.

O efeito da suplementação de selénio na concentração de monoaminas e metabolitos não foi tão evidente nas dietas de OV. Na verdade, os OV apresentam um menor grau de insaturação quando comparados com os OP, e por isso são menos susceptibilidade à peroxidação lipídica (Haggag, Elsanhoty & Ramadan, 2014). Parece que nos óleos vegetais o efeito da peroxidação lipídica pode não ter sido tão evidente, não se tendo repercutido o efeito positivo do selénio sobre o sistema monoaminérgico.

Os nossos resultados também apontam para que as vias de metabolização das monoaminas na corvina sejam distintas das descritas nos mamíferos e das descritas para algumas outras espécies de peixes. Isto porque constatámos que o principal metabolito da serotonina nos mamíferos, o 5-HIAA, não foi detetado pela técnica de HPLC utilizada, o que poderá indicar que, na corvina, a via de metabolização da 5-HT origina metabolitos diferentes do 5-HIAA. Verificámos também que, em todos os tratamentos, a concentração de A foi muito próxima de 1 ng/g de peso do cérebro fresco (ou seja, próximo do limite de detecção do equipamento), o que se revelou muito inferior às concentrações das restantes monoaminas. Provavelmente esta monoamina nos peixes poderá ser menos relevante do que os demais neurotransmissores analisados, ou então, intervirá noutras vias de metabolização sendo rapidamente metabolizada.

Em resumo, os nossos resultados confirmam as nossas hipóteses de trabalho, na medida em que verificamos que nesta espécie a substituição total de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais modela positivamente a expressão dos genes *fads2* e *elov15* hepáticos e tende a aumentar a concentração das monoaminas no cérebro das corvinas. Além disso, a suplementação das dietas com selénio poderá ter um importante contributo na potenciação da expressão destes mesmos genes e na concentração de monoaminas cerebrais, principalmente quando as dietas são à base de óleo de peixe.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que a substituição total de óleo de peixe por misturas de óleos vegetais na dieta poderá modelar positivamente a expressão da *fads2* e da *e/ov/5* hepática da corvina. No cérebro a expressão génica não foi influenciada significativamente, mas a concentração de monoaminas foi alterada. Esta constatação poderá indicar-nos que o turnover dos fosfolípidos foi prejudicado nas membranas neuronais diminuindo a libertação de monoaminas, principalmente da 5-HT. Como consequência fica aumentada a probabilidade de ocorrência de alterações neurológicas que poderão resultar, por exemplo, em alterações acentuadas do comportamento da espécie.

Relativamente à suplementação das dietas com selénio constatamos que essa pode ser importante no controlo da peroxidação lipídica, contribuindo para o turnover dos fosfolípidos da membrana.

## 7. TRABALHOS FUTUROS

Estudos recentes têm confirmado a existência de uma multiplicidade de vias possíveis para a biossíntese de HUFA em peixes, revelando uma diversificação muito mais significativa do que a observada em mamíferos. Alguns autores acreditam que os peixes poderão possuir vias que até ao momento ainda não foram descritas.

Neste sentido, seria importante estudarmos as vias adotadas pela corvina no processo de biossíntese de HUFA, através do isolamento de todos os genes e caracterização funcional das enzimas envolvidas neste processo.

Por outro lado, ainda existe ainda um grande desconhecimento sobre os mecanismos envolvidos na regulação dos genes do metabolismo lipídico em peixes. O aprofundamento do conhecimento destes mecanismos seria muito importante.

O conhecimento sobre o impacto que a dieta tem sobre o sistema monoaminérgico dos peixes é quase nulo. Por isso, seria de grande interesse o estudo da forma como a dieta modela a densidade das vesículas de armazenamento das monoaminas, a composição das membranas neuronais e a atividade da MAO, já que isso seria um significativo complemento a este trabalho. Por fim, a conjugação destes trabalhos com a análise comportamental das espécies e a associação ao seu estado de bem-estar seriam também de extrema relevância.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Agaba, M., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Dick, J. R., Teale, A. J., 2004. Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *Marine Biotechnology*, 6: 251–261.
- Agaba, M. K., Tocher, D. R., Zheng, X., Dickson, C. A., Dick, J. R., Teale, A. J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 142: 342 – 352.
- Apromar, 2012. *La Acuicultura Marina en España 2012*.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., Sargent, J. R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *American Society for Nutritional Sciences*, 22: 1535-1543.
- Benoit-Marand, M., Borrelli, E. & Gonon, F., 2001. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 21(23): 9134–9141.
- Bermano, G., Nicol, F., Dyer, J. A., Sunde, R. A., Beckett, G. J., Arthur, J. R., Hesketh, J. E., 1995. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochemical Journal*, 311: 425-430.
- Bois, T. M., Deng, C., Bell, W., Huang, X. F., 2006. Fatty acids differentially affect serotonin receptor and transporter binding in the rat brain. *Neuroscience*, 139(4): 1397-1403.
- Botolin, D., Wang, Y., Christian, B., Jump, D. B., 2006. Docosahexaenoic acid (22:6, n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. *Journal of Lipid Research*, 47: 181-192.
- Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Favre-Krey, L., Diez, A., Bautista, J. M., Leaver, M. J., Tocher, D. R., Krey, G., 2004. Molecular characterization of three peroxisome proliferator-activated receptors from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*, 39(11): 1085-1092.
- Bourre, J. E., Dumont, O. S., Piciotti, M. J., Pascal, G. A., Durand, G. A., 1992. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid deficiency in adult rats for 7 months does not alter brain docosahexaenoic acid content, in contrast to liver, heart and testes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1124: 119–122.
- Calzada, B. C., Artiñano, A. A., 2001. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacological Research*, 44 (3): 196-208.



- Cárdenas, S., 2010. Cuadernos crianza de la corvina (*Argyrosomus regius*). De acuicultura. Fundacion Observatorio Espanol de Acuicultura. Madrid, 2010.
- Cárdenas, S., 2012. Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. Revista Aquatic, 37: 1-13.
- Carlier, H., Bernard, A., Caselli, C., 1991. Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids. *Reproduction Nutrition Development*, 31: 475-500.
- Castro, L. F. C., Monroig, O., Leaver, M. J., Wilson, J., Cunha, I., Tocher, D. R., 2012. Functional desaturase Fads1 ( $\Delta 5$ ) and Fads2 ( $\Delta 6$ ) orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates. *PLOS ONE*, 7: 1-9.
- Chalon, S., Delion-Vancassel, S., Belzung, C., Guilloteau, D., Leguisquet, A., Besnard, J., Durand, G., 1998. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behavior in rats. *American Society for Nutritional Sciences*. 12: 2512-2519.
- Chalon, S., Vancassel, S., Zimmer, L., Guilloteau, D., Durand, G., 2001. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*, 36(9): 937-944.
- Chalon, S., 2006. Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75: 259-269.
- Cho, H. P., Nakamura, M. T. & Clarke, S. D., 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian D-6 desaturase. *The journal of biological chemistry*, 274: 471-477.
- Cho, S. D., Jiang, C., Malewicz, B., Dong, Y., Young, C. Y. F., Kang, K., Lee, Y., Ip, C., Lu, J., 2004. Methyl selenium metabolites decrease prostate-specific antigen expression by inducing protein degradation and suppressing androgen-stimulated transcription. , 3: 605-612.
- Chun, J. Y., Nadiminty, N., Lee, S. O., Onate, S. A., Lou, W., Gao, A. C., 2006. Mechanisms of selenium down-regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5: 913-918.
- Clarke, S. D., 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *American Society for Nutritional Sciences*, 22: 1129-1132.
- Colliver, T. L., Pyott, S. J., Achalabun, M., Ewing, A. G., 2000. VMAT-mediated changes in quantal size and vesicular volume. *The Journal of Neuroscience*, 20(14): 5276-5282.
- Cook, H. W. & McMaster, C. R., 2002. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. In: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipid, Lipoproteins and membranes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 181-204.

- Cook, H. W. & McMaster, R. C. R., 2004. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes, eds DE Vance and JE Vance (Elsevier, Amsterdam), pp 181–204.
- Cunha, I., Galante-Oliveira, S., Rocha, E., Planas, M., Urbatzka, R., Castro, L, F., 2013. Dynamics of PPARs, fatty acid metabolism genes and lipid classes in eggs and early larvae of a teleost. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 164(4): 247-258.
- D'Aquino, M., Benedetti, P. C., Di Felice, M., Gentili, V., Tomassi, G., Maiorino, M., Ursini, F., 1991. Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. *Free Radical Research Communications*, 1:147-52.
- Delion, S., Chalon, S., Guilloteau, D., Lejeune, B., Besnard, J., Durand, G., 1997. Age-related changes in phospholipid fatty acid composition and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus of rats fed a balanced or an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet. *Journal of Lipid Research*, 38: 680-689.
- Docherty, J. R., 1998. Subtypes of functional  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 361: 1–15.
- Dong, Y., Ganther, H. E., Stewart, C., Ip, C., 2002. Identification of molecular targets associated with selenium-induced growth inhibition in human breast cells using cDNA microarrays. *Cancer Research*, 62: 708-714.
- Dong, Y., Lee, S. O., Zhang, H., Marshall, J., Gao, A. C., Ip, C., 2004. Prostate specific antigen expression is down-regulated by selenium through disruption of androgen receptor signaling. *Cancer Research*, 64: 19-22.
- Duplus, E., Glorian, M. & Forest, C., 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 30749-30752.
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., Goldstein, D. S., 2004. Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological reviews*, 56(3): 331-349.
- Elsworth, J. D. & Roth, R. H., 1997. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 144: 4-9.
- Espenshade, P. J., 2006. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of Cell Science*, 119: 973-976.
- Estévez, A., Treviño, L., Kotzamanis, Y., Karacostas, I., Tort, L., Gisbert, E., 2011. Effects of different levels of plant proteins on the on-growing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 17: 572- 582.

- FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. 218pp.
- FAO, 2013. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus\\_regius/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en) (visitado em Outubro de 2013).
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fernstrom, J. D., 1999. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on neuronal function. *Lipids*, 34 (2): 161-169.
- Fernstrom, J. D. & Fernstrom, 2007. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *American Society for Nutrition*, 137: 1539–1547.
- Ferreira, P. M., Militão, G. C. & Freitas, R. M., 2009. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 464(2): 131-134.
- Fishbase, 2010. <http://www.fishbase.org/summary/Argyrosomus-regius.html> (visitado em Outubro de 2013).
- Fuller, R. W., 1982. Pharmacology of brain epinephrine neurons. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 22: 31-55.
- Geay, F., Santigosa, E., Culi, I., Corporeau, C., Boudry, P., Dreano, Y., Corcos, L., Bodin, N., Vandeputte, M., Zambonino-Infante, J. L., Mazurais, D., Cahu, C. L., 2010. Regulation of FADS2 expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed a vegetable diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 156 (4): 237-243.
- Geay, F., Ferrareso, S., Zambonino-Infante, J. L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C. L., Mazurais, D., 2011. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics*, 12: 1-18.
- Georgiadi, A. & Kersten, S., 2012. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *American Society for Nutrition. Advances in Nutrition*, 3: 127–134.
- Gil, M. M., Grau, A. & Riera, I., 2009. Atlas histológico del tracto digestivo de la corvina de cría, *Argyrosomus regius*. XII Congreso Nacional De Acuicultura. Madrid.
- González-Quirós, R., Árbol, J. D., García-Pacheco, M. D. M., Silva-García, A. J., Naranjo, J. M., Morales-Nin, B., 2011. Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research*, 109: 140–149.

- González-Rovira, A., Mourente, G., Zheng, X., Tocher, D. R., Pendón, C., 2009. Molecular and functional characterization and expression analysis of a  $\Delta 6$  fatty acyl desaturase cDNA of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 298: 90–100.
- Gregory, M. K., See, V. H. L., Gibson, R. A., Schuller, K. A., 2010. Cloning and functional characterisation of a fatty acyl elongase from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 155: 178–185.
- Haag, M., 2003. Essential fatty acids and the brain. *Canadian Journal Psychiatry*, 48(3): 195-203.
- Haggag, M. E. Y. E. H., Elsanhoty, R. M., Ramadan, M. F., 2014. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): 52-58.
- Hasan, M.R. 2001. Nutrition and feeding for sustainable aquaculture development in the third millennium. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery & J.R. Arthur, eds. *Aquaculture in the Third Millennium*. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium, Bangkok, Thailand, 20-25 February 2000. pp. 193-219. NACA, Bangkok and FAO, Rome.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D. R., Leaver, M. J., Dick, J. R., Sargent, J. R., Teale, A. J., 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 14304–14309.
- Hastings, N., Agaba, M. K., Tocher, D. R., Zheng, X., Dickson, C. A., Dick, J. R., Teale, A. J., 2005. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from  $\alpha$ -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Biotechnology*, 6: 463–474.
- Hesketh, J., 2008. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annual Review of Nutrition*, 28: 157–77.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.*, 109: 1125–1131.
- Horton, J. D., Shah, D. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L., 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 12027–12032.
- Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71: 533–554.

<http://www.diversifyfish.eu/meagre-argyrosomus-regius.html>, visitado em 23-07-2014

[http://www.orgone.com.br/a\\_thumor1.html](http://www.orgone.com.br/a_thumor1.html), visitado em 15 de Junho de 2014

[http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia\\_id=256&materiaver=1](http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia_id=256&materiaver=1),  
visitado em 15 de Junho de 2014

Huang, C., Huang, M. & Hou, P., 1998. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 120: 331–336.

Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., Caron, M. G., 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35: 1503-1519.

Jakobsson, A., Westerberg, R. & Jacobsson, A., 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 45: 237–249.

Jaya-Ram, A., Kuah, M., Lim, P., Kolkovski, S., Shu-Chien, A. C., 2008. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*, 277: 275–281.

Jiménez, M. T., Pastor, E., Grau, A., Alconchel, I., Cárdenas, S., 2005. Revisión sobre el cultivo de esciéndidos en el mundo, com especial atención a la corvina (*Argyrosomus regius*). *Boletín (Instituto Español de Oceanografía)*, 21: 169-176.

Jordal, A. O., Torstensen, B. E., Tsoi, S., Tocher, D. R., Lall, S. P., Douglas, S. E., 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of Nutrition*, 135: 2355-2361.

Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., Demeure, O., 2005. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *American Society for Nutrition*. 135(11): 2503-2506.

Jump, D. B., Tripathy, S. & Depner, C. M., 2013. Fatty acid–regulated transcription factors in the liver. *Annual Review of Nutrition*, 33: 249–69.

Kema, I. P., Vries, E. G. E. & Muskiet, F. A. J., 2000. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747: 33–48.

Kennedy, S. R., Leaver, M. J., Campbell, P. J., Zheng, X., Dick, J. R., Tocher, D. R., 2006. Influence of dietary oil content and conjugated linoleic acid (CLA) on lipid metabolism enzyme activities and gene expression in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Lipids*, 41(5): 423-436.

Kim, S. H., Kim, J. B., Jang, Y. S., Kim, S. Y., Roh, K. H., Kim, H. U., Lee, K., Park, J., 2012. Isolation and functional characterization of polyunsaturated fatty acid

- elongase (AsELOVL5) gene from black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Biotechnology Letters*, 34: 261–268.
- Kodas, E., Vancassel, S., Lejeune, B., Guilloteau, D., Chalon, S., 2002a. Reversibility of n-3 fatty acid deficiency-induced changes in dopaminergic neurotransmission in rats: critical role of developmental stage. *Journal of Lipid Research*, 43: 1209–1219.
- Kodas, E., Page, G., Zimmer, L., Vancassel, S., Guilloteau, D., Durand, G., Chalon, S., 2002b. Neither the density nor function of striatal dopamine transporters were influenced by chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in rodents. *Neuroscience Letters*, 321: 95–99
- Kodas, E., Galineau, L., Bodard, S., Vancassel, S., Guilloteau, D., Besnard, J., Chalon, S., 2004. Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *Journal of Neurochemistry*, 89: 695–702.
- Kota, B. P., Huang, T. H. & Roufagalis, B. D., 2005. Overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, 51: 85-94.
- Leaver, M. J., Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Diez, A., Favre-Krey, L., Ezaz, M. T., Bautista, J. M., Tocher, D. R., Krey, G., 2005. Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology*, 146(7): 3150–3162.
- Leaver, M. J., Bautista, J. M., Björnsson, B. T., Jönsson, E., Krey, G., Tocher, D. R., Torstensen, B., 2008a. Towards fish lipid nutrigenomics: Current state and prospects for fin-fish aquaculture. *Review in Fisheries Science*, 16: 73–94.
- Leaver, M. J., Villeneuve, L. A., Obach, A., Jensen, L., Bron, J. E., Tocher D. R., Taggart J. B., 2008b. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 9: 299.
- Lee, S. O., Nadiminty, N., Wu, X. X., Lou, W., Dong, Y., Ip, C., Onate, S. A., Gao, A. C., 2005. Selenium disrupts estrogen signaling by altering estrogen receptor expression and ligand binding in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 65: 3487-3492.
- Lemberger, T., Desvergne, B. & Wahli, W., 1996. Peroxisome proliferator-activated receptors: A Nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12: 335–63.
- Leonard, A. E., Kelder, B., Bobik, E. G., Chuang, L., Lewis, C. J., Kopchick, J. J., Mukerji, P., Huang, Y., 2002. Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids*, 37: 733-740.
- Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H., Huang, Y., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 43: 36–54.

- Lesca, G. M., Palfreyman, M., Hall, D. H., Clandinin, M. T., Rudolph, C., Jorgensen, E. M., Schiavo, G., 2003. Long chain polyunsaturated fatty acids are required for efficient neurotransmission in *C. elegans*. *Journal of cell science*, 116: 4965-4975.
- Li, Y., Monroig, O., Zhang, I., Wang, S., Zheng, X., Dick, J. R., You, C., Tocher, D. R., 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with  $\Delta^4$  activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 16840–16845.
- Ling, S., Kuah, M., Muhammad, T. S. T., Kolkovski, S., Shu-Chien, A. C., 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 261: 204–214.
- Los, D. A. & Murata, N., 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1394: 3-15.
- Maglich, J. M., Caravella, J. A., Lambert, M. H., Willson, T. M., Moore, J. T., Ramamurthy, L., 2003. The first completed genome sequence from a teleost fish (*Fugu rubripes*) adds significant diversity to the nuclear receptor superfamily. *Nucleic Acids Research*, 31(14): 4051-4058.
- Marquardt, A., Stöhr, H., White, K., Weber, B. H., 2000. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, 66(2): 175-83.
- Marteinsdottir, I., Horrobin, D. F., Stenfors, C., Theodorsson, E., Mathé, A. A., 1998. Changes in dietary fatty acids alter phospholipid fatty acid composition in selected regions of rat brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 22(6): 1007-1021.
- Marza, E., Long, T., Saiardi, A., Sumakovic, M., Eimer, S., Hall, D. H., Lesca, G. M., 2008. Polyunsaturated fatty acids influence synaptotagmin localization to regulate synaptic vesicle recycling. *Molecular Biology of the Cell*, 19: 833–842.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Yoshikawa, T., Hasty, A. H., Tamura, Y., Osuga, J., Okazaki, H., Iizuka, Y., Takahashi, A., Sone, H., Gotoda, T., Ishibashi, S., Yamada, N., 2002. Dual regulation of mouse  $\Delta^5$ - and  $\Delta^6$ -desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR $\alpha$ . *Journal of Lipid Research*, 43: 107-114.
- Miller, M. R., Bridle, A. R., Nichols, P. D., Carter, C. G., 2008. Increased elongase and desaturase gene expression with stearidonic acid enriched diet does not enhance long-chain (n-3) content of seawater Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of Nutrition*, 138: 2179–2185.

- Mohd-Yusof, N. Y., Monroig, O., Mohd-Adnan, A., Wan, K. L., Tocher, D. R., 2010. Investigation of highly unsaturated fatty acid metabolism in the Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4): 827-843.
- Monfort, M.C., 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. *Studies and Reviews. General Fisheries Commission for the Mediterranean. No. 89. Rome, FAO*, 28p.
- Monroig, O., Zhen, X., Morais, S., Leaver, M. J., Taggart, J. B., Tocher, D. R., 2010. Multiple genes for functional  $\Delta 6$  fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution *and* nutritional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801: 1072–1081.
- Monroig, O., Li, Y., Tocher, D. R., 2011.  $\Delta$ -8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in  $\Delta$ -6 desaturases of marine species. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 159(4): 206-213.
- Monroig, O., Tocher, D. R., Hontoria, F., Navarro, J. C., 2013. Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with  $\Delta 6/\Delta 8$  activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 412-413: 14-22.
- Montine, T. J., Neely, M. D., Quinn, J. F., Beal, M. F., Markesbery, W. R., Roberts, I. J., Morrow, J. D., 2002. Lipid peroxidation in aging brain and alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (5): 620–626.
- Moon, Y., Hammer, R. E. & Horton, J. D., 2009. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *Journal of Lipid Research*, 50: 412-423.
- Morais, S., Monroig, O., Zheng, X., Leaver, M. J., Tocher, D. R., 2009. Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: Characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like Elongases. *Marine Biotechnology*, 11: 627–639.
- Morais, S., Pratoomyot, J., Taggart, J. B., Bron, J. E., Guy, D. R., Bell, J. G., Tocher, D. R., 2011. Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC Genomics*, 12: 255.
- Morilak, D. A., Barrera, G., Echevarria, D. J., Garcia, A. S., Hernandez, A., Ma, S., Petre, C. O., 2005. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(8): 1214-1224.



- Mourente, G. & Dick, J. R., 2002. Influence of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on the metabolism of [1-<sup>14</sup>C] 18:3n-3 in isolated hepatocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 297–308.
- Mourente, G., Dick, J. R., Bell, J. G., Tocher, D. R., 2005. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and h-oxidation of [1-<sup>14</sup>C] 18:3n-3 (LNA) and [1-<sup>14</sup>C] 20:5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 248: 173-186.
- Nakamura, M. T. & Nara, T. Y., 2003. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68: 145–150.
- Nakamura, M. T., Cheon, Y., Li, Y., Nara, T. Y., 2004. Mechanisms of regulation gene expression by fatty acids. *Lipids*, 39(11): 1077-1083.
- Okuno, T., Miura, K., Sakazaki, F., Nakamuro, K., Ueno, H., 2012. Methylselinonic acid (MAS) inhibits 17β-estradiol-induced cell growth in breast cancer T47D cells via enhancement of the antioxidative thioredoxin/thioredoxin reductase system. *Biomedical Research*, 33(4): 201-210.
- Orun, I., Talas, Z. S., Ozdemir, I., Alkan, A., Erdogan, K., 2008. Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>)-induced rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 71–75.
- Pandey, P., Mersha, M. D. & Dhillon, H. S., 2013. A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *Journal of Molecular Signaling*, 8: 1-8.
- Park, W. J., Kothapalli, K. S. D., Lawrence, P., Tyburczy, C., Brenna, J. T., 2009. An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product D8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *Journal of Lipid Research*, 50: 1195-1202.
- Pereira, S. L., Leonard, A. E. & Mukerji, P., 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68: 97–106.
- Perottoni, J., Rodrigues, O. E. D., Paixão, M. W., Zeni, G., Lobato, L. P., Braga, A. L., Rocha, J. B. T., Emanuelli, T., 2004. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 17–28.
- Pfaffl, M. W.; 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, 29: e45.
- Poli, B. M., Parisi, B., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P., Bonelli, A., 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus*

- regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International*, 1: 301–311.
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., Felšöci, M., 2011. Serotonin Receptors – From molecular biology to clinical applications. *Physiological Research*, 60: 15-25.
- Quéméner, L., Suquet, M., Mero, D., Gaignon, J., 2002. Selection method of new candidates for finfish aquaculture: the case of the French Atlantic, the Channel and the North Sea coasts. *Aquatic Living Resources*, 15: 293–302.
- Quéro, J. & Vayne, J., 1987. Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de gascogne et des eaux plus septentrionales. *Reu. Trau. Inst. Pêches marit.*, 49: 35-66.
- Quin, Y., Dalen, K. T., Gustafsson, J., Nebb, H. I., 2009. Regulation of hepatic fatty acid elongases 5 by LXR $\alpha$ -SREBP-1c. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791: 140–147.
- Quintas, A., Freire, A. P. & Halpern, M. J., 2008. *Bioquímica: Organização molecular da vida*. Lidel, Edições técnicas, Ida., 30: 449-531.
- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Müller, M., Kersten, S., 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research*, 612089.
- Rayman, M., P. & Dphil, 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356: 233-241.
- Rayman, M. P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64: 527–542.
- Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P., Zelus, D., Hughes, S., Laudet, V., 2001. Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. *Genome Research*, 11: 781–788
- Sampath, H. & Ntambi, J. M., 2006. Regulation of gene expression by polyunsaturated fatty acids. *Heart and Metabolism*, 32: 32–35.
- Sayanova, O., Shewry, P. R. & Napier, J. A., 1999. Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage  $\Delta$ 6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiology*, 121: 641–646.
- Sayanova, O., Beaudoin, F., Libisch, B., Shewry P., Napier, J., 2000. Mutagenesis of the borage  $\Delta$ 6 fatty acid desaturase. *Biochemical Society Transactions*, 28(6): 636-638.
- Schitz, G. & Ecker, J., 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47: 147–155.
- Schmitz, Y., Benoit-Marand, M., Gonon, F., Sulzer, D., 2003. Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*: 87, 273–289.
- Seilliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a  $\Delta$ 6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 130: 83-93.

- Seilliez, I., Panserat, S., Corraze, G., Kaushik, S., Bergot, P., 2003. Cloning and nutritional regulation of a D6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 135: 449–460.
- Shah, Y. M., Al-Dhaheri, M., Dong, Y., Ip, C., Jones, F. E., Rowan, B. G., 2005. Selenium disrupts estrogen receptor  $\alpha$  signaling and potentiates tamoxifen antagonism in endometrial cancer cells and tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4: 1239-1249.
- Shimizu, M. & Moriwaki, H., 2008. Synergistic Effects of PPAR $\gamma$  Ligands and Retinoids in Cancer Treatment. *PPAR Research*, 2008: 1-10.
- Sneddon, A. A., Wu, H., Farquharson, A., Grant, I., Arthur, J. R., Rotondo, D., Choe, S., Wahle, K. W. J., 2003. Regulation of selenoprotein GPx4 expression and activity in human endothelial cells by fatty acids, cytokines and antioxidants. *Atherosclerosis*, 171: 57–65.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1486: 219-231.
- Srinivasarao, P., Narayanareddy, K., Vajreswari, A., Rupalatha, M., Prakash, P. S., Rao, P., 1997. Influence of dietary fat on the activities of subcellular membrane-bound enzymes from different regions of rat brain. *Neurochemistry International*, 31 (6): 789-794.
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R. & Subasinghe, R. P., 2006. Use of fishery resources as feedinputs for aquaculture development: trends and policy implications. *FAO Fisheries Circular*. No. 1018. Rome, Italy.
- Takahashi, H., Kato, M., Takano, H., Arakawa, R., Okumura, M., Otsuka, T., Kodaka, F., Hayashi, M., Okubo, Y., Hiroshi Ito, Suhara, T., 2008. Differential contributions of prefrontal and hippocampal dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in human cognitive functions. *The Journal of Neuroscience*, 28(46): 12032–12038.
- Takeuchi, T., Fukumoto, Y. & Harada, E., 2002. Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behavioural Brain Research*, 131: 193–203.
- Tanaka, K., Farooqui, A. A., Siddiqi, N. J., Alhomida, A. S., Ong, W., 2012. Effects of docosahexaenoic acid on neurotransmission. *Biomolecules and Therapeutics*, 20(2): 152-157.
- Tang, C., Cho, H. P., Nakamura, M. T., Clarke, S. D., 2003. Regulation of human  $\Delta$ -6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. *Journal of Lipid Research*, 44: 686-695.
- Tocher, D. R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107–184.

- Tocher, D. R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J. R., Teale, A. J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: Cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl  $\Delta 6$  Desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids*, 41: 1003-1016.
- Vagner, M., Robin, J. H., Infante, J. L. Z., Ruyet, J. P., 2007a. Combined effects of dietary HUFA level and temperature on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture*, 266: 179–190.
- Vagner, M., Infante, J. L. Z., Robin, J. H., Ruyet, J. P., 2007b. Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larvae stage?. *Aquaculture*, 267: 165–174.
- Vagner, M., Robin, J. H., Zambonino-Infante, J. L., Tocher, D. R., Ruyet, J. P., 2009. Ontogenic effects of early feeding of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a range of dietary n-3 highly unsaturated fatty acid levels on the functioning of polyunsaturated fatty acid desaturation pathways. *British Journal of Nutrition*, 101: 1452–1462.
- Vagner, M. & Santigosa, E., 2011. Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of  $\Delta$ -6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture*, 315: 131-143.
- Vallone, D., Picetti, R. & Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24: 125–132.
- Vancassel, S., Leman, S., Hanonick, L., Denis, S., Roger, J., Nollet, M., Bodard, S., Kousignian, I., Belzung, C., Chalon, S., 2008. n-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *Journal of Lipid Research*, 49: 340-348.
- Varghese, S., Lakshmy, P. S. & Oommen, O. V., 2001. Changes in lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities by triiodothyronine ( $T_3$ ) and polyunsaturated fatty acids (pufa) in rat liver. *Endocrine research*, 27(4): 409–416.
- Varghese, S., Shameena, B., Lakshmy, P. S., Biju, M. P., Shankar, E. P. N., Paulose, C. S., Oommen, V. O., 2001. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) regulate neurotransmitter contents in rat brain. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 38: 327-330.
- Vincent, S. & Robertson, D., 2002. The broader view: catecholamines abnormalities. *Clinical Autonomic Research*, 12: 44-49.
- Wahli, W., Braissant, O. & Desvergne, B., 1995. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more.... *Chemistry & Biology* 1995, 2 (5): 261-266.

- Wainwright, P. E., 2002. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61: 61–69.
- Wallukat, G., 2002. The  $\beta$ -adrenergic receptors. *Urban & Vogel*, 27: 683-690.
- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., Jump, D. B., 2005. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *Journal of Lipid Research*, 46: 706-715.
- Willson, T. M., Lambert, M. H. & Kliewer, S. A., 2001. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor  $\gamma$  and metabolic disease. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 341–67.
- Xu, J., Nakamura, M. T., Cho, H. P., Clarke, S. D., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (33): 23577–23583.
- Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J. H. Y., Nakamura, M. T., Clarke, S. D., 2001. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (13): 9800–9807.
- Yoshida, S., Yasuda, A., Kawazato, H., Sakai, K., Shimada, T., Takeshita, M., Yuasa, S., Kobayashi, T., Watanabe, S., Okuyama, H., 1997. Synaptic vesicle ultrastructural changes in the rat hippocampus induced by a combination of  $\alpha$ -linolenate deficiency and a learning task. *Journal of Neurochemistry*, 68: 1261-1268.
- Yoshikawa, T., IDE, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ameniya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Yatoh, S., Kitamine, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Sekiya, M., Takahashi, A., Hasty, A. H., Sato, R., Sone, H., Osuga, J., Ishibashi, S., Yamada, N., 2003. Cross-talk between peroxisome proliferator- activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Molecular Endocrinology*, 17(7): 1240–1254.
- Youdim, K. A., Martin, A. & Joseph, J. A., 2000. Essential fatty acids and the brain: Possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18: 383-399.
- Zhao, H., Whitfield, M. L., Xu, T., Botstein, D., Brooks, J. D., 2004. Diverse effects of methylseleninic acid on the transcriptional program of human prostate cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 506–519.
- Zimmer, L., Hembert, S., Durand, G., Breton, P., Guilloteau, D., Besnard, J. C., Chalon, S., 1998. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study. *Neuroscience Letters*, 240: 177–181.

- Zimmer, L., Breton, P., Durand, G., Guilloteau, D., Besnard, J. C., Chalon, S., 1999. Prominent role of n-3 polyunsaturated fatty acids in corticol dopamine metabolism. *Nutritional Neuroscience*, 2: 257-265.
- Zimmer, L., Delion-Vancassel, S., Durand, G., Guilloteau, D., Bodard, S., Besnard, J., Chalon, S., 2000a. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*, 41: 32-40.
- Zimmer, L., Delpal, S., Guilloteau, D., Èoun, J. A., Durand, G., Chalon, S., 2000b. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neuroscience Letters*, 284: 25-28.
- Zheng, X., Seilliez, I., Hastings, N., Tocher, D. R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004a. Characterization and comparison of fatty acyl  $\Delta 6$  desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(2): 269-79.
- Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Bell, J. G., Teale, A. J., 2004b. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 236: 467–483.
- Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Bell, J. G., Teale, A. J., 2005a. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: New insights with the cloning and characterisation of a  $\Delta 6$  desaturase of Atlantic salmon. *Lipids*, 40: 13-24.
- Zheng, X., Torstensen, B. E., Tocher, D. R., Dickson, R. R., Henderson, R. J., Bell, J. G., 2005b. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734: 13– 24.
- Zheng, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O., Morais, S., Tocher, D. R., 2009. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl  $\Delta 6$  desaturase and *elov15* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 290: 122–131.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1 – Lista de publicações

**Silva-Brito F**, Fonseca S, Peixoto MD, Domingues AF, Damasceno-Oliveira A, Gonçalves J, Castro FC, Cunha I and Ozorio ROA (2014). Metabolic regulation in meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801): Study of gene-diet interactions on lipid metabolism. Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014. doi: 10.3389/conf.FMARS.2014.02.00014.

**Silva-Brito F**, Fonseca SB; Pousão-Ferreira P; Ozório ROA; Gonçalves JFM; Damasceno-Oliveira A. 2014. Effect of diet on concentration of monoamines in brain of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801). Nutritional Neuroscience (To submit).

Magnoni, LJ, **Silva-Brito F**, Fonseca S, Peixoto MD, Domingues AF, Damasceno-Oliveira A, Gonçalves J, Castro FC, Cunha I and Ozorio ROA (2014). Effect of replacement of fish oil by vegetable oil in diets on expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver and brain of meagre (*Argyrosomus regius*). (To submit).

**Anexo 2 – Abstract publicado no “International Meeting on Marine Research 2014”**

**Metabolic regulation in meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801): Study of gene-diet interactions on lipid metabolism**

Francisca Silva-Brito<sup>1</sup>, Sthelio Fonseca<sup>2</sup>, Maria João D. Peixoto<sup>2</sup>, Andreia F. Domingues<sup>2</sup>, Alfredo Damasceno-Oliveira<sup>2</sup>, José Gonçalves<sup>1</sup>, Filipe F. C. Castro<sup>2,3</sup>, Isabel Cunha<sup>2</sup> and Rodrigo O. A. Ozorio<sup>1,2\*</sup>

- <sup>1</sup> ICBAS - Abel Salazar Institute for Biomedical Sciences – University of Porto, Portugal
- <sup>2</sup> CIIMAR - Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, Portugal
- <sup>3</sup> FCUP - Faculty of Sciences - University of Porto, Portugal

Fish oil is the most important source of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFAs) for humans. With the stagnation of world marine fisheries, the role of aquaculture stocks increased rapidly as source of n-3 HUFA (FAO, 2012), but not sufficiently. To reduce the dependence as well as find ways to use of marine sources more economically and efficiently, the use of vegetable oils (VO) have been widely investigated (Estévez et al., 2011). Vegetable oils are rich in C18 PUFA, but devoided of the docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), essential fatty acids involved in maintaining cell membrane structure, among other essential functions. The capacity of fish to thrive on diets containing only the C18 PUFA, 18 : 2n – 6 and 18 : 3n – 3 varies among species (Tocher, 2003; Leaver et al., 2008; Castro et al., 2012). It is well documented that teleosts have different enzyme capacity to desaturate-elongate 18C fatty acids into 20-22C LC-PUFAs (Cook & McMaster, 2004; Leaver et al., 2008). Generally, freshwater fish species can convert 18:2 n-6 and 18:3 n-3 to HUFA more efficiently than marine species, especially carnivorous which prey on organisms rich in HUFA (Tocher, 2003). Thus, the modulation of expression and translation of elongases and desaturases is of great importance to achieve independence of (carnivorous) marine fish aquaculture from fishmeal and fish oil. There is currently considerable interest in the HUFA biosynthetic pathway in fish aiming to determine the effectiveness of vegetable oils as a total replacement of fish oil in the aquaculture of carnivore fish species (Vagner & Santigosa, 2011). Selenium is a structural component for several enzymes, including glutathione peroxidase and thioredoxine (Perotoni et al., 2004). These enzymes have physiological antioxidant properties and thus, protect the tissues of lipid peroxidation products (Orun et al., 2008). The current study aimed to evaluate the effects of dietary lipid profile on fads2 (fatty acyl desaturase gene) and elovl5 (fatty acyl elongase gene) expression in liver and



brain of meagre (*Argyrosomus regius*). The four isoproteic and isolipidic diets (50% protein and 12% lipid, dry matter basis) were formulated with fish oil (FO) or a blend of vegetable oils (VO, rapeseed, linseed and soybean), each with selenium (S, 1mg/kg diet) or without selenium (NS). Fish were fed ad libitum for 60 days under a controlled rearing conditions (temperature =  $20,7 \pm 0,7$  °C; pH = 8; O<sub>2</sub> = > 6 ppm). Ribonucleic acid (RNA) was extracted from two tissues: liver and brain using RNAspin Mini RNAIsolation Kit (GE Healthcare), with includes a step with DNase I to remove the presence of DNA. The integrity of the extracted RNA was verified by agarose electrophoresis. The RNA concentrations were obtained by nanodrop. From the total RNA, 0.5µg were transcribed to complementary DNA (cDNA) using iScript Reverse Transcription Supermix for RT-PCR (BioRad) following the manufacturer protocol. Gene expression from *fads2* and *elovl5* were quantified by analysis of RT-PCR. The  $\beta$ -actine was used as a reference gene. On VO diet hepatic *fads2* expression was significantly higher, but not *elovl5* expression. In brain of VO fed fish, *fads2* and *elovl5* expression was not significantly different when compared with FO fed fish (Table 1). With selenium supplementation hepatic *fads2* expression was lower in FO ( $P < 0.01$ ) but, in VD, selenium had an opposite effect on hepatic *fads2* expression ( $P > 0.05$ ). The same trend was evident for hepatic *elovl5* expression ( $P > 0.05$ ) (Table1). Recently, Monroig et al. (2013) described the first functional characterization of meagre Fads2 and Elovl5. This work concluded that, unlike most teleosts, the Fads2 processes  $\Delta 6$  and  $\Delta 8$  activity. However, conversion rates of meagre Fads2 were low when compared to *Salmo salar*  $\Delta 6$  Fads<sub>c</sub> (Monroig et al., 2011). On the other hand, meagre Elovl5 showed high activity towards C<sub>18</sub> and C<sub>20</sub>. Thus,  $\Delta 6/\Delta 8$  activity might be ineffective in converting C18 PUFA and therefore an increase of dietary C18 PUFA may stimulates the expression of the *fads2*. In contrast, Elovl5 is very efficient to convert the desaturated products of  $\Delta 6/\Delta 8$  and so Elovl5 expression is not enhanced, since the activity of this enzyme is already higher. These findings may explain the differences in the expression of two genes, between hepatic *fads2* and *elovl5*. Furthermore, increased hepatic *fads2* expression between FO-S and VO-S treatments was 114 fold. Such induction was much greater than observed in *Salmo salad* (Zheng et al., 2005). However, *Salmo salad* has separate and distinct genes for  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases (Zheng et al., 2005) and, due to genome duplication, it has two genes with  $\Delta 6$  activity (Monroig et al., 2010). Moreover, lipid peroxidation in liver increases with the number of fatty acid (FA) double bonds (Haggag, Elsanhoty & Ramadan, 2014). D'Aquino et al. (1991) observed that rats fed diets with fish oil had increased lipid peroxidation. Our results indicate that, in FO-S, selenium may have protected FA from peroxidation, thus dietary HUFA seemed to have been sufficient to maintain the phospholipid turnover and induction of FA metabolism genes did not occur. In FO-NS diet membranes were not

protected efficiently from lipid peroxidation, and therefore a higher expression of FA metabolism genes was necessary to offset the damage, consequently, biosynthesis of HUFA was more stimulated. ROS-induced oxidative stress has been associated with expression and protein levels of transcription factors (Okuno et al., 2012). A reduction of ROS (Reactive Oxygen Species) has been observed in fish fed VO with selenium, when compared to VO without selenium (data not presented). It is plausible to infer that a stimulation of expression and level of protein SREBP-1 by a reduction of ROS. SREBP-1 play a role on the regulation of genes involved in biosynthesis of HUFA, as *fads2* and *elov15* (Jump, Tripathy & Depner, 2013). In conclusion, our results showed that vegetable oils have an effect on expression level of genes involved in HUFAs biosynthesis in meagre, mainly *fads2*, which seems to be the rate limiting enzyme in this pathway. In addition, dietary selenium seems to favor the expression of genes involved in the biosynthesis of HUFAs, when meagre is fed on VO-based diet.

## Acknowledgements

This study was partially supported by the European Regional Development Fund (ERDF) through the COMPETE - Operational Competitiveness Programme and National Funds through the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) , under the project "PEst-C/MAR/LA0015/2013".

## References

- Castro, L. F. C., Monroig, O., Leaver, M. J., Wilson, J., Cunha, I., Tocher, D. R., 2012. Functional Desaturase Fads1 ( $\Delta 5$ ) and Fads2 ( $\Delta 6$ ) Orthologues Evolved before the Origin of Jawed Vertebrates. PLoS ONE, 7: 1-9.
- Cook, H. W., McMaster, R. C. R., 2004. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes, eds DE Vance and JE Vance (Elsevier, Amsterdam), pp 181–204.
- D'Aquino, M., Benedetti, P.C., Felice, M. D., Gentili, V., Tomassi, G., Maiorino, M., Ursini, F., 1991. Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. Free Radical Research, 12 (1):147-52.
- Estévez, A., Treviño, L., Kotzamanis, Y., Karacostas, I., Tort, L., Gisbert, E., 2011. Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. Aquaculture Nutrition, 17: 572- 582.
- FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Electronic Publishing Policy and Support Branch Communication Division. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. 218pp.
- Haggag, M. E. Y. E., Elsanhoty, R. M., Ramadan, M. F., 2014. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. Asian Pac J Trop Biomed, 4(1): 52-58
- Jump, D. B., Tripathy, S. & Depner, C. M., 2013. Fatty Acid–Regulated Transcription Factors in the Liver. Annu. Rev. Nutr., 33: 249–69.
- Leaver, M. J., Bautista, J. M., Björnsson, B. T., Jönsson, E., Krey, G., Tocher, D. R., Torstensen, B., 2008. Review in Fisheries Science, 16: 73–94.
- Monroig, O., Li, Y., Tocher, D. R., 2011.  $\Delta$ -8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in  $\Delta$ -6 desaturases of marine species. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 159(4): 206-213.
- Monroig, O., Tocher, D. R., Hontoria, F., Navarro, J. C., 2013. Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with  $\Delta 6/\Delta 8$  activity and an Elov15 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*). Aquaculture, 412-413: 14-22.

Monroig, O., Zhen, X., Morais, S., Leaver, M. J., Taggart, J. B., Tocher, D. R., 2010. Multiple genes for functional 6 fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801: 1072–1081.

Okuno, T., Miura, K., Sakazaki, F., Nakamuro, K., Ueno, H., 2012. Methylseleninic acid (MAS) inhibits 17 $\beta$ -estradiol-induced cell growth in breast cancer T47D cells via enhancement of the antioxidative thioredoxin/thioredoxin reductase system. *Biomedical Research*, 33(4): 201-210.

Orun, I., Talas, Z. S., Ozdemir, I., Alkan, A., Erdogan, K., 2008. Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>)-induced rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 71–75.

Perottoni, J., Rodrigues, O. E. D., Paixão, M. W., Zeni, G., Lobato, L. P., Braga, A. L., Rocha, J. B. T., Emanuelli, T., 2004. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem. Toxicol.*, 42: 17–28.

Tocher, D. R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107–184.

Vagner, M., Santigosa, E., 2011. Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of  $\Delta$ -6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture*, 315: 131-143.

Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Bell, J. G., Teale, A. J., 2005. Highly Unsaturated Fatty Acid Synthesis in Vertebrates: New Insights with the Cloning and Characterisation of a  $\Delta$ 6 Desaturase of Atlantic Salmon. *Lipids*, 40: 13-24.

**Keywords:** Fatty acyl desaturase, Fatty acyl elongase, Highly unsaturated fatty acids, Vegetable oils, Fish Oils

**Conference:** IMMR | International Meeting on Marine Research 2014, Peniche, Portugal, 10 Jul - 11 Jul, 2014.

**Presentation Type:** Poster Presentation

**Topic:** AQUACULTURE

**Citation:** Silva-Brito F, Fonseca S, Peixoto MD, Domingues AF, Damasceno-Oliveira A, Gonçalves J, Castro FC, Cunha I and Ozorio RA (2014). Metabolic regulation in meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801): Study of gene-diet interactions on lipid metabolism. *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014*. doi: 10.3389/conf.FMARS.2014.02.00014

**Received:** 09 May 2014; **Published Online:** 18 Jul 2014.

\* **Correspondence:** Dr. Rodrigo O. A Ozorio, ICBAS - Abel Salazar Institute for Biomedical Sciences – University of Porto, Porto, Portugal, rodrigo.ozorio@ciimar.up.pt

© 2007 - 2014 Frontiers Media S.A. All Rights Reserved

# Anexo 3 – Poster apresentado no “International Meeting on Marine Research 2014”

Francisca Brito<sup>1</sup>  
 Sthelio Fonseca<sup>2,3</sup>  
 Maria João D. Peixoto<sup>2</sup>  
 Andreia F. Domingues<sup>2</sup>  
 Alfredo Oliveira<sup>2</sup>  
 José F. M. Gonçalves<sup>1</sup>  
 Filipe Castro<sup>2,4</sup>  
 Isabel Cunha<sup>2</sup>  
 Rodrigo O. A. Ozório<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ICBAS  
 Abel Salazar Institute for Biomedical Sciences – University of Porto.

<sup>2</sup>CIIMAR  
 Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research – University of Porto.

<sup>3</sup>UFPA  
 Federal University of Pará, Brazil

<sup>4</sup>FCUP  
 Faculty of Sciences – University of Porto

IMMR<sup>14</sup>  
 10th International Meeting on Marine Research

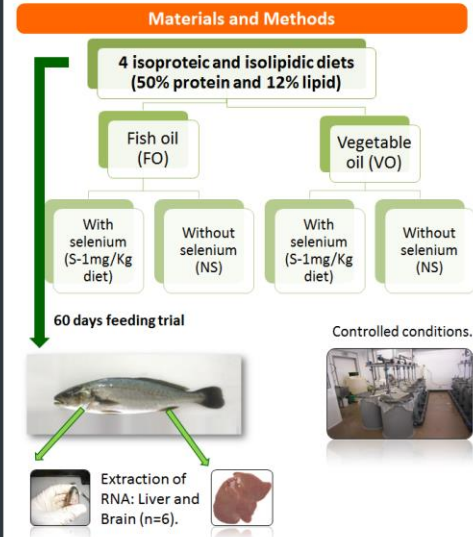
\*This research was partially supported by ERDF through the COMPETE and national funds through FCT, under the project "PEST-C/MAR/LA0015/2013".

## Metabolic regulation in meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801): Study of gene-diet interactions on lipid metabolism

- ### Introduction
- ✓ Vegetable oils (VOs) are increasingly used in fish diets
  - ✓ VOs are rich in C<sub>18</sub> PUFA, but devoid of the 22:6n-3 (DHA) and 20:5n-3 (EPA), two highly unsaturated fatty acids (HUFAs) with a crucial role on membrane structure and function.
  - ✓ Marine carnivore fish are not able to synthesize DHA from 18:3 n-3 (ALA) at effective rates.
  - ✓ The modulation of expression and translation of elongases and desaturases is of absolute importance for HUFA biosynthesis (figure 1).
  - ✓ Selenium is a structural component for several enzymes with physiological antioxidant properties that could play a role in dietary oils utilization.

### Objective

- Evaluate the effects of dietary lipid profile and selenium supplementation on *fads2* (fatty acyl desaturase gene) and *elov5* (fatty acyl elongase gene) expression in liver and brain of meagre (*Argyrosomus regius*).



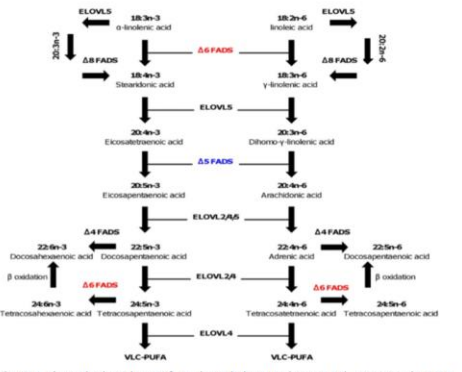
- ✓ The integrity of the extracted RNA was verified by agarose electrophoresis;
- ✓ The RNA concentrations was obtained by nanodrop;
- ✓ 0.5µg of total RNA were transcribed to complementary DNA (cDNA);
- ✓ Expression of *fads2* and *elov5* was quantified by RT-PCR analysis;
- ✓ β-actin was used as a housekeeping gene.

### Results and Discussion

Table 1: Effects of dietary treatment on *fads2* and *elov5* expression

Treatment	Liver		Brain	
	<i>fads2</i>	<i>elov5</i>	<i>fads2</i>	<i>elov5</i>
FO-S	0.34 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.29	0.73 ± 0.29	0.78 ± 0.27
FO-NS	5.55 ± 3.01 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.55	1.17 ± 0.63	0.60 ± 0.16
VO-S	38.85 ± 9.33 <sup>c</sup>	1.70 ± 0.28	0.81 ± 0.13	0.64 ± 0.18
VO-NS	25.51 ± 8.91 <sup>c</sup>	1.31 ± 0.22	1.03 ± 0.84	0.27 ± 0.08

Values are mean ± standard error. Different superscript letters in the same column indicate significant differences (FO-S vs FO-NS, p<0,01; FO-S vs VO-S, p<0,001; FO-NS vs VO-NS, p<0,01).



- ✓ Meagre *Fads2* has both Δ6 and Δ8 activity. Its conversion rates are lower than other species (e.g. *Salmo salar*);
- ✓ Δ6/Δ8 activity might be ineffective in converting C<sub>18</sub> PUFA and therefore an increase of dietary C<sub>18</sub> PUFA may stimulate the expression of the *fads2*;
- ✓ Meagre *Elov5* showed high activity towards C<sub>18</sub> and C<sub>20</sub> PUFA and so *Elov5* expression was not enhanced;
- ✓ In fish fed FO diet, *fads2* expression was inhibited by selenium supplementation. It is an indication that fatty acid synthesis was not needed, probably due to reduction of fatty acid loss through peroxidation, under selenium protection.

### Conclusion

		FO-NS	VO-NS	FO-S	VO-S
Liver	<i>fads2</i>	↓	↑↑	↓↓	↑↑
	<i>elov5</i>	=	=	=	=
Brain	<i>fads2</i>	=	=	=	=
	<i>elov5</i>	=	=	=	=