

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
Programa Integrado de Pós Graduação em Biologia Tropical e
Recursos Naturais**

**IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
GENES EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818)
ALIMENTADO COM FRUTOS E SEMENTES DA AMAZÔNIA**

LUCIANA MELHORANÇA MOREIRA AÑEZ

**Manaus – AM
Setembro, 2008**

LUCIANA MELHORANÇA MOREIRA AÑEZ

**IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
GENES EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818)
ALIMENTADO COM FRUTOS E SEMENTES DA AMAZÔNIA**

Orientadora: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação e Biologia Tropical de Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Ecologia

Bolsa de doutorado: CAPES

Financiamento: Edital MCT/CNPq/FAPEAM nº 010/2003 - PRONEX

**Manaus – AM
Setembro, 2008**

A579 Añez, Luciana Melhorança Moreira
Identificação e diferenciação da expressão de genes em tambaqui
(*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) alimentado com frutos
e sementes da Amazônia / Luciana Melhorança Moreira Añez . ---
Manaus : [s.n.], 2008.
xvi, 105 f. : il.

Tese (doutorado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2008
Orientador : Vera Maria Fonseca de Almeida e Val
Área de concentração : Ecologia

1. Tambaqui – Alimentação e rações. 2. Nutrição animal.
3. *Colossoma macropomum*. I. Título.

CDD 19. ed. 597.50443

SINOPSE:

Este trabalho teve como objetivo avaliar em nível molecular os efeitos da incorporação dos frutos camu-camu, catoré, embaúba, jauari e da semente munguba na alimentação do tambaqui, na proporção de 1:1 com a ração comercial. Foram avaliados também os efeitos fisiológicos, bioquímicos e citogenotóxicos nos peixes submetidos a alimentação experimental por períodos de 1, 15 e 30 dias de alimentação. As dietas experimentais não provocaram alterações nos parâmetros sanguíneos desses animais, porém, produziram transcritos expressos diferencialmente, com similaridade às sequências das enzimas Superóxido dismutase, Citocromo P450 e da proteína Apolipoproteína. Sete sequências não apresentaram similaridade com aquelas depositadas no GenBank e duas sequências foram caracterizadas como produtos de proteína não identificada. Essas seqüências são candidatas a futuras investigações para a compreensão de processos específicos do metabolismo dos animais alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia.

DEDICO

À minha família.

Aos meus pais, Cirene e Edmir, pelo apoio, estímulo e amor.

Ao Rogério pelo companheirismo e dedicação à nossa família.

Ao Lorenzo e à Sophia, pelo carinho demonstrado em cada abraço e sorriso e pelos constantes momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, por iluminar meus caminhos e por me fazer acreditar que este sonho seria possível.

À Dra Vera Maria Fonseca de Almeida e Val pela orientação, confiança, amizade, incentivo e apoio, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Adalberto Luís Val pelas sugestões, atenção e oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Dr. Sérgio Nozawa, por toda ajuda, paciência, incentivo e explicações, durante a execução deste trabalho.

À Angélica, Nazaré e Raquel pela amizade e por todo auxílio no período de realização do meu doutorado, à Sylvia e Luiza por toda colaboração. À D. Sônia pelas conversas, companhia, cafezinhos e bolos.

Às amigas Katherine, Christiane, Nislanha, Alzira e Nívia pelas sugestões, críticas, ajuda, apoio e, sobretudo, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados em todo o tempo que passei em Manaus.

À equipe do LEEM: Karen, Vivian, Sandra, Ronildo, Daniella, Viviane, Suely e Frank pela ajuda durante o período experimental e análises hematológicas e enzimáticas. Ao Marcos, Ramon, Carolina, Roziete e Luciano pelo apoio durante os experimentos de expressão gênica.

À equipe do Centro Universitário Nilton Lins: Dra Mônica, Frida, Kácio, e toda equipe, pela recepção e ajuda nos experimentos realizados no Laboratório de Expressão Gênica.

Ao Laboratório de Nutrição de Peixes – CPAQ/INPA pelas análises bromatológica das rações experimentais.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, através do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais e do curso de Ecologia, pela oportunidade do doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Às Agências de Fomento FAPEAM e CNPq que financiaram o trabalho por meio do Edital MCT/CNPq/FAPEAM nº 010/2003 – PRONEX.

À Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT pelo apoio.

Ao departamento de Ciências Biológicas – UNEMAT/Cáceres, particularmente à Chefe de departamento MsC. Leila Valderez Gattass pela compreensão e auxílio durante a fase final do doutorado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As frutas desempenham um papel importante nos ecossistemas da planície inundável da Amazônia Central, especialmente se considerarmos a relação peixes-plantas. Mais de 110 espécies de plantas foram identificadas como produtoras de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui em seu ambiente natural. O conhecimento do hábito alimentar desses animais na natureza, possibilitou a inclusão de frutos e sementes na dieta de peixes criados em cativeiro, visando baratear custos da produção, mantendo um crescimento satisfatório dos animais. Porém, a presença de fatores antinutricionais pode limitar a inclusão de certos produtos vegetais na dieta desses peixes. Este trabalho teve como objetivo avaliar em nível molecular os efeitos da incorporação dos frutos camu-camu, catoré, embaúba, jauari e da semente munguba na alimentação do tambaqui, na proporção de 1:1 com a ração comercial. Foram avaliados também os efeitos fisiológicos, bioquímicos e citogenotóxicos nos peixes submetidos a períodos de 1, 15 e 30 dias de alimentação modificada. Os resultados demonstraram que os frutos e sementes não provocaram alterações metabólicas, enzimáticas e citogenotóxicas nos peixes durante os períodos testados. Entretanto, foi possível verificar diferenças significativas em função do período de alimentação e da privação alimentar a que os peixes foram submetidos. A expressão diferencial de genes mostrou fragmentos que apresentaram similaridade com os genes das enzimas Adenilato Quinase, Superóxido Dismutase, Apolipoproteína e Citocromo P450. Outros sete transcritos expressos não demonstraram similaridade com as enzimas depositadas no GenBank, e dois fragmentos foram caracterizados como produtos de proteína não identificada, sendo candidatos a futura investigação para a compreensão de processos específicos do metabolismo dos animais alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia.

ABSTRACT

Fruits play an important role in the Central Amazonia floodplain ecosystem, especially when considering the relation fish-plants. More than 110 plants species have been identified which produce fruits and seeds consumed by tambaqui in its natural environment. The knowledge of the food habits of these animals in nature, made possible the inclusion of fruits and seeds in the fish diet created when reared under captivity, aiming to decrease production costs, and keeping a satisfactory fish growth rate. However, the presence of antinutritional factors can limit the inclusion of certain vegetable products in the diet of these fishes. This work aims to evaluate, at a molecular level, the effect of the incorporation of the fruits 'camu-camu', 'catoré', 'embaúba', 'jauari' and 'munguba' seeds in tambaqui feeding, in the ratio of 1:1 with a commercial ration. The physiological, biochemical and cytogenotoxicity parameters were also evaluated for their effects in the fishes submitted to a period of 1, 15 and 30 days of modified feeding. The results demonstrated that fruits and seeds did not affect metabolic, enzymatic and cytogenotoxic alterations in the fishes during the tested periods. However, it was possible to verify a significant difference in the feeding period and food deprivation in submitted fishes. The gene differential expression showed fragments that presented similarity with Adenylate Kinase, Superoxide Dismutase, Apolipoprotein and Cytochrome P450 enzyme genes. Others seven expressed transcripts did not demonstrate similarity with enzymes deposited in the GenBank, and two fragments were characterized as products of proteins not identified therefore being candidates for future studies in order to understand the animals process metabolism when fed with supplemented rations with Amazonian fruits and seeds.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Fontes alternativas de alimentos para a criação de peixes.....	04
Aspectos da nutrição de peixes.....	08
A espécie animal e os frutos.....	12
OBJETIVO.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
HIPÓTESE.....	18
CAPÍTULO I	
PERFIL HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E CITOGENOTÓXICO DE TAMBAQUIS (<i>Colossoma macropomum</i> Cuvier, 1818) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADAS COM FRUTOS E SEMENTES DA AMAZÔNIA	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES.....	23
COLETA E ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS.....	23
ELABORAÇÃO DAS RAÇÕES.....	24
DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA.....	26
ANÁLISE DE CRESCIMENTO.....	26
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	27
ANÁLISE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	29
EFEITO CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS.....	30
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
RESULTADOS.....	32
VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA.....	32
ANÁLISE DE CRESCIMENTO.....	33
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	34
ANÁLISE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	40
EFEITO CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS.....	43
DISCUSSÃO.....	46
VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA.....	46
ANÁLISE DE CRESCIMENTO.....	47
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	50
ANÁLISE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	54

EFEITO CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS.....	57
CONCLUSÃO.....	60
CAPÍTULO II	
IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES EM TAMBAQUIS (<i>Colossoma macropomum</i> CUVIER, 1818) ALIMENTADOS COM FRUTOS E SEMENTES DA AMAZÔNIA	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
MATERIAL BIOLÓGICO.....	66
PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO DD-PCR.....	67
SEQUENCIAMENTO.....	73
RESULTADOS.....	74
DISCUSSÃO.....	82
CONCLUSÃO.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	PÁGINA
Tabela 1. Composição centesimal (% da MS) e valor energético (EB KJg MS) dos frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (<i>C. macropomum</i>).....	24
Tabela 2. Composição centesimal (% da MS) das rações controle e experimentais utilizadas neste trabalho.....	25
Tabela 3. Valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH medidos durante o período experimental.....	33
Tabela 4. Dados dos índices de desempenho de tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>) alimentados com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia.....	34
Tabela 5. Valores de Volume corpuscular médio (VCM μm^3), Hemoglobina corpuscular média (HCM pg) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM %) de tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>) alimentados com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia nos períodos de 1 dia, 15 dias e 30 dias.....	38
Tabela 6. Valores de Volume corpuscular médio (VCM μm^3), Hemoglobina corpuscular média (HCM pg) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM %) de tambaquis (<i>Colossoma macropomum</i>) alimentados com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia por um período de 30 dias e submetidos a posterior privação alimentar.....	39
CAPÍTULO II	
Tabela 1. <i>Primers</i> arbitrários utilizados na amplificação do cDNA.....	70
Tabela 2. Concentração do RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) extraído do fígado de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) alimentado com frutos e sementes da Amazônia.....	74
Tabela 3 - Transcritos diferencialmente expressos detectados pela DDRT-PCR e comparados ao banco de dados do GenBank.....	78
Tabela 4 - Transcritos diferencialmente expressos por tratamento e condição alimentar.....	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	PÁGINA
Figura 1. Valores de hematócrito de <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias de hematócrito em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	35
Figura 2. Valores de hemoglobina de <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	36
Figura 3. Número de eritrócitos circulantes (RBC) de <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	36
Figura 4. Concentração de glicose de <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	39
Figura 5. Valores médios da atividade da Glutationa S- Transferase (GST) ($\mu\text{mol. min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína) em <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	41
Figura 6. Valores médios da atividade da Catalase ($\mu\text{mol. min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína) em <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	42
Figura 7. Concentração endógena de produtos celulares oxidados (TBARS) em <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	43
Figura 8. Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) em <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.....	44
Figura 9. Teste cometa em preparações celulares de <i>Colossoma macropomum</i> . A. Comparação entre as médias do Índice de Danos em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias da Frequência de Danos em função dos dias de alimentação.....	45

CAPÍTULO II

Figura 1. Vetor pGEM [®] -T Easy Vector System - PROMEGA.....	71
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose desnaturante do RNA total do fígado de <i>Colossoma macropomum</i> alimentado com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia.....	75
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% do cDNA sintetizado com oligos dT ancorados.....	75
Figura 4. Perfil da expressão diferencial de genes do fígado de tambaqui, alimentado com as rações experimentais por 1 dia, usando o <i>primer</i> PAI 2.....	76
Figura 5. Resultado da extração do DNA plasmidial, através de “Mini-Prep”.....	77
Figura 6. Fragmento de DNA de <i>Colossoma macropomum</i> com similaridade à enzima Adenilato Quinase 2 (AK2) no período de privação alimentar.....	79
Figura 7. Fragmento de DNA de <i>Colossoma macropomum</i> com similaridade à enzima Superóxido dismutase – Mn (SOD) no período de privação alimentar	80
Figura 8. Fragmento de DNA de <i>Colossoma macropomum</i> com similaridade à enzima Citocromo P450 (CYP 1A) no período de 15 dias de alimentação	80
Figura 9. Fragmentos de DNA de <i>Colossoma macropomum</i> com similaridade a proteína Apolipoproteína (APO). A e B no período de 1 dia de alimentação e C no período de 15 dias de alimentação	81

LISTA DE ABREVIATURAS

A260 ou ABS (540)- Absorbância em comprimento de onda igual a 260 ou 540 nanômetros

ADP – Adenosina di-fosfato

ATP – Adenosina tri-fosfato

AK – Adenilato quinase

AMP- Adenosina mono-fosfato

APO – Apolipoproteína

BLAST – Basic local alignment search tool

CAT – Catalase

CYP – Citocromo P450

cDNA – DNA complementar

Ct – Threshold cycle – “ciclo de limiar”

DD PCR – Differential display Polymerase chain reaction

DEPC – Dietil pirocarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

Dnase – Desoxirribinuclease

dNTP – Desoxirribonucleosídeo trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ERO – Espécie reativa ao oxigênio

GST – Glutathione S – transferase

GTP – Guanina tri-fosfato

IMP – Inosina mono-fosfato

IPTG – Isopropil- β -D-Tiogalactopiranosídeo

LB – Meio de cultura de bactérias – Luria Bertani

mim – Minuto

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MMLV-RT – “Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase”

MOPS – Ácido 3-N Mofolino Propanosulfônico

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

ng – Nanograma

pb – Pares de bases

PCR – “Polymerase chain reaction” – Reação em cadeia da polimerase

Pmol – Pícomol

q RT PCR – PCR quantitativo em tempo real

RNA – Ácido ribonucléico

Rnase – ribonuclease

rpm – rotação por minuto

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

X-Gal – 5 bromo – 4 cloro – 3 indolil - β – D – galactosidase

INTRODUÇÃO

A bacia amazônica é a maior área de floresta tropical do mundo, sendo drenada por rios que são influenciados pela distribuição sazonal de precipitação, bem como pela variação climática que rege o degelo da Cordilheira dos Andes, que garantem as oscilações no nível das águas (Sioli, 1984; Val & Almeida-Val, 1995). Em virtude dessa sazonalidade, a várzea que compõem a paisagem da Floresta Amazônica, é adaptada à submersão total ou parcial durante um período prolongado de cheias. As plantas que compõem a floresta passam então a desempenhar importante papel na alimentação de organismos aquáticos, em especial os peixes (Takahasi *et al.*, 1994).

A relação entre a Floresta Amazônica e o hábito alimentar de muitos peixes é bastante estreita, pois muitas espécies são dependentes dos alimentos que caem na água, principalmente folhas, flores, frutos e sementes (Goulding, 1980; Silva *et al.*, 2000; Claro-Jr *et al.*, 2004). A cada ano 100.000 Km² de florestas de várzea são inundados, formando uma enorme área de forrageamento para grande parte dos peixes amazônicos, que, sendo oportunistas em sua estratégia alimentar, encontram nos frutos e sementes sua principal fonte de alimento, aumentando suas reservas de gordura (Salati *et al.*, 1998).

As frutas desempenham um papel importante nos ecossistemas da planície inundável da Amazônia Central, especialmente se considerarmos a relação peixes-plantas (Claro-Jr *et al.*, 2004). Estima-se que a produção de frutos nas florestas de várzeas e igapós possa chegar a mais de um milhão de toneladas por ano (Araújo-Lima & Goulding, 1998) e que essa grande quantidade de frutos seja capaz de manter uma quantidade equivalentemente alta de peixes herbívoros (Waldhoff & Maia, 2000).

Goulding (1980) sugere que os frutos e sementes são os maiores mananciais naturais de nutrientes e energia para aproximadamente 200 espécies de peixes da Amazônia. Os peixes ligados à floresta de inundação são, em sua maioria, frugívoros, que evoluíram em

estreita relação com as árvores e arbustos amazônicos (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Várias espécies, particularmente as da grande ordem dos *Characiformes*, apresentam dentições especializadas para o consumo de certos tipos de frutas: o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um comedor especialista das frutas da *Hevea spruceana*, os pacus, dos gêneros *Mylossoma*, *Myleus* e *Broco*, são também comedores importantes de frutas de palmeiras, embaúbas e outras árvores (Imperatriz-Fonseca & Por, 2003).

Vários frutos são utilizados como fonte de alimento por peixes da região amazônica, entre eles: araçá (*Eugenia* sp.), camu-camu (*Myrciaria dubia*), catoré (*Crateva benthamii*), embaúba (*Cecropia* sp.), jauari (*Astrocaryum jauari*), munguba (*Pseudobombax munguba*), seringa (*Hevea brasiliensis*), seringa-barriguda (*Hevea spruceana*), tarumã-da-várzea (*Vitex cymosa*) e ucuúba (*Virola surinamensis*) (Takahasi *et al.*, 1994; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Silva *et al.*, 2000; Maués & Couturier, 2002). Cerca de 110 espécies de frutos e sementes, distribuídas em 36 famílias de plantas foram identificadas como alimentos para o tambaqui (*Colossoma macropomun*). Durante os meses de cheia, o conteúdo estomacal dessa espécie contém quantidade relativamente alta de frutos e sementes, coincidindo com o período de frutificação das árvores presentes nas áreas de várzeas e igapós (Silva *et al.*, 2000).

Tais informações precisam ser aproveitadas de uma maneira mais eficiente no que se refere às técnicas de cultivo de peixes. As informações sobre as exigências de vitaminas e nutrientes para grande parte das espécies de peixes criadas em cativeiro são limitadas, e os resultados de estudos com salmonídeos, ciprinídeos e outros grupos exóticos são geralmente aplicados comercialmente às demais espécies (Silva & Anderson, 1995), com poucas chances de sucesso. Este procedimento tem sido adotado principalmente pela falta de estudos sobre espécies tropicais que apresentam potencial para criação em cativeiro (Chagas & Val, 2003).

A plantação de árvores na várzea do rio Amazonas é confinada principalmente aos quintais dos ribeirinhos, e muitas dessas árvores produzem frutos que são utilizados como isca para a pesca. Tais árvores como outras plantas de várzea, estão adaptadas à inundação anual, frutificando durante a época da enchente (Araújo-Lima & Goulding, 1998). A utilização desses frutos pela população local na produção artesanal de rações para peixes, pode significar uma alternativa de uso sustentável dos recursos da floresta, assim como uma fonte de obtenção de proteína animal por meio da criação de peixes com baixo custo.

Nas últimas três décadas, vasta área de florestas inundáveis tem sido maciçamente devastada para atividades agropecuárias, o que põe em risco não apenas a diversidade da flora amazônica, mas também provoca um impacto negativo na fauna, em particular na ictiofauna, que depende da produtividade da floresta, assim como na população ribeirinha que tem no peixe sua principal fonte de proteína animal (Waldhoff *et al.*, 1996). Neste aspecto, Maia (2001) destaca que as espécies descritas como itens alimentares na dieta de peixes podem ser inseridas nos programas de recuperação ambiental e utilizadas na regeneração de áreas inundáveis, restaurando a oferta de alimentos para a ictiofauna e proporcionando o uso sustentável dos recursos das florestas inundáveis da Amazônia.

Estudos sobre conservação biológica têm sido restritos ao inventário e investigação de ecossistemas utilizando ferramentas genéticas ou apenas à investigação de campo. Entretanto, detectadas as principais espécies sob pressão antrópica, há que se considerar alternativas para sua conservação. As atividades de recomposição de populações na natureza a partir de populações artificiais devem ser acompanhadas de investigações sobre as melhores práticas de criação dessas espécies para que a reintrodução no ambiente natural tenha sucesso.

Esse é o caso de peixes super explorados na natureza como o tambaqui, cuja criação em cativeiro já ultrapassou as barreiras regionais e os métodos convencionais de cultivo,

onde já se tem, como primeira preocupação, a queda de variabilidade genética de populações artificiais (Almeida-Val, comunicação pessoal), assim como a precariedade com que as mesmas são mantidas em cativeiro. Para fins de conservação, tais populações artificiais são inviáveis. Assim, é necessário que se reestruem as práticas de criação dessa espécie, diversificando as procedências dos reprodutores, para aumentar as diversidades genéticas, evitando o endocruzamento e todas as suas consequências. Além dessa diversificação é recomendável o monitoramento com marcadores moleculares que permitam a identificação das possíveis diversidades genéticas, além de propiciar o rastreamento dos indivíduos produzidos.

A conservação do meio ambiente, aliada ao desenvolvimento econômico sustentável vem a ser uma das principais razões que justificam trabalhos considerados periféricos para a conservação biológica – periféricos, mas fundamentais para que se possa manter o equilíbrio ecológico de um ecossistema.

Fontes alternativas de alimentos para a criação de peixes

Para a expansão da piscicultura e seu desenvolvimento tecnológico são necessários, entre outros fatores, a produção de alevinos de qualidade superior e a formulação de programas de nutrição adequada para as espécies criadas em cativeiro, dentro dos diferentes sistemas de produção (Lovshin & Cyrino, 1998).

Uma das principais dificuldades encontradas pelos criadores de peixes é a disponibilidade de alimento de boa qualidade e baixo custo. As exigências nutricionais dos peixes são um dos fatores econômicos mais importantes na piscicultura, uma vez que a alimentação representa mais de 50% dos custos de produção (Pereira-Filho, 1995; Araújo-Lima & Goulding, 1998). O custo da alimentação é o principal fator limitante para a expansão do cultivo de peixes na Amazônia (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

De acordo com Silva *et al.* (2003), frutos e sementes das florestas de igapó e várzea são importantes fontes de alimentos para peixes. A diversidade de espécies vegetais na floresta amazônica, aliada aos estudos sobre o hábito alimentar e necessidades nutricionais de espécies de interesse comercial da região (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Chagas & Val, 2003) podem viabilizar a incorporação de frutos e sementes na alimentação de peixes, barateando os custos da piscicultura.

Algumas tentativas vêm sendo realizadas no sentido de tornar menos onerosos os gastos de produção, possibilitando que a atividade de piscicultura seja comercialmente mais atrativa na região amazônica. Silva *et al.* (2007) destacam a necessidade de substituir os ingredientes de origem animal da ração pelos de origem vegetal, como um meio de baratear os custos, e apresentam como alternativa a substituição de ingredientes tradicionalmente empregados nas rações por produtos regionais.

Roubach (1991) avaliou o uso de frutos e sementes de florestas inundáveis na alimentação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e obteve melhor eficiência nutricional com sementes de munguba (*Pseudobombax munguba*) e frutos de arroz silvestre (*Oriza sativa*), enquanto os menores índices foram obtidos com seringa (*Hevea* sp.) e embaúba (*Cecropia latiloba*).

Mori-Pinedo (1993), utilizou a farinha de pupunha (*Bactris gasipes*) com 7,0% de proteína bruta, em substituição a 55% do fubá de milho na ração para peixes e concluiu que a pupunha pode substituir o milho, sem prejuízo para o desempenho dos peixes.

Silva *et al.* (2003) estudaram o efeito da incorporação dos frutos jauari (*Astrocaryum jauari*) e embaúba (*Cecropia* sp.) e das sementes de munguba (*Pseudobombax munguba*) e seringa barriguda (*Hevea spruceana*) em substituição a 55% do fubá de milho da ração controle, na digestibilidade dos principais nutrientes e no tempo de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Destacaram que esses

itens podem ser utilizados como ingredientes alternativos em dietas práticas em substituição a itens tradicionais de ração, como forma de contribuir para a diminuição de custos de produção desta espécie em cativeiro.

Oliveira (2005) avaliou, por meio de análises fisiológicas e bioquímicas, o uso dos frutos camu-camu (*Myrciaria dubia*), catoré (*Crataeva benthami*), embaúba (*Cecropia latiloba*) e jauari (*Astrocaryum jauari*) e da semente de munguba (*Pseudobombax munguba*) na alimentação de tambaqui (*Colossoma macropomum*), em substituição de 50% da ração comercial e concluiu que todas as dietas testadas apresentam potencial para incorporação na ração para alevinos de tambaqui.

Embora os resultados dessas pesquisas apontem para a perspectiva do uso de frutos e sementes da região amazônica como meio de suplementar a ração para a criação de peixes, a qualidade desses produtos deve continuar sendo investigada por metodologias específicas para esse fim, uma vez que, para muitas espécies vegetais, ainda não foram avaliados os principais constituintes químicos, tampouco seus efeitos fisiológicos nos animais que delas se alimentam.

Araújo-Lima & Goulding (1998) destacam que os peixes que comem frutas não se alimentam de todas as sementes que são abundantes e de tamanho apropriado pra serem quebradas. Algumas espécies vegetais produzem muitas sementes por ano, mas são ingeridas apenas ocasionalmente por esses animais.

Sementes de seringa (*Hevea* sp.) apresentam uma taxa de até 0,09% de ácido prússico (ácido cianídrico), que pode ser inativado quando as sementes são processadas em altas temperaturas, ou após armazenagem por um período de seis meses (Roubach, 1991). Embora alguns autores descrevam o uso de frutos de plantas do gênero *Bactris* sp, como item alimentar de várias espécies de peixes (Mori-Pinedo *et al.*, 1999; Maia, 2001), a pupunha (*Bactris gasipaes*), fonte alternativa de alimento para inclusão em ração para

peixes, apresenta uma enzima que inibe a digestão das proteínas e um ácido (provavelmente oxálico) que irrita a mucosa bucal quando o fruto é usado “in natura”, necessitando ser processado antes do uso (Mori-Pinedo *et al.*,1999).

Pinto *et al.* (2001) enfatizam que o tanino, polifenol presente em muitos vegetais como soja, sorgo, canola, girassol, habitualmente usados na confecção de rações comerciais afetam o valor nutricional dos alimentos, principalmente por se complexar com as proteínas dietárias, com os carboidratos e com outras macromoléculas alimentares. Tais substâncias também provocam a inibição da atividade de várias enzimas digestivas, a diminuição da absorção de outros nutrientes na parede celular, devido à formação de complexos com íons divalentes de metais, e a erosão de células epiteliais do intestino. Os mesmos autores demonstraram que em piauçu (*Leporinus macrocephalus*) a presença de tanino na ração prejudicou o metabolismo e o desempenho reprodutivo da espécie, diminuindo o valor biológico dos nutrientes presentes nas rações e recomendaram valores inferiores a 0,46% de taninos totais presentes na ração para a criação dessa espécie.

Outro aspecto que requer atenção é o fato de que os alimentos de origem vegetal são menos digeríveis do que os de origem animal, visto que a composição estrutural e química das paredes celulares das plantas inibe as enzimas hidrolíticas, podendo fazer com que o metabolismo alimentar aumente, reprimindo o ganho energético dos animais (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

Por outro lado, frutos são fontes alimentares ricas em vitaminas e outros importantes compostos com capacidades antioxidantes (Alceste & Jory, 2000). As vitaminas são essenciais ao crescimento e metabolismo e, como normalmente não são sintetizadas em quantidade suficiente pelos animais, são geralmente exigidas em quantidades variáveis a partir da dieta, para a manutenção da função fisiológica normal (Almeida, 2003). Alguns animais são capazes de sintetizar vitamina C ou L-ácido ascórbico a partir da D-glucose.

Porém, na grande maioria das espécies de peixes, entre eles o tambaqui (*Colossoma macropomun*), a enzima responsável pela catalisação desta última etapa no fígado, a GLO (L-gulono-1, 4-lactona oxidase) não tem atividade (Fracalossi *et al.*, 1998) sendo, portanto, necessária a suplementação dietária de vitamina C.

Na tentativa de atender a essa necessidade foram testadas várias rações suplementadas com diferentes quantidades de vitaminas (Chagas, 2001; Mendes, 2001; Almeida, 2003; Aride, 2003), que apresentaram boas respostas fisiológicas e de crescimento, mas tornaram os custos de produção mais onerosos (Oliveira, 2005). Frutos tipicamente amazônicos como o camu-camu (*Myrciaria dubia*) apresentam uma grande quantidade de ácido ascórbico, podendo atingir 3.133 mg de vitamina C em 100 g de polpa integral (Yuyama *et al.*, 2002) proporcionando excelente potencial de incorporação à ração para peixes.

O uso de ingredientes regionais em ração tem se mostrado uma prática promissora para os pequenos produtores da região amazônica. As análises dos benefícios dessa prática, bem como da inserção de novos produtos (frutos, sementes, subprodutos da agroindústria) devem continuar por meio de metodologias adequadas, buscando destacar seus benefícios, superar suas deficiências e apresentar as alternativas necessárias para suprir as exigências nutricionais dos peixes, considerando-se as diferenças entre as espécies cultivadas.

Aspectos da nutrição de peixes

Como animais pecilotérmicos, o metabolismo dos peixes é mais eficiente no aproveitamento da energia dos alimentos para a sua termoregulação corporal. Gastam menos energia para locomoção na água e economizam energia excreção dos resíduos nitrogenados que são eliminados pelas brânquias sob a forma de amônia, quando comparados à uréia ou ácido úrico, eliminados pelos homeotermos terrestres (Takahashi, 2008).

As exigências nutricionais dos peixes variam de acordo com a espécie, fase de desenvolvimento e sistema de criação. O tambaqui (*C. macropomum*), por exemplo, na natureza, necessita alimentar-se de itens de composição variada para poder realizar um balanceamento da sua dieta em termos dos principais nutrientes e energia para satisfazer suas necessidades metabólicas (Silva *et al.*, 2003). Em condições experimentais, Mori-Pinedo *et al.* (1999), comprovaram que os níveis de proteína nas rações que variam entre 27,3 a 30,4% estão dentro dos níveis recomendados por diversos autores para atender as necessidades fisiológicas do tambaqui. Goulding & Araújo-Lima (1998) estimaram que tambaquês adultos mantêm uma dieta de 23 kJ/g de matéria seca consumida enquanto que nos jovens o suprimento é de 19 a 20 kJ/g de matéria seca, e destacam que os adultos necessitam de alimentos mais energéticos para contrabalancear seus altos custos metabólicos.

Aspectos nutricionais têm demonstrado que qualquer dieta que vise proporcionar o crescimento precisa incluir os nutrientes que o animal precisa, tais como proteína, carboidrato, gorduras, vitaminas e minerais (Pereira-Filho, 1995). A nutrição influencia o comportamento, a integridade estrutural, a saúde, as funções fisiológicas, a reprodução e o crescimento dos peixes. Assim, estudos em nutrição se baseiam na capacidade do animal em aproveitar o alimento e na sua resposta metabólica frente à variação dos nutrientes da dieta (Suarez *et al.*, 1995), além de avaliar a influência de fatores que possam atuar no aproveitamento desses nutrientes.

Tanto o excesso quanto a deficiência em energia na dieta dos peixes podem reduzir as taxas de crescimento. Para Lovell (1988), a energia dos alimentos é utilizada primeiramente para satisfazer as necessidades energéticas de manutenção e atividades voluntárias (metabolismo basal) e depois é que estas estarão disponíveis para o crescimento.

Os peixes regulam o consumo de ração pela ingestão energética. Uma ração deficiente em energia provocará maior ingestão alimentar, e, na falta de nutrientes energéticos (carboidratos e lipídeos), a proteína será convertida em energia para manutenção, antes de ser utilizada para crescimento. Por outro lado, uma ração com excesso de energia limita a ingestão de alimento e conseqüentemente diminui a ingestão de proteína (aminoácidos), vitaminas e minerais (Sperandio, 2008).

Altos níveis de proteínas nos alimentos resultam em um aumento nas concentrações de aminoácidos livres circulantes, na excreção de amônia, na síntese protéica, na atividade de enzimas gliconeogênicas e provocam o declínio das atividades das enzimas glicolíticas (Almeida, 2006). As vitaminas, que são compostos essenciais ao crescimento e metabolismo animal, não são sintetizadas em quantidades suficientes, sendo exigidas em quantidades variáveis a partir das dietas para a manutenção das funções fisiológicas normais. Deficiências de vitaminas podem gerar alterações morfológicas e fisiológicas nos peixes, geralmente pouco específicas, como a redução de apetite, menor taxa de crescimento, anemia, letargia, pigmentação anormal e maior suscetibilidade a doenças (Almeida, 2003). A ausência de vitamina C, em particular, na dieta de peixes pode ocasionar, inclusive, más formações ósseas, causando danos severos à saúde e bem estar do animal (Sttefens, 1989).

A avaliação da sanidade pode indicar se as condições nutricionais estão adequadas ao bom desenvolvimento fisiológico dos animais. A qualidade e a quantidade de alimentos têm efeitos significantes sobre a fisiologia, interferindo nas variáveis hematológicas, e isso ocorre principalmente em peixes mantidos em cativeiro (Fagbenro, *et al.*, 2000; Tavares-Dias & Moraes, 2004).

As características bioquímicas, metabólicas e hematológicas podem ser utilizadas na avaliação do estresse causado por mudanças ambientais. Desta forma, a análise do quadro

hematológico pode ser utilizada como diagnóstico auxiliar para detectar variações produzidas por agentes estressantes em peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Além dos parâmetros sanguíneos, a determinação de atividades enzimáticas em outros tecidos pode ser realizada com o propósito de avaliar o estado fisiológico do animal como um todo, assim como a sua resposta adaptativa em função das variações metabólicas impostas, quer seja por estresse ambiental e/ou confinamento, ou nutricional, em função do arraçoamento ou disponibilidade de alimento (Lundsteadt, 2003).

A análise das atividades de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD), que catalisam a redução das espécies reativas do oxigênio (ERO) no meio intracelular (Scandalios, 2005), pode ser usada como indicador para avaliar o estresse oxidativo causado por diferentes condições nutricionais (Pascual *et al.*, 2003).

Os efeitos estressantes que algumas substâncias provocam no metabolismo animal incluem, também, mudanças na expressão gênica e tais mudanças são geralmente produzidas pela alteração nos níveis normais do RNA mensageiro (mRNA) desses genes. O caminho tradicional para analisar essas mudanças tem sido o uso de técnicas de hibridização diferencial para mRNA, que é unicamente expresso ou suprimido nos tratamentos ou doenças celulares. Entre os métodos mais usados está a técnica da expressão diferencial de genes (“Differential Display PCR”- DD-PCR) (Rhodes & Van Beneden, 1996).

A técnica do DD-PCR tem sido usada com sucesso para detectar mudanças nos níveis de mRNA provocadas por diferentes níveis de estresse, tais como os provocados por agentes tóxicos (Rhodes & Van Beneden, 1996), por exposição crônica ao manejo estressante (Picard & Schulte, 2003), por aumento de densidade populacional em piscicultura (Gornati *et al.*, 2004). Também pode ser usada para detectar genes que têm sua expressão modificada em resposta às alterações nos níveis de componentes básicos da dieta

de peixes, assim como a presença de agentes prejudiciais ao metabolismo desses animais nas rações formuladas com alimentos alternativos.

A espécie animal e os frutos

O peixe

Colossoma macropomum (tambaqui) é uma espécie que pertence à família Serrasalminidae, encontrada nos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes (Goulding, 1980). No meio natural pode alcançar de 90 a 100 cm de comprimento e peso máximo de aproximadamente 30 Kg (Araújo-Lima & Goulding, 1998) e, em condições adequadas de cultivo em climas quentes, podem atingir até 1,4 Kg em um ano (IBAMA, 1989).

É uma espécie rústica e tolera baixos teores de oxigênio dissolvido na água, apresentando adaptações morfo-anatômicas destinadas a capturar o oxigênio disponível na camada d'água superficial (Val & Almeida-Val, 1995), porém sua maior limitação consiste na baixa tolerância ao frio e a mudanças bruscas de temperatura; com a temperatura da água abaixo de 20°C seu crescimento é irrisório, ocorrendo mortalidade aos 15°C (IBAMA, 1989).

Silva (1996) descreve o tambaqui (*C. macropomum*) como tipicamente onívoro, aproveitando-se de nutrientes dos alimentos de origem vegetal e animal. A alimentação básica da espécie sofre variações sazonais: produtos alóctones no período de inundação da floresta, principalmente frutos e sementes e produtos de origem autóctone, no período da seca. O padrão de consumo dos frutos e sementes pelo tambaqui é muito variável, sendo encontrado no trato digestivo de um mesmo espécime frutos inteiros e/ou triturados, pedaços de mesocarpo e sementes inteiras e/ou trituradas.

Essa espécie é considerada dispersora de várias espécies vegetais tais como os frutos de embaúba (*Cecropia latiloba*) e cacinguba (*Ficus* sp.) que passam intactos pelo trato

gastrointestinal sem, apresentar indícios de aproveitamento dos nutrientes neles contidos (Silva, 1996).

Embora se alimente de várias espécies de frutos, o tambaqui apresenta característica oportunista. Silva (1996) demonstrou a ocorrência de grandes quantidades de apenas um fruto ou semente, principalmente o jauari (*Astrocarium jauari*) e a seringa-barriguda (*Hevea spruceana*) no conteúdo estomacal dos peixes que analisou. Mesquita-Saad (2001) analisou o conteúdo de vitamina C no músculo de tambaquis coletados em diferentes períodos do ano e descreveu um aumento de vitamina C em animais cujo conteúdo estomacal era predominantemente composto por frutos.

É uma espécie com excelente potencial para cultivo, já que apresenta um bom crescimento, hábito gregário, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e excelente capacidade de aproveitamento de vários tipos de alimentos disponíveis nos viveiros (Saint Paul, 1986). Tem alto valor comercial e é muito apreciada pelo consumidor da região amazônica.

A sobre-exploração dos estoques na Amazônia Central levou o IBAMA a colocar o tambaqui na lista de espécies protegidas durante o período de defeso (período de piracema ou reprodução natural) para ajudar na recuperação do estoque (Graef, 1995).

Os frutos

Os frutos e as sementes utilizados neste trabalho são os mesmos definidos no projeto “Frutos da Amazônia na Alimentação de Peixes”, Edital MCT/CNPq/SEAP-PR/CT-Agronegócio 02/2003, coordenado pelo Dr. Adalberto Luís Val, os quais foram selecionados com base na preferência alimentar e teor de vitamina-C, antioxidante importante na proteção de animais sob estresse, o que já vem sendo comprovado por diversos estudos realizados pelo grupo (Chagas, 2001; Mesquita-Saad, 2001).

São eles: camu-camu (*Myrciaria dúbia* - Myrtaceae), catoré (*Crataeva bentharii* - Capparidaceae), embaúba (*Cecropia latiloba* – Cecropiaceae), jauari (*Astrocarium jauari* - Arecaceae) e munguba (*Pseudobombax munguba* - Bombacaceae).

- Camu-camu (*Myrciaria dúbia* - Myrtaceae)

O camu-camu é uma espécie de porte arbustivo, que pode ser encontrada nas margens dos rios e lagos da bacia amazônica (Villachica, 1996). A frutificação tem maior intensidade nos meses de maio a julho (Maués & Couturier, 2002). O fruto é formado por uma baga esférica, lisa e brilhante, de coloração vermelho-arroxeadada, com alto teor de ácido ascórbico (Villachica, 1996). A dispersão das sementes é endozoocórica, feita principalmente por peixes como o tambaqui e pela própria correnteza dos cursos dos rios (Maués & Couturier, 2002).

É uma árvore com grande produtividade; *Myrciaria dubia* com *stand* de 8.714 árvores/ha produz entre 9.500 e 12.600 Kg de frutos por ha/ano (Waldhoff & Maia, 2000). Os frutos apresentam alto teor de ácido ascórbico, cerca de 2.800 mg. 100g⁻¹, o que faz com que haja um mercado promissor para o camu-camu no país e no exterior (Maués & Couturier, 2002).

- Catoré (*Crataeva benthamii* - Cappariaceae)

O fruto, também apreciado pelos tambaquis (Silva, 1977), é uma baga globosa com semente dura e lenhosa, que contém 12,9% de óleo viscoso e amarelo de aroma fortemente desagradável (Correa, 1984). É encontrada nas várzeas da região amazônica (Correa, 1984).

O período de frutificação inicia-se em outubro e os frutos amadurecem nos meses de abril a junho. É uma árvore com alta produtividade de frutos em áreas de várzea, com produção média de 2.362 Kg/ha (Waldhoff & Maia, 2000).

Seus frutos são consumidos por peixes como o bacu (*Lithodoras* sp.), matrinxã (*Brycon cephalus*), pacu (*Metynnis* sp., *Mylesinus* sp., *Myleus* sp., *Mylossoma* sp.), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), sardinha (*Triportheus elongotus*, *Triportheus* sp.) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Maia, 2001).

- Embaúba (*Cecropia* sp – Cecropiaceae)

A embaúba tem distribuição geográfica ao longo das florestas inundáveis pelos rios de água-branca na Amazônia brasileira, Peru, Colômbia, Venezuela e Guianas (Parolim, 2002). Floresce no início do período de cheia, de fevereiro a abril. Os frutos estão presentes de março a julho, porém a maturação ocorre no final do período das águas, em julho e agosto (Parolim, 2002). Quando maduros, frutos inteiros ou partes de frutos com sementes que caem nos rios são dispersos pela água e pelos peixes, particularmente por *Brycon* sp. (matrinchá), *Cichlasoma* sp. (cará), *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Lithodoras dorsalis* (bacú-pedra), *Mylossoma* sp (pacu), e *Triportheus* sp. (sardinha) (Goulding, 1980; Roubach, 1991).

- Jauari (*Astrocarium jauari* - Arecaceae)

O jauari é uma palmeira nativa da margem dos grandes rios da Amazônia Ocidental brasileira (Lorenzi & Mello Filho, 2001). Floresce de julho a dezembro e frutifica de setembro a julho, sendo o pico de frutificação entre abril e junho (Maia, 2001).

Os frutos são globosos, lisos, de 2,5-3,5 cm de diâmetro, de cor amarela ou alaranjada quando maduros (Lorenzi, 1996; Lorenzi, & Mello Filho, 2001) e servem de isca para pescaria, mas não são comestíveis pelo homem (Correa, 1984).

A produção anual de frutos chega a 1,7 toneladas ano/ha nas florestas inundadas da Amazônia (Waldhoff *et al*, 1996) e são muito consumidos por tambaquis (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Silva *et al*, 2000; Waldhoff & Maia, 2000).

- Munguba (*Pseudobombax munguba* - Bombacaceae)

O fruto conhecido como munguba é formado por uma cápsula de 13cm de comprimento por 6-8 cm de diâmetro, de formato elíptico, apresentando sementes globosas, envolvidas por uma paina amarelo-escura. É encontrada nos terrenos argilosos, periodicamente inundáveis, no estado do Amazonas, sobretudo na região do Baixo Amazonas, e no Pará (Loureiro & Silva, 1968). Floresce de abril a junho e frutifica entre maio e agosto (Maia, 2001).

OBJETIVO

Embora estudos realizados nas últimas décadas considerem o potencial de uso dos frutos e sementes como fonte de alimento na piscicultura intensiva na Amazônia de peixes como o tambaqui (Pereira-Filho, 1995; Silva, 1996; Araújo-Lima & Goulding, 1998) é preciso considerar que a presença de fatores anti-nutricionais pode limitar a inclusão de alguns produtos de origem vegetal em sua dietas (Francis *et al.*, 2001).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar, em nível fisiológico e molecular, os efeitos da incorporação de cinco frutos e sementes encontrados em florestas inundadas da Amazônia, na alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Averiguar as possíveis mudanças fisiológicas e bioquímicas de tambaquis (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementadas com os cinco frutos e sementes de florestas inundadas da Amazônia.
- ✓ Verificar a ocorrência de quebras do material genético presente no núcleo das células sanguíneas de tambaquis alimentados com as rações suplementadas com os frutos e sementes de florestas inundadas da Amazônia.
- ✓ Verificar as possíveis mudanças na expressão gênica causadas pela incorporação dos frutos e sementes na alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*).
- ✓ Sequenciar e identificar os genes de tambaqui (*Colossoma macropomum*) que tiveram a expressão modificada pela incorporação dos frutos e sementes em sua alimentação.

HIPÓTESE

Este trabalho tem as seguintes hipóteses:

H0 – As mudanças na expressão gênica em peixes alimentados com rações suplementadas com os frutos e sementes descritos neste trabalho não estão relacionadas a genes de desintoxicação ou antioxidantes.

H1 - As mudanças na expressão gênica em peixes alimentados com rações suplementadas com os frutos e sementes descritos neste trabalho estão relacionadas a genes de desintoxicação ou antioxidantes.

CAPÍTULO I

PERFIL HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E CITOGENOTÓXICO DE TAMBAQUIS (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADAS COM FRUTOS E SEMENTES DA AMAZÔNIA.

RESUMO

A introdução de frutos e sementes regionais na formulação de rações para peixes é uma alternativa viável para baratear custos da produção, proporcionando um crescimento satisfatório dos animais. Porém, a presença de fatores antinutricionais pode limitar a inclusão de certos produtos vegetais na dieta desses peixes. Este trabalho teve como objetivo analisar o perfil hematológico, enzimático e citogenotóxico de tambaquis (*Colossoma macropomum*) alimentados com rações suplementadas com cinco diferentes frutos e sementes da floresta Amazônica, submetidos a um período posterior de privação alimentar. Os resultados demonstraram que os frutos camu-camu (*Myrciaria dúbia*), catoré (*Crataeva benthamii*), embaúba (*Cecropia latiloba*), munguba (*Pseudobombax munguba*) e jauari (*Astrocarium jauari*) não provocaram alterações metabólicas, enzimáticas e citogenotóxicas nos peixes, durante os períodos de alimentação testados. Entretanto, foi possível verificar diferenças significativas sobre esses parâmetros em função do período de alimentação e da privação alimentar a qual os peixes foram submetidos.

HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND CYTOGENOTOXIC PROFILE
OF TAMBQUI (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) FED WITH
SUPPLEMENTED RATIONS OF AMAZONIAN FRUITS AND SEED.

ABSTRACT

The introduction of regional fruits and seeds in the formulation of rations for fish is a viable alternative to reduce costs of production providing satisfactory animal growth rate. However, the presence of non nutritional factors can limit the inclusion of some vegetable products in fish diets. This work analyzed the hematological, enzymatic and cytogenotoxic profile of tambquis (*Colossoma macropomum*) fed with supplemented rations with five different Amazonian fruits and seeds, submitted to a posterior periods of food deprivation. At the end of the experiments we could observe that camu-camu (*Myrciaria dubia*), catoré (*Crataeva benthamii*), embaúba (*Cecropia latiloba*), munguba (*Pseudobombax munguba*) and jauari (*Astrocarium jauari*) fruits did not affect metabolic, enzymatic and cytogenotoxic alterations in the fishes, during the tested feeding periods. However, we could detect significant differences on these parameters in feeding period and food deprivation to which fishes were submitted.

INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é o maior peixe characiforme da Bacia Amazônica, alcançando porte máximo de 100 cm e até 30 Kg de peso, com ampla distribuição na América do Sul (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Na natureza, tem hábito alimentar onívoro, porém sua alimentação sofre variações sazonais e no período da cheia passa a se alimentar exclusivamente de frutos e sementes (Silva, 1996). Mais de 100 espécies de árvores produzem frutos e sementes consumidos pelo tambaqui durante a enchente dos rios (Silva *et al.*, 2003).

É uma das espécies que possui alto valor comercial e grande importância econômica e social na Amazônia, destacando-se por ser um peixe apropriado para aqüicultura, pois se adapta ao confinamento e arraçoamento. Entretanto, nos atuais modelos de cultivo adotados, os custos com alimentação são relativamente altos, representando o maior percentual dos custos operacionais (Silva *et. al*, 2007) e o maior obstáculo para sua criação.

Uma das alternativas para baratear custos de criação do tambaqui seria o uso de ingredientes regionais introduzidos nas formulações das rações (Pereira-Filho, 1995) e para isso, as dietas artificiais devem ser formuladas com base em estudos sobre a alimentação natural da espécie, já que estes revelam as exigências nutricionais no ambiente natural, sugerindo assim quais nutrientes devem ser incorporados em sua dieta na piscicultura (Goulding, 1993; Pereira-Filho, 1995).

A adição de produtos de origem vegetal em substituição a ingredientes da ração já é uma prática que vem sendo estudada (Silva, 1996; Mori-Pinedo, 1999), indicando que a suplementação de frutos regionais na ração de peixes pode apresentar resultados satisfatórios de crescimento (Roubach, 1991; Mori-Pinedo, 1993; Oliveira, 2005). Porém, a presença de fatores anti-nutricionais pode limitar a inclusão de alguns produtos vegetais em dietas, além

das proteínas de origem vegetal serem geralmente deficientes em determinados aminoácidos essenciais (Francis *et al.*, 2001).

Em estudo de nutrição não basta apenas o conhecimento dos itens que o animal consome, nem dos teores de nutrientes e energia, mas é necessário que se tenha a idéia dos níveis de aproveitamento pela espécie (Silva *et al.*, 2003) e seus efeitos metabólicos, para que se possa subsidiar com informações mais precisas a elaboração de dietas que efetivamente proporcionem o máximo aproveitamento nutricional.

O estado nutricional dos peixes é o que determina seu crescimento e sua resposta a diferentes modificações ambientais (Baldisseroto, 2004) e o estresse é o principal indicador para se avaliar o bem estar animal (Moberg, 2000), já que demonstra os ajustes fisiológicos desenvolvido pelos animais quando sua homeostase está ameaçada em função dos aspectos adversos de manejo, alimentação ou mudanças ambientais. Entre os fatores estressantes mais estudados para peixes estão a hipóxia, a temperatura, a velocidade crítica de natação e também a privação alimentar (Carvalho, 1998; Adhan *et al.*, 2000; Chagas, 2001; Oliveira *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2002; MacFarlane *et al.*, 2004).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil hematológico, enzimático e citogenotóxico do tambaqui alimentado com rações suplementadas com cinco diferentes frutos e sementes da floresta Amazônica, submetidos a posterior período de privação alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DOS PEIXES

Alevinos de tambaqui provenientes da piscicultura da fazenda Santo Antônio, localizada no município de Rio Preto da Eva – AM, foram transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, onde foram aclimatados em tanques com capacidade de 500 L, com aeração constante e renovação de água até atingirem o tamanho médio de 10 cm . Durante este período os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial com 36% de proteína bruta até a saciedade aparente.

COLETA E ARMAZENAMENTO DOS FRUTOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os frutos camu-camu (*Myrciaria dúbia*), catoré (*Crataeva benthamii*), embaúba (*Cecropia latiloba*), munguba (*Pseudobombax munguba*) e jauari (*Astrocarium jauari*).

Os frutos catoré, embaúba e jauari foram coletados manualmente no Lago do Catalão – AM, situado a 3° 09' 47" S e 059° 54' 29" W, pela bolsista de DTI do LEEM/INPA, MSc Alzira M. de Oliveira, armazenados em sacos plásticos previamente identificados, mantidos no gelo e transportados para o laboratório. As sementes de munguba, já processadas para a retirada da paina, foram doadas pelo Laboratório de Nutrição de Peixes da Coordenação de Pesquisa em Aqüicultura - CPAQ/INPA. Os frutos camu-camu foram adquiridos comercialmente. Todos os frutos e sementes foram armazenados em sacos plásticos e mantidos em freezer -20°C até o momento da elaboração das rações.

ELABORAÇÃO DAS RAÇÕES

Os frutos inteiros de embaúba, camu-camu, catoré e a polpa do jauari foram cortados e moídos em moedor de carne elétrico. As sementes de munguba foram apenas moídas. Em seguida, cada produto da moagem foi misturado individualmente com ração comercial (36% de proteína) previamente moída, na proporção de 1:1 (produto de fruto:ração) Cada mistura foi repeletizada e colocada para secar em estufa a 55°C durante 12 horas. Após este período a ração foi armazenada em sacos plásticos, em pequenas porções etiquetadas e mantidas congeladas em freezer -20°C. A composição centesimal dos frutos e da semente é mostrada na Tabela 1.

Para a ração controle, a ração comercial (36% de proteína) foi moída, repeletizada e seca em estufa nas mesmas condições realizadas para as rações experimentais. A bromatologia das rações experimentais e da ração controle é mostrada na Tabela 2.

Tabela 1. Composição centesimal (% da MS) e valor energético (EB KJg MS) dos frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*C. macropomum*).

Nome vulgar/Espécie	Umidade	PB	EE	EEN	FB	MM	EB
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(kJ/g)
Camu-camu (<i>Myrciaria dúbia</i>)	91,7	3,9	7,2	55,5	20,4	1,9	16,0
Catoré (<i>Crataeva benthamii</i>)	63,2	8,6	6,1	45,5	31,4	5,3	18,3
Embaúba (<i>Cecropia latloba</i>)	75,0	10,7	10,5	39,6	28,5	4,2	20,4
Jauari (<i>Astrocarium jauari</i>)	46,6	5,1	11,0	45,6	32,5	2,4	20,3
Munguba (<i>Pseudobombax munguba</i>)	60,0	29,9	34,7	15,8	8,6	5,1	23,0

MS – Materia Seca; PB – Proteína Bruta; EE – Extrato Etéreo; EEN – Extrativo não nitrogenado; FB – Fibra Bruta; MM – Material Mineral ; EB –Energia Bruta. Fonte: Silva *et. al* (2000)

Tabela 2. Composição centesimal (% da MS) das rações controle e experimentais utilizadas neste trabalho

Tratamento	Umidade(%)	PB (%)	EE (%)	MM(%)	ENN+FB(%)
Controle	8,2	34,1	3	12	42,7
Camu-camu	5,8	36,3	5,6	9,7	42,6
Catoré	10,2	26,9	3,3	10,7	48,9
Embaúba	7,3	27,1	3,5	11,7	50,4
Jauari	7,7	25,9	3,7	10,9	51,8
Munguba	6	29,3	8,5	11,4	44,8

MS – Materia Seca; PB – Proteína Bruta; EE – Extrato Etéreo; EEN – Extrato não nitrogenado; FB – Fibra Bruta; MM – Material Mineral . Análise realizada pelo Laboratório de Nutrição de Peixes – CPAQ/INPA

DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 240 juvenis de tambaquis com peso médio de $57,1 \pm 2,8$ g e comprimento padrão médio de $11,9 \pm 0,2$ cm.

Os juvenis de tambaquis foram distribuídos em 24 aquários de 310 L, preenchidos com 80 L de água, providos de aeração e renovação de água constantes. Foi usado delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 6, constituído por 3 períodos de alimentação (1, 15 e 30 dias) e 6 tratamentos, sendo um controle e cinco diferentes frutos da Amazônia misturados na proporção de 1:1 a uma ração comercial, com quatro repetições cada, totalizando 24 unidades experimentais, onde cada unidade experimental foi composta por um aquário com 10 juvenis. A fase de adaptação durou duas semanas e nesse período os peixes foram alimentados com a dieta controle, fornecidas duas vezes ao dia *ad libitum* .

O experimento teve a duração de 30 dias. Neste período os peixes foram alimentados com as rações experimentais (grupo tratamentos) e com a ração controle (grupo controle), duas vezes ao dia *ad libitum*. Durante o período experimental foi retirado um peixe de cada

aquário após o 1° dia, 15° dia e 30° dia de alimentação. Esses animais foram anestesiados, medidos e pesados e levados para a coleta de sangue e tecido.

A retirada de peixes durante todos os períodos experimentais foram aleatórias. Os peixes capturados não foram escolhidos e eram retirados ao acaso, independente do tamanho, peso ou velocidade de natação

Após a realização do experimento, os peixes que permaneceram nas unidades experimentais, foram submetidos a um período de 21 dias de privação alimentar. Em seguida, um peixe de cada unidade experimental foi anestesiado, medido e pesado, e levado para a coleta de sangue e tecido.

De cada animal utilizado nesse experimento, foi retirado sangue, por punção da veia caudal com seringas heparinizadas e o fígado, que foi acondicionado em tubos *ependorf*® estéreis, colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

Os parâmetros de qualidade de água como temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram monitorados diariamente. Os valores de temperatura e oxigênio dissolvido foram obtidos com o termo-oxímetro YSI modelo 55/12 FT e o pH através de um pHmetro Micronal B374.

ANÁLISE DE CRESCIMENTO

As medidas de peso e comprimento padrão foram realizadas em todos os exemplares de tambaqui (*C. macropomum*) no início do experimento, em balança semi-analítica com precisão de 0,01g e ictiômetro com precisão de 1 mm . Ao final do período experimental os peixes retirados das unidades experimentais foram também pesados e medidos.

Com os dados de peso inicial (obtidos no início do experimento) e de peso final (obtidos após 30 dias de alimentação) foram calculados os seguintes bio-índices:

Ganho de Peso (g) = (peso final – peso inicial)

Crescimento Específico= (ln do peso final – ln do peso inicial/tempo de alimentação)x100

Incremento de Peso (%) = 100 x (peso final – peso inicial)/peso inicial

Eficiência de Crescimento= (peso final – peso inicial)/peso seco do alimento consumido

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para as análises hematológicas, os peixes foram anestesiados com MS 222 e as amostras de sangue coletadas por punção da veia caudal com seringas previamente heparinizadas. Para a separação do plasma, o sangue foi transferido para tubos *ependorf*®, mantidos no gelo e centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos.

Para evitar possíveis interferências da luminosidade no sangue utilizado para a confecção das lâminas do Teste Cometa, todo o processo de coleta de sangue foi realizado sem iluminação direta.

1. HEMATÓCRITO (Ht)

A porcentagem de células vermelhas do sangue foi determinada pela técnica de centrifugação do microhematócrito (Collier, 1944). As amostras de sangue foram transferidas de seringas heparinizadas para os tubos de microhematócritos selados com fogo e centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos (centrífuga FANEM 211). As leituras dos valores de hematócrito foram realizadas em cartão de leitura de hematócrito da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas e os valores expressos em %.

2. CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA ([HB])

A concentração de Hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (Kampen & Zijlstra, 1964) que consiste na diluição de 10µl de sangue em 2ml da solução de Drabkin (KCN 0,5g; KH₂PO₄ 14g; K₃[Fe(CN)₆] 2,0 g em 1000ml de água destilada). Após a diluição, os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos, para a efetivação da hemólise.

A absorvância das amostras foi determinada em comprimento de onda de 540nm, em um espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Instruments Inc.), utilizando a solução de Drabkin como “branco”. Os valores da concentração de hemoglobina, expressos em g/dL, foram obtidos por meio da seguinte fórmula:

$$[\text{Hb}] \text{ (g/dL)} = \text{ABS (540nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra}$$

Onde: ABS (540nm) = valor da leitura na absorvância de 540nm

0,146 = fator de correção

3. CONTAGEM DE ERITRÓCITOS CIRCULANTES (RBC)

Para se determinar o número de células vermelhas (RBC), o sangue foi diluído em solução de formol citrato (3,8 g de citrato de sódio; 2,0ml de formol 40% e água destilada q.s.p. 100ml), na proporção de 1:200 (v/v). A contagem de eritrócitos foi realizada na câmara de Neubauer em objetiva de 40X de um microscópio óptico Motic B5 Professional. Os resultados estão apresentados em números de eritrócitos/mm³.

4. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CORPUSCULARES

As constantes corpusculares foram calculadas de acordo com as fórmulas estabelecidas por Brow (1976), que levam em consideração o valor do hematócrito, a concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos circulantes, conforme descrito abaixo:

a) **Volume corpuscular médio (VCM - μm³)** = Ht x 10/RBC;

b) **Hemoglobina corpuscular média (HCM - μg)** = [Hb] x 10/RBC;

c) **Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM - %)** = [Hb] x 100/Ht.

5. CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A concentração de glicose foi determinada por meio de medidor eletrônico de glicose sanguínea (Accu-Chek Advantage II). Onde, 10 μL de sangue foram aplicados na fita de leitura de glicose, que foi inserida no aparelho. Análise eletroquímica realizada na amostra forneceu o valor da concentração da glicose em g/dL .

ANÁLISE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

1. PREPARAÇÃO DOS HOMOGENADOS

Para a avaliação das atividades enzimáticas foi preparado um homogenado do fígado com tampão de homogenização (TRIS 20mM, EDTA 1mM, DDT 1mM, Sacarose 0,5 M, KCl 0,15M e PMSF 0,1mM) numa proporção de 1:4 (tecido: tampão), utilizando um homogenizador Tissue Tearor (modelo 9985370). O homogeneizado foi centrifugado durante 20 minutos a 10.000 x g em uma centrífuga refrigerada modelo MPW-350R (MPW – Med. Instruments a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi separado para a análise de atividade enzimática e de proteínas.

2. ATIVIDADE DA CATALASE

Para determinar atividade da catalase, 10 μL do homogenado foi diluído em 990 μL de tampão TE (TRIS HCl 1M e EDTA mM) com peróxido de hidrogênio 10mM, homogeneizado por inversão e lido em espectrofotômetro Spectronic Gênesis 2, em comprimento de onda de 240 nm. Como a atividade da catalase é medida por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio, foram realizadas leituras nos tempos 0 e 15 segundos e os resultados expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹.

$$K_m = 2,3$$

$$\Delta t = 15 \text{ segundos}$$

3. ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com o método cinético descrito por Habig et al. (1974), que utiliza tampão fosfato (pH 7,0), 1mM de GST e 1mM de CDNB (1-cloro-2, 4- dinitrobenzeno). O aumento linear da absorvância a 340 nm foi monitorado e a atividade foi expressa em $\mu\text{moles de conjugado GSH-CDNB produzido por minuto por mg de proteína } (\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de proteína}^{-1})$ usando-se o coeficiente de extinção de 9,6 mmolar/cm. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro Spectronic Gênesis 2.

4. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais foi determinada usando o Kit comercial Doles. Para isso, 2,5 mL do reagente de biureto foram misturados a 50 μL de homogenado. Para a solução padrão, 2,5mL de reagente de biureto foram misturados a 50 μL de padrão (Kit). As soluções foram homogenadas e deixadas em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram lidas em um espectrofotômetro Spectronic Gênesis 2, em comprimento de onda de 550nm e os resultados expressos em g/dL.

$$\text{Cálculo do fator} = \frac{4}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Concentração de proteínas totais} = \text{Absorbância da amostra} \times \text{fator}$$

EFEITO CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS

1. CONCENTRAÇÃO DOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE PRODUTOS CELULARES OXIDADOS (TBARS)

A concentração dos níveis endógenos de produtos celulares oxidados foi determinada através do método descrito por Ohkawa (1979), onde 100 μL de plasma foram

diluídos em 0,89 mL de tampão Tris-HCl 60mM, pH 7,4; 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30% e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%. As amostras foram agitadas e colocadas em banho-maria (100° C) por uma hora, resfriadas, centrifugadas e lidas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 535nm. A concentração dos produtos celulares foi expressa em nmoles/mL de plasma.

2. ANORMALIDADES NUCLEARES ERITROCÍTICAS (ANE)

Para a detecção das anormalidades nucleares eritrocíticas foi feito um esfregaço com sangue e as lâminas foram deixadas para secar por 24 horas. Em seguida, as preparações foram coradas com solução May-Grünwald por dois minutos e com solução May-Grünwald e água destilada na proporção 1:1 por 10 minutos. Após esse período, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa e água destilada na proporção de 1:6 durante 10 minutos, lavadas e secas em temperatura ambiente. Foram contadas 1000 células por lâmina, com auxílio de um microscópio óptico Motic B5 Professional, sendo consideradas as seguintes lesões nucleares: micronúcleo (M), núcleo lobado (L), núcleo segmentado (S) e núcleo em forma de rim (K). Os resultados para a detecção foram dados como uma média (%) das somas (M+L+S+K) de todas as lesões observadas.

3. TESTE COMETA

Para a análise do teste cometa, aproximadamente 10 µl de sangue foram misturados em 95µl de agarose “low melting point” (LMP). Essa mistura foi colocada em lâmina de vidro com cobertura de agarose normal a 1%. Depois da solidificação em geladeira, as lâminas foram colocadas em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) por no mínimo 2 horas. As lâminas foram então incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1

mM EDTA, pH >13) por 20 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por mais 15 minutos a 25 volts e 300 mA e a alcalinidade foi neutralizada com 0,4 M Tris (pH 7,5). As lâminas foram coradas com solução de nitrato de Prata. Foram analisadas 100 células por lâmina, onde as células foram classificadas visualmente em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda: sem danos – classe 0; até danos máximos – classe 4. Assim, o Índice de Danos de cada grupo estudado variou de zero (100X0; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100X4; 100 células observadas com dano máximo).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos em média \pm erro padrão. Os resultados foram analisados estatisticamente por Análise de Variância.

As médias de cada tratamento foram comparadas com o controle em cada período de alimentação testado e na privação alimentar, por Análise de Variância one-way. As médias entre os três períodos de alimentação foram comparadas por Análise de Variância two-way, assim como as médias do período de 30 dias de alimentação e da privação alimentar. Quando ocorreu diferença significativa (5%) entre os tratamentos e o grupo controle, foi aplicado o teste de Tukey.

A média de cada tratamento do período de 30 dias de alimentação foi comparada com a média do mesmo tratamento no período de privação alimentar através do Teste T.

RESULTADOS

VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

Na Tabela 3 estão descritos os valores médios das variáveis físico-químicas da água nas unidades experimentais. A temperatura manteve-se em $27,44 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$, o oxigênio dissolvido em $6,11 \pm 0,06$ mg/L e o pH em $5,79 \pm 0,02$.

Tabela 3. Valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH medidos durante o período experimental.

Variáveis	Controle	Camu- Camu	Catoré	Embaúba	Jauari	Munguba
Temperatura (°C)	27,48±0,12	27,42±0,14	27,41±0,12	27,44±0,14	27,50±0,13	27,40±0,13
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	6,10 ± 0,14	6,11±0,2	6,28±0,10	5,90±0,17	6,30±0,152	5,99± 0,14
Ph	5,69±0,02	5,87±0,08	5,88±0,06	5,74±0,06	5,62±0,03	5,93±0,08

Os valores estão expressos como média±SEM

ANÁLISE DE CRESCIMENTO

A inclusão de frutos em substituição a 50% da ração comercial na dieta dos tambaquis não promoveu alterações significativas nos índices de desempenho zootécnico referidos como ganho de peso, taxa de crescimento específico, incremento de peso e eficiência de crescimento, conforme demonstrado na Tabela 4.

Numericamente, os melhores índices zootécnicos foram obtidos com a ração comercial, seguido das rações suplementadas com embaúba e munguba. Os altos valores de erro padrão na ração controle e no tratamento com ração suplementada com jauari mostram diferenças de ganho de peso e de incremento de peso nas réplicas destes tratamentos.

Tabela 4. Dados dos índices de desempenho de tambaquis (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia.

Índices	Controle	Camu-Camu	Catoré	Embaúba	Jauari	Munguba
Comprimento Inicial (cm)	11,4 ± 0,2	12,2 ± 0,1	11,7 ± 0,3	11,8 ± 0,2	12,2 ± 0,2	12,4 ± 0,2
Comprimento final (cm)	13,3 ± 0,3	13,0 ± 0,1	13,1 ± 0,4	13,4 ± 0,4	13,0 ± 0,2	13,0 ± 0,7
Peso Inicial (g)	50,6 ± 5,51	60,9 ± 1,8	53,6 ± 2,0	55,7 ± 3,7	60,1 ± 6,0	60,9 ± 1,8
Peso Final (g)	72,2 ± 3,9	72,1 ± 4,2	62,6 ± 2,7	69,6 ± 2,9	70,3 ± 3,7	71,6 ± 4,3
Ganho de Peso (g)	21,6 ± 5,0	8,1 ± 3,2	9,7 ± 3,0	19,5 ± 2,1	10,9 ± 5,6	15,3 ± 2,1
Taxa de Crescimento Específico	1,3 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1
Incremento de Peso (%)	46,69 ± 14,5	18,41 ± 2,12	18,74 ± 6,50	37,35 ± 4,00	21,23 ± 12,5	24,80 ± 4,10
Eficiência de crescimento	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,06	0,09 ± 0,01

Os valores estão expressos como média ± SEM

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os juvenis de tambaquis alimentados com ração suplementada com camu-camu, catoré, embaúba, jauari e munguba, não apresentaram alterações nos parâmetros sanguíneos hematócrito, hemoglobina e RBC quando comparados com os peixes alimentados com a ração controle. Entretanto, os níveis de hemoglobina medidos após o primeiro dia de alimentação foram significativamente ($P \leq 0,05$) menores que as médias encontradas nos períodos de 15 dias e 30 dias de alimentação, para todos os tratamentos (Figura 2A).

Para o período de privação alimentar ocorreu queda significativa ($P \leq 0,05$) nos níveis de hematócrito, hemoglobina e RBC dos tambaquis, quando comparados aos animais alimentados pelo período de 30 dias para todas as dietas testadas (Figuras 1B, 2B e 3B).

Os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), calculados a partir dos índices hematológicos, são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Os

valores médios de HCM e CHCM após o primeiro dia de alimentação diferiram significativamente ($P \leq 0,05$) das médias apresentadas pelos animais alimentados por 15 dias e 30 dias em todos os tratamentos (Tabela 5).

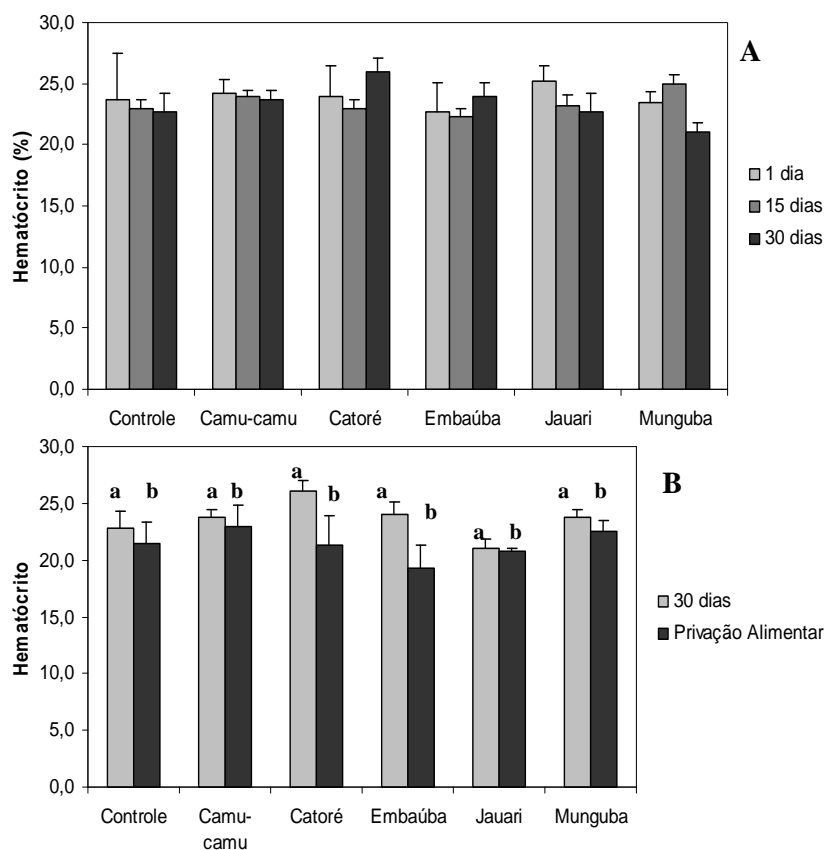


Figura 1. Valores de hematócrito de *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias de hematócrito em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação alimentar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Os animais que receberam ração suplementada com catoré por 30 dias e os submetidos a posterior privação alimentar apresentaram índices médios de VCM significativamente ($P \leq 0,05$) maiores que os animais que receberam ração controle (Tabela 6). Os níveis de VCM, HCM e CHCM não diferiram estatisticamente nos animais alimentados por 30 dias e submetidos à privação alimentar.

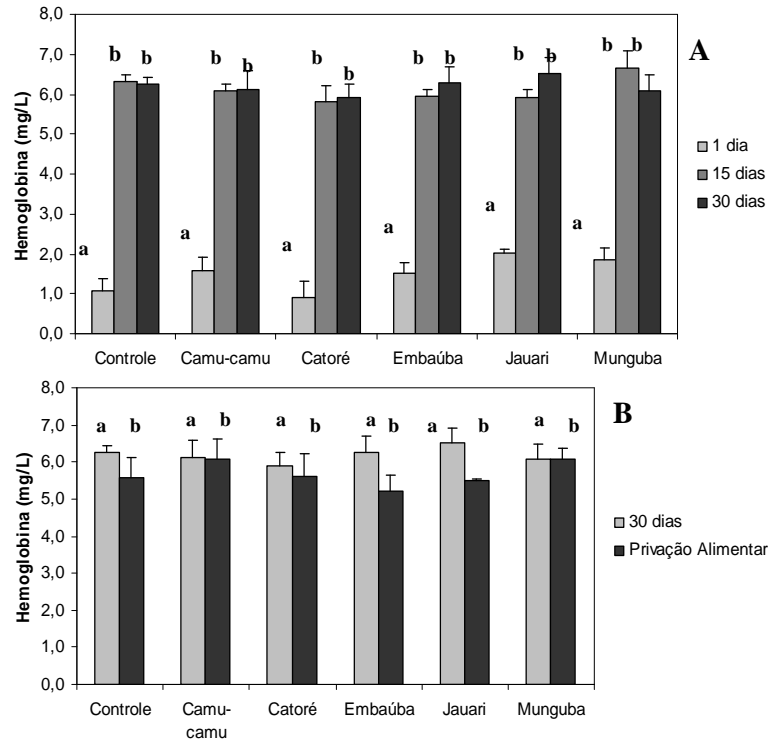


Figura 2. Valores de hemoglobina de *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

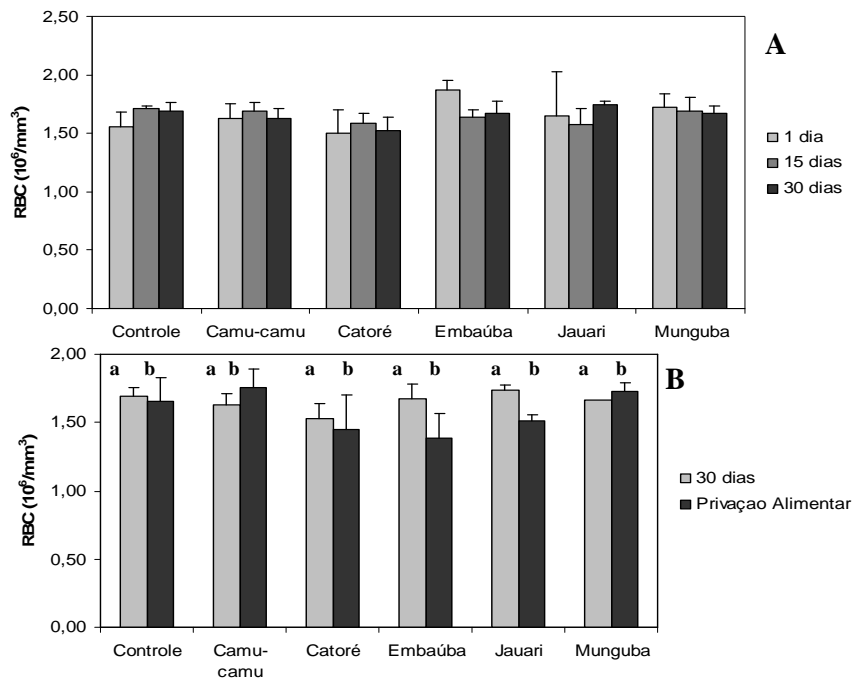


Figura 3. Número de eritrócitos circulantes (RBC) de *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Para todos os parâmetros hematológicos testados, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle dentro de cada período de alimentação, com exceção do índice VCM, onde o grupo tratado com ração suplementada com catoré apresentou média significativamente maior que os animais que receberam a ração controle durante 30 dias de alimentação.

Também não foram observadas diferenças significantes entre os animais alimentados com a ração suplementada com os mesmos frutos durante 30 dias, quando comparados com aqueles submetidos à privação alimentar.

Não foi detectada diferença entre as médias da concentração de glicose sanguínea nos juvenis de tambaqui alimentados pelo período de 1 dia, 15 dias e 30 dias, assim como aqueles submetidos a privação alimentar, em todos os tratamentos testados (Figuras 4 A e B). A concentração de glicose não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle dentro de cada período de alimentação testado, assim como entre os animais alimentados com os mesmos frutos no período de 30 dias em comparação àqueles que passaram por privação alimentar.

Tabela 5. Valores de Volume corpuscular médio (VCM μm^3), Hemoglobina corpuscular média (HCM pg) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM %) de tambaquis (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia nos períodos de 1 dia, 15 dias e 30 dias. Os valores estão expressos como média \pm SEM.

Parâmetros		Controle	Camu- Camu	Catoré	Embaúba	Jauari	Munguba
VCM (μm^3)	1 dia	156,88 \pm 16,82	152,33 \pm 8,37	168,70 \pm 18,41	121,18 \pm 9,18	125,77 \pm 13,83	138,43 \pm 14,89
	15 dias	134,80 \pm 4,88	142,90 \pm 6,73	145,10 \pm 3,82	136,18 \pm 3,49	149,80 \pm 8,67	149,88 \pm 9,73
	30 dias	133,88 \pm 4,52	146,80 \pm 4,94	172,25 \pm 11,29	144,38 \pm 7,87	130,35 \pm 6,71	127,00 \pm 8,35
HCM (pg)	1 dia	7,10 \pm 2,21 ^a	9,53 \pm 1,60 a	5,40 \pm 1,78 a	8,23 \pm 1,81 a	10,37 \pm 1,43 a	10,45 \pm 1,45 a
	15 dias	36,94 \pm 0,96 b	36,21 \pm 1,26 b	36,74 \pm 2,69 b	36,51 \pm 2,52 b	38,11 \pm 2,52 b	39,59 \pm 1,71 b
	30 dias	37,18 \pm 2,31 b	37,52 \pm 1,60 b	88,86 \pm 1,84 b	37,43 \pm 0,82 b	37,37 \pm 2,10 b	36,70 \pm 2,60 b
CHCM (%)	1 dia	4,67 \pm 1,35 a	6,33 \pm 1,77 a	3,40 \pm 1,31 a	7,22 \pm 2,12 a	8,02 \pm 0,62 a	8,03 \pm 1,58 a
	15 dias	27,44 \pm 0,54 b	25,41 \pm 0,68 b	25,26 \pm 1,40 b	26,76 \pm 1,30 b	25,44 \pm 0,80 b	26,58 \pm 1,21 b
	30 dias	28,02 \pm 2,59 b	25,73 \pm 1,85 b	22,66 \pm 0,64 b	26,13 \pm 1,34 b	28,67 \pm 0,69 b	29,29 \pm 2,69 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 6. Valores de Volume corpuscular médio (VCM μm^3), Hemoglobina corpuscular média (HCM pg) e Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM %) de tambaquis (*Colossoma macropomum*) alimentados com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia por um período de 30 dias e submetidos a posterior privação alimentar (P.A.). Os valores estão expressos como média \pm SEM.

Parâmetros		Controle	Camu- Camu	Catoré	Embaúba	Jauari	Munguba
VCM (μm^3)	30 dias	133,88 \pm 4,52 a	146,80 \pm 4,94 a	172,25 \pm 11,29 b	144,38 \pm 7,87 a	130,35 \pm 6,71 a	127,00 \pm 8,35 a
	P.A.	135,35 \pm 10,31 a	131,80 \pm 7,59 a	152,63 \pm 18,31 b	141,35 \pm 10,31 a	138,03 \pm 5,97 a	129,98 \pm 2,98 a
HCM (pg)	30 dias	37,18 \pm 2,31	37,52 \pm 1,60	88,86 \pm 1,84	37,43 \pm 0,82	37,37 \pm 2,10	36,70 \pm 2,60
	P. A.	35,15 \pm 3,08	35,03 \pm 3,58	40,59 \pm 5,09	38,61 \pm 3,05	36,66 \pm 1,10	35,04 \pm 1,12
CHCM (%)	30 dias	28,02 \pm 2,59	25,73 \pm 1,85	22,66 \pm 0,64	26,13 \pm 1,34	28,67 \pm 0,69	29,29 \pm 2,69
	P. A.	25,90 \pm 0,41	26,57 \pm 2,10	26,59 \pm 1,07	27,30 \pm 0,62	26,61 \pm 0,48	27,01 \pm 1,14

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

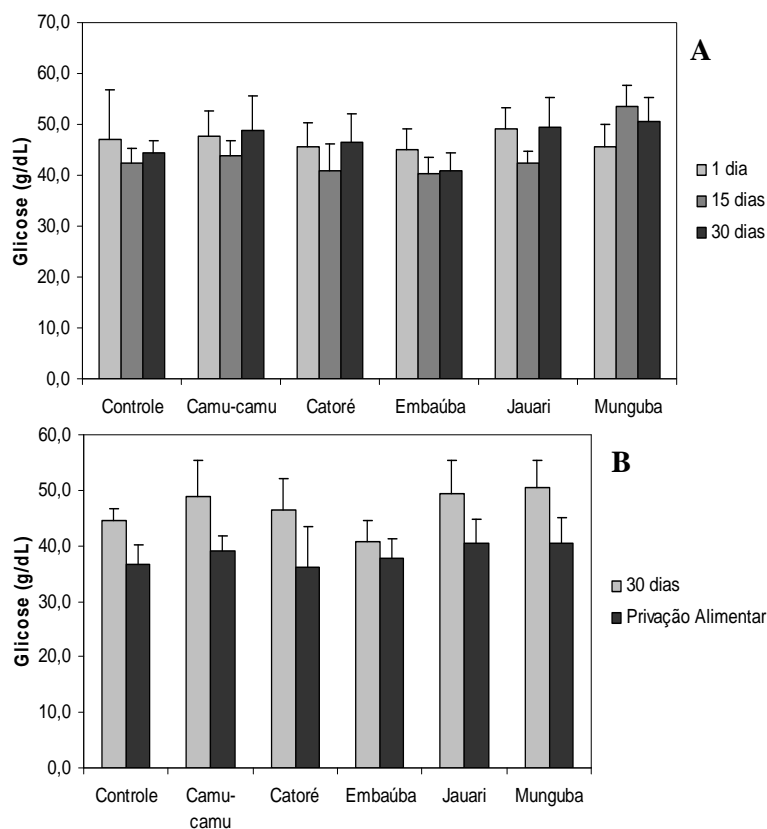


Figura 4. Concentração de glicose em *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.

ANÁLISE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (GST) nos tambaquis alimentados com munguba foi significativamente menor que aqueles que receberam ração controle durante o período de 30 dias. Nos períodos de 1 e 15 dias de alimentação não foram detectadas diferenças entre as médias da GST nos animais alimentados com ração suplementada com frutos e os animais que receberam ração controle.

Entretanto, os valores médios da GST nos períodos de 1, 15 e 30 dias de alimentação foram significativamente ($P \leq 0,05$) diferentes, para todas as rações testadas (Figuras 5 A). Para o período de privação alimentar, a atividade da GST foi menor estatisticamente ($P \leq 0,05$) que os valores médios encontrados nos peixes que receberam alimentação por 30 dias, independente do tratamento (Figuras 5B).

Os animais que receberam ração controle por 30 dias apresentaram atividade média de GST estatisticamente maior do que aqueles que foram submetidos à privação alimentar. Para os grupos que receberam ração suplementada com os frutos, não foi detectada diferença significativa na atividade da GST, entre o período de 30 dias de alimentação e privação alimentar, para cada um dos frutos testados.

A atividade da catalase foi menor nos peixes que receberam as rações experimentais por um dia, diferindo estatisticamente ($P \leq 0,05$) daqueles que receberam as rações por 15 e 30 dias (Figura 6A). Durante o período de privação alimentar, a atividade da catalase se manteve constante e não diferiu das médias apresentadas pelos peixes alimentados por 30 dias (Figura 6B).

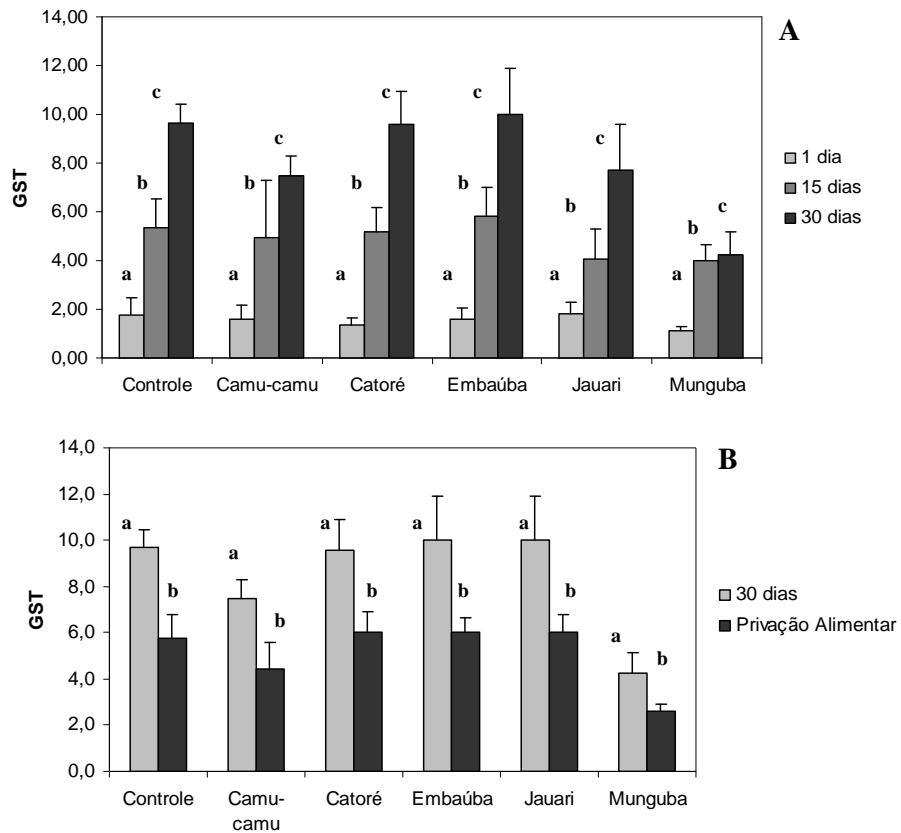


Figura 5. Valores médios da atividade da Glutathiona-S- Transferase (GST) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína) em *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

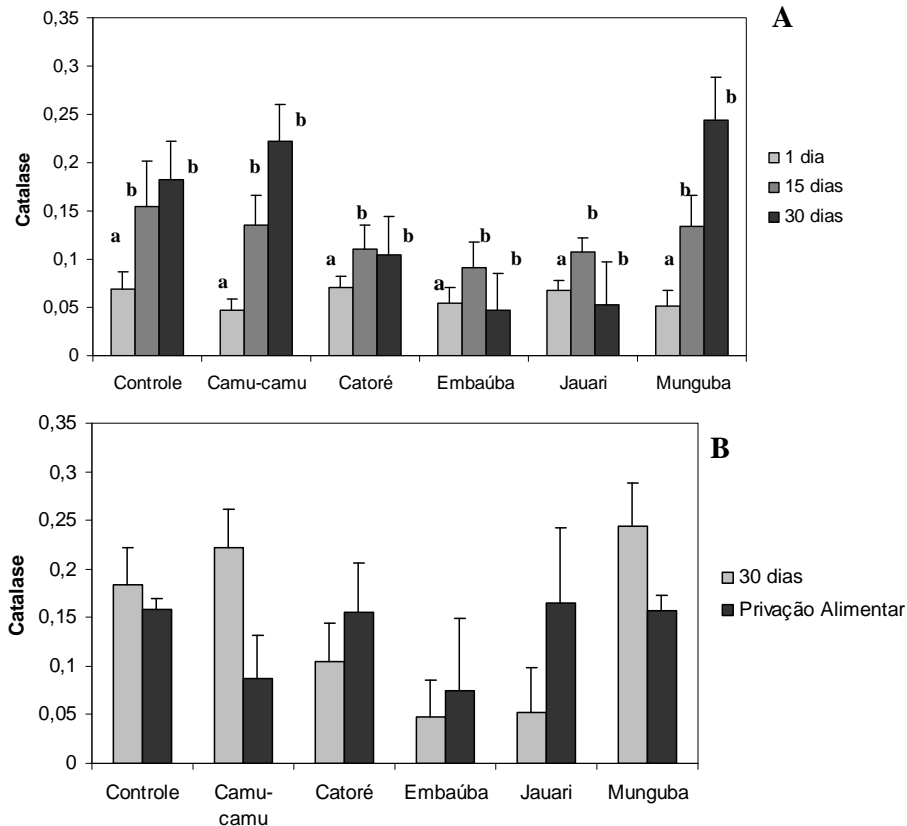


Figura 6. Valores médios da atividade da Catalase ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína) em *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Os animais que receberam rações suplementadas com camu-camu e munguba apresentaram menor atividade da GST após 30 dias de alimentação e privação alimentar. Porém estes animais apresentaram maior atividade da enzima catalase após 30 dias de alimentação, apesar destas diferenças não serem significativas.

Os peixes que foram alimentados com rações suplementadas com catoré, embaúba e jauari, e submetidos à posterior privação alimentar, apresentaram atividade da catalase quantitativamente maior que os animais alimentados com as rações suplementadas pelos mesmos frutos por 30 dias.

EFEITOS CITOTÓXICO E GENOTÓXICO

Neste experimento, as rações suplementadas com frutos e sementes não influenciaram a concentração de produtos celulares oxidados no plasma sanguíneos dos peixes (Figuras 7 A e B). Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos em todos os períodos de alimentação testados. Porém, foi possível observar diferenças estatísticas ($P \leq 0,05$) entre os períodos de alimentação de 1, 15 e 30 dias, para todos os tratamentos (Figuras 7A).

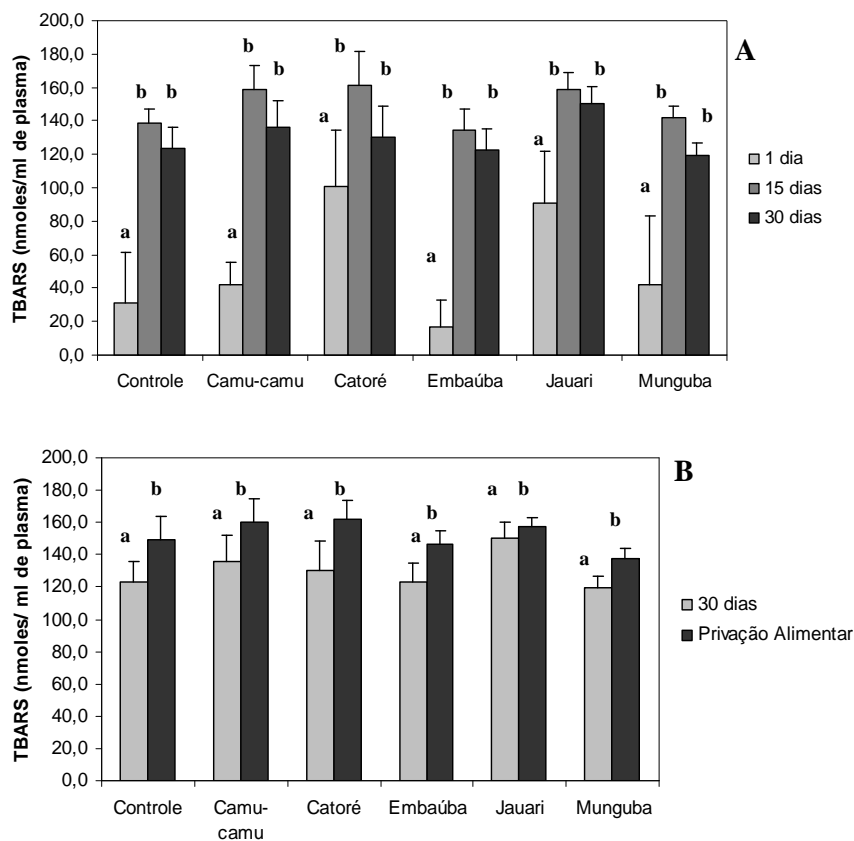


Figura 7. Concentração endógena de produtos celulares oxidados (TBARS) em *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Nos peixes submetidos à privação alimentar, a concentração de produtos celulares oxidados foi significativamente ($P \leq 0,05$) maior que nos peixes alimentados por 30 dias para todas as rações experimentais (Figuras 7B). Porém, para cada uma das rações testadas não houve diferença estatística significativa entre as médias, quando comparadas por tratamentos, entre os períodos de 30 dias e privação alimentar.

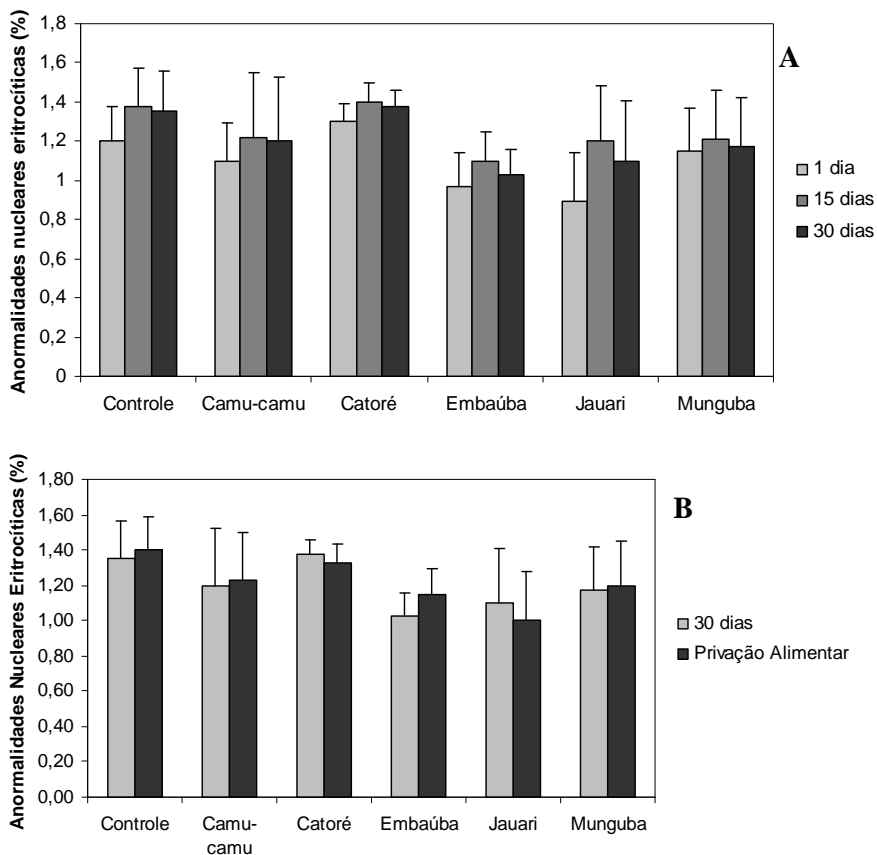


Figura 8. Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) de *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias do período de 30 dias de alimentação e privação de alimentar.

Os resultados das análises de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) podem ser observados nas Figuras 8A e B. As porcentagens de ANE se mantiveram homogêneas em todos os tratamentos e também entre os períodos de alimentação testados. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, entre os períodos de alimentação e

também na comparação entre os peixes alimentados por 30 dias e aqueles submetidos à privação alimentar.

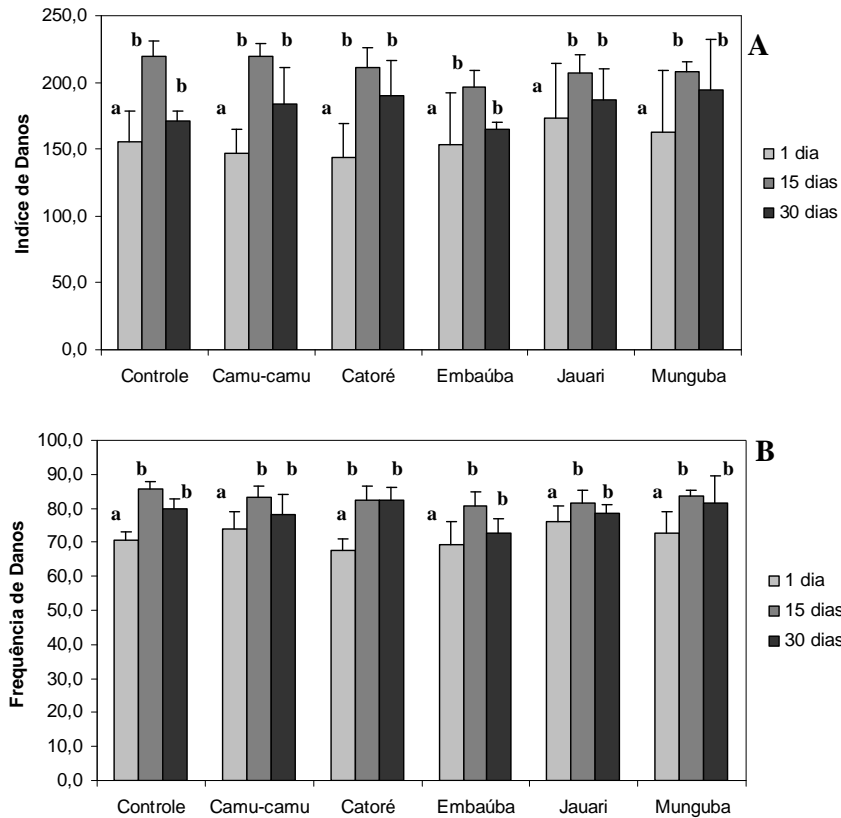


Figura 9. Teste cometa em preparações celulares de *Colossoma macropomum*. A. Comparação entre as médias do Índice de Danos em função dos dias de alimentação. B. Comparação entre as médias da Frequência de Danos em função dos dias de alimentação.

A variação do índice de danos em função das rações experimentais e tempo de alimentação (1, 15 e 30 dias) é apresentada na Figura 9A. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre índices de danos dos grupos experimentais quando comparados com o controle. A diferença estatística foi notada entre os períodos de alimentação, onde os peixes alimentados durante um dia apresentaram resultados significativamente menores ($P \leq 0,05$) do que aqueles que receberam a alimentação por 15 e 30 dias, para todos os tratamentos.

O mesmo comportamento foi observado para as médias de frequência de danos celular identificadas pelo Teste Cometa (Figura 8B), onde não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, havendo, porém influência do período de alimentação. Os resultados quantitativamente menores foram observados no primeiro dia de alimentação quando comparados com 15 e 30 dias. Esses dados sugerem que se ocorreram danos nucleares, estes resultaram da permanência dos peixes no aquário e da alimentação oferecida, independente do fruto utilizado.

As preparações contendo material dos animais submetidos à privação alimentar tiveram problemas na migração dos fragmentos de DNA durante a eletroforese, em função de erros metodológicos. Nenhum núcleo formou cauda em todas as lâminas confeccionadas, e desta forma não foi possível avaliar os danos causados pelos tratamentos durante essa fase do experimento.

DISCUSSÃO

VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

O monitoramento destes parâmetros teve por objetivo garantir que as condições ambientais dos tanques se mantivessem adequadas ao bem estar dos peixes durante o experimento, sem variações inesperadas que viessem a provocar estresse nos animais (Pereira-Filho *et al.*, 2008).

O oxigênio é essencial para o processamento adequado do alimento ingerido pelas vias metabólicas durante o processo de assimilação dos nutrientes (Castagnolli, 2000). Para cultivos comerciais, a concentração de oxigênio deve ser mantida acima de 4mg/L (Kubtiza, 1998). O tambaqui tolera níveis mais baixos de oxigênio dissolvido, chegando até a 0,5 mg/L (Saint-Paul, 1986), porém níveis muito baixos de oxigênio dissolvido na água podem causar estresse no animal e também provocar a morte por hipóxia. A temperatura e pH são

também considerados fatores limitantes para muitos processos biológicos. A temperatura apresenta efeito sobre o crescimento, consumo de ração e metabolismo dos peixes (Cuenco *et al.*, 1999). Para o tambaqui a temperatura média de conforto está entre 25 e 32°C (Cyrino & Kubitzka, 1998). Por ser uma espécie que habita naturalmente rios com pH ácido, o tambaqui é tolerante a níveis baixos de pH na água (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

Neste experimento, os parâmetros físico-químicos monitorados não apresentaram variações que pudessem interferir no desempenho dos peixes e estão de acordo com os valores recomendados para esta espécie (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

ANÁLISE DE CRESCIMENTO

O ganho de massa corporal dos peixes pode ser observado através das informações geradas a partir do ganho de peso desses animais. Neste experimento, não foram encontradas diferenças significantes entre os parâmetros analisados. Porém, os peixes que receberam ração controle e ração suplementada com jauari apresentaram altos valores de erro padrão, indicando que ocorrem diferenças de ganho e incremento de peso entre as réplicas desses tratamentos.

Oishi (2007) encontrou altos valores de desvio padrão no ganho de peso de peixes alimentados com ração suplementada com 10% e 30% de farinha de resíduo de castanha da Amazônia e atribui este fato à provável dominância de alguns peixes maiores dentro das unidades experimentais em relação ao consumo de alimento.

O balanço entre proteína e energia é o ponto central para o crescimento de peixes (Carter *et al.* 2001) e a proteína bruta é o principal nutriente, pois dela são extraídos os aminoácidos para a formação das proteínas musculares, sendo o ingrediente usado em maior quantidade e de maior custo na dieta de peixes (Piedras *et al.*, 2006)

A quantidade de proteína consumida pelos peixes através da dieta afeta diretamente seu estado metabólico. Sendo assim, baixos níveis de proteínas na ração ou ração com composição inadequada em aminoácidos podem causar redução no crescimento, diminuição da eficiência alimentar, imunodepressão e perda de peso nos peixes, em função da mobilização da proteína de alguns tecidos para manter as funções vitais. Por outro lado, se proteína em excesso é fornecida a esses animais, somente uma parte será usada para a formação de tecido muscular e crescimento, o restante será convertido em depósito de energia, em geral na forma de gordura (de La Higuera, 1987; Millward, 1989; Wilson, 1989).

Saint-Paul (1986) destacou que juvenis de tambaquis alimentados com níveis de 27,5% e 42,1% de proteína bruta (PB) apresentaram ganho de peso de 0,85 g/dia e 1,3 g/dia respectivamente.

Almeida (2006) encontrou diferenças significativas no ganho de peso dos tambaquis alimentados pelo período de 48 dias, em função de diferentes teores de lipídios e proteínas das rações. Os maiores aumentos de peso foram apresentados pelos animais alimentados com ração com 35% de PB e 4% de lipídios e 30% de PB e 8% de lipídios.

Roubach (1991), em experimento utilizando apenas frutos/sementes na alimentação de tambaqui observou que a semente de *Pseudobombax munguba*, que apresentava maior nível protéico (21,31%) e energético (31,9%), proporcionou o melhor desempenho de crescimento e ganho de peso quando comparada com sementes de *Hevea* sp, *Oriza sativa* e fruto de *Cecropia* sp. O autor destacou entretanto que os tratamentos experimentais utilizados não produziram um desempenho em ganho de peso e crescimento equivalentes ao tratamento controle com ração balanceada, atribuindo este resultado à um balanço de macronutrientes inadequados às necessidades dietárias para o desenvolvimento da espécie, à

ausência de determinados micronutrientes essenciais ao metabolismo e aos possíveis elementos antinutricionais presentes nas sementes e no fruto *in natura*.

Neste experimento os níveis de proteína das rações variaram de 25,9% (ração com jauari) a 36,3% (ração com camu-camu) (Tabela 2), estando dentro dos níveis recomendados para a espécie, cujos valores estão entre 17 a 30% (Carneiro, 1981; Mérola e Cantelmo, 1987; Saldaña e Lopez, 1988). Apesar de não ocorrer diferença estatística no desempenho dos tambaquis alimentados com as rações experimentais em relação à ração controle, numericamente, os melhores índices zootécnicos foram encontrados com a ração controle, ração suplementada com embaúba e ração suplementada com munguba, que apresentaram níveis de 34,1%, 27,1% e 29,3% de proteína bruta, respectivamente.

A ração experimental suplementada com camu-camu (fruto e semente) foi a que apresentou maior nível de proteína bruta (36,3%), porém com índices zootécnicos numericamente menores que aquelas que receberam embaúba e munguba. Esses resultados diferem dos encontrados por Oliveira (2005) que, usando apenas polpa e casca de camu-camu na proporção de 1:1 com ração comercial, observou melhor ganho de peso neste tratamento quando comparado às outras rações experimentais.

Silva *et al.*(2003) observaram em estudos de conteúdo estomacal do tambaqui a presença de sementes inteiras de camu-camu, indicando que estas sementes passam intactas pelo trato digestivo do animal. Os resultados da avaliação química do camu-camu são referentes à análise da polpa e casca (Waldhoff & Alencar, 2000; Yuyama *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003), não fazendo referência à composição química de suas sementes.

Os ingredientes de origem vegetal utilizados na alimentação dos peixes como sementes de leguminosas, tortas de sementes de oleaginosas e tubérculos, são limitados pela presença de substâncias antinutricionais (Francis *et al.*, 2001). Deve-se considerar também que as diferenças entre desempenho de animais alimentados com rações com diferentes

quantidades de nutrientes podem ser reflexos da variação da digestibilidade desses nutrientes (Hepher, 1993).

O uso das sementes de camu-camu na ração experimental pode justificar as diferenças numéricas encontradas nos índices zootécnicos dos peixes alimentados com esta ração e as demais rações deste experimento e também as diferenças dos mesmos índices em comparação ao trabalho de Oliveira (2005).

Entretanto, a ausência de mudanças significativas nos índices de desempenho do tambaqui indica que as rações suplementadas com munguba, embaúba, jauari, catoré e camu-camu suprem as necessidades metabólicas dos animais, proporcionando índices zootécnicos semelhantes àqueles observados em peixes alimentados com a ração comercial.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

O estudo dos parâmetros sanguíneos em peixes contribui para a determinação dos fatores relacionados com sua capacidade fisiológica (Wells *et al*, 2005). Alterações na concentração de hemoglobina, RBC ou hematócrito em determinadas condições estressantes pode indicar a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição, em função de distúrbios osmorregulatórios causados pelo estresse.

A qualidade e a quantidade de alimento têm efeitos significantes na fisiologia dos peixes, interferindo nas variáveis hematológicas, principalmente nos peixes mantidos em cativeiro (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Lundstead (2003) observou uma constância nos parâmetros hematológicos de juvenis de pintados (*Pseudoplasystoma corruscans*) alimentados com diferentes níveis de proteína bruta (20, 30, 40 e 50% PB) durante períodos de 28 e 90 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida (2006) que também não encontrou diferenças significativas nos parâmetros sanguíneos hematócrito e concentração de hemoglobina em tambaquis

alimentados com diferentes níveis de proteína e lipídios na ração (35% de PB e 4% de lipídio; 30% de PB e 8% de lipídio; 25% de PB e 11% de lipídio e 20% de PB e 14% de lipídio). Porém, Melo *et al.* (2006) observaram redução no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e de hematócrito em *Rhamdia quelem*, com o aumento dos níveis de proteínas na dieta desses peixes. Os autores destacam que a redução no eridrograma pode ter sido causada por inibição de eritropoiése, já que foi observada anemia normocítica-normocrômica nesses animais. Os autores destacam ainda que o excesso de proteína na dieta resulta no aumento da excreção de amônia, que pode ser altamente tóxica e causar leucopenia nos peixes.

Oliveira (2005) não encontrou diferenças estatísticas nos valores de hematócrito, hemoglobina e RBC e nos índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM em juvenis de tambaquis alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia no período de 30 dias. A autora atribuiu esses resultados à boa condição nutricional dos peixes em função das dietas testadas.

No presente trabalho, os parâmetros sanguíneos hematócrito, hemoglobina e RBC, e os valores hematimétricos VCM e CHCM permaneceram dentro dos limites indicados por Tavares-Dias & Moraes (2004) para todos os tratamentos testados nos peixes que receberam alimentação durante 15 e 30 dias e aqueles que foram submetidos à privação alimentar. Os autores encontraram como valores normais para tambaquis em cativeiros, os seguintes números: número de eritrócitos $1,31 - 2,83 \cdot 10^6 \mu\text{L}$; concentração de hemoglobina 5,6 – 11,3 g/dL; hematócrito 22,2- 41,6%; VCM 135,5 – 292,9 fL e CHCM 26,2 - 37,2 g/dL.

Após o primeiro dia de alimentação, os valores de hemoglobina, HCM e CHCM estavam bem abaixo dos valores médios de conforto para o tambaqui, diferindo significativamente ($P \leq 0,05$) dos resultados encontrados para os mesmos índices nos períodos de 15 e 30 dias de alimentação. Esses valores encontravam-se reduzidos em todos

os tratamentos testados no período, não havendo diferença estatística entre os mesmos. Portanto, a redução desses índices no período de um dia de alimentação pode estar mais ligada a algum fator estressante relacionado ao manejo, do que ao efeito das rações experimentais. Mudanças na dieta pode ser um fator estressante para peixes (Barcellos *et. al*, 2004).

Em *C. macropomum* estresse agudo reduz os valores de hemoglobina, número de eritrócitos e hematócrito, podendo aumentar o VCM (Tavares-Dias *et al.*, 2001). O aumento do volume de eritrócito sugere hidratação da célula, pois a adrenalina, uma das catecolaminas produzidas durante o estresse, parece provocar a retenção de sódio e cloreto no meio intracelular, aumentando sua concentração e conseqüentemente provocando ganho de água e aumento no volume eritrocitário (Tavares-Dias & Moraes 2004).

Melo *et al.* (2006) destacam que a deficiência nutricional e a privação alimentar podem também afetar as características sanguíneas dos peixes. Ituassú *et al.* (2006), verificando o crescimento compensatório de tambaquis submetidos à privação alimentar e posterior re-alimentação, observaram que, embora essa espécie apresente crescimento compensatório após 14 dias de privação, períodos superiores a 21 dias de restrição de alimentos pode acarretar danos irrecuperáveis aos juvenis de tambaqui com massa corporal em torno de 75 g.

Nos peixes submetidos à 21 dias de privação alimentar, no presente trabalho, as concentrações de hemoglobina, os níveis de hematócrito e RBC foram significativamente ($P \leq 0,05$) menores que nos peixes alimentados durante 30 dias. Porém, não foi observado o efeito das rações testadas e os valores médios dos parâmetros sanguíneos dos animais estavam dentro dos limites normais indicados por Tavares-Dias & Moraes (2004).

O consumo de alimento tem por finalidade fornecer energia para o metabolismo animal (Love & Black, 1994) e a glicose é a principal fonte de energia, sendo sintetizada a

partir dos carboidratos armazenados no fígado, na forma de glicogênio. A distribuição da glicose para os tecidos dos animais é feita através do sangue, sendo que alterações nos níveis de glicose sanguínea ocorrem em função da regulação da utilização desta, para produção de energia (Kalyane *et al.*, 1993), estímulo da glicogenólise por indução hormonal (Vijayan & Moon, 1992) ou ainda situação estressante (Hochachka & Somero, 1984).

O nível de homeostase da glicose durante privação alimentar varia com a espécie animal. Figueiredo-Garrutti *et al.* (2002) apresentam uma revisão onde destacam que nenhuma mudança da glicose plasmática foi observada após algumas semanas de privação alimentar em *Myxine glutinosa*, ou meses de privação em espécies como peixes onívoros *Anguilla rostrata* e *Clarias lazera*. Porém, Machado *et al.* (1988) observaram queda significativa nos níveis de glicose de cat fish (*Rhamdia hilarii*) após 30 dias de privação alimentar.

Em juvenis de *Brycon cephalus* submetidos a períodos de 0, 12, 24, 48, 72, 120, 168 e 336 h de privação alimentar, foi possível observar que peixes onívoros apresentam maior flexibilidade no metabolismo da glicose que peixes carnívoros, apresentando habilidades para modular o metabolismo em função de mudanças no estado nutricional (Figueiredo-Garrutti *et al.*, 2002). Essa flexibilidade no metabolismo da glicose é relatada pelos autores como uma mudança nos hormônios pancreáticos que permite um gradual ajuste metabólico que ocorre durante a transição entre o período pós-alimentação e privação alimentar.

A constância observada nos parâmetros sanguíneos e nos níveis de glicose plasmática dos peixes alimentados com as rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia indica que essas rações não provocaram hemodiluição, nem hemoconcentração ou qualquer outro tipo de alteração metabólica que comprometesse o quadro hematológico ou alterasse os níveis de glicose desses animais.

ANÁLISE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas ao oxigênio (ERO) como os íons superóxido ($O_2 \cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) e oxigênio átomo (O_1) se complexam com lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos causando grandes danos aos componentes da célula, podendo levar à morte celular (Valvanidis *et al.*, 2006). Sendo assim, a desintoxicação das espécies reativas ao oxigênio é um pré-requisito para a vida aeróbica (McCord, 2000).

Para se proteger desses reativos intermediários, o organismo apresenta mecanismos de defesa, conhecidos como agentes antioxidantes. Estes mecanismos podem ser enzimáticos, que estão presentes naturalmente nos organismos, e não enzimáticos, que podem ser adquiridos por meio de dietas balanceadas, principalmente aquelas elaboradas a partir de vegetais (Fang *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2004). Entre as enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase, a glutatona redutase, a glutatona s-transferase e a catalase. E entre os agentes não-enzimáticos, estão o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E) e o beta caroteno (precursor da vitamina A).

Animais bem nutridos ou ainda alimentados com dietas contendo antioxidantes endógenos podem apresentar uma melhor resposta ao estresse (Bianchi & Antunes, 1999).

São poucas as informações sobre o modo com que os níveis e tipos de fontes de energia das rações afetam o status oxidativo dos peixes. A nutrição influencia a oxidação e os mecanismos de defesas antioxidantes. Então, a composição da dieta deve ser avaliada também em termos de seu efeito sobre o balanço entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e sua quebra (Rueda-Jasso *et al.*, 2004). Um desbalanço entre a produção e a remoção do ERO pode produzir estresse oxidativo.

Oliveira (2005) observou níveis bastante variáveis de GST e catalase no fígado de tambaquis alimentados com frutos e sementes da Amazônia, onde apenas os frutos munguba e embaúba apresentaram níveis de GST estatisticamente diferentes do controle, indicando que esses frutos parecem não proteger os animais contra o estresse oxidativo, favorecendo um aumento na atividade das enzimas de desintoxicação.

Em *Sparus aurata*, Pascual *et al.* (2003) observaram um aumento significativo da atividade da GST nos peixes submetidos à privação alimentar, quando comparados àqueles que receberam níveis de ração referentes a 2, 1 e 0,5% da biomassa. Porém, após o período de 21 dias de restrição ou de privação alimentar os níveis da GST reduziram-se significativamente, principalmente nos animais que não receberam a ração. Os autores destacam que a restrição alimentar a qual os peixes foram submetidos, deve ter afetado o suprimento de aminoácido sulfurado e conseqüentemente os níveis da glutatona e das enzimas glutatona-dependentes.

Neste experimento foi possível observar um aumento na atividade da GST em decorrência do período de alimentação, com posterior queda desses níveis quando o peixe foi submetido à privação alimentar. Porém não foi possível observar diferenças significativas entre os níveis de GST no fígado dos animais alimentados com a ração suplementada com os frutos quando comparado aos animais que receberam a ração controle. Em relação à catalase, observou-se um comportamento semelhante, com o aumento da atividade da enzima em função da duração do período alimentar. Mas a atividade da catalase no período de privação alimentar não apresentou um comportamento constante, quando comparado com os animais alimentados por 30 dias.

Rueda-Jasso *et al.*, (2004) observaram que a atividade da catalase no fígado de juvenis de *Solea senegalensis* foi afetada significativamente pelos níveis de lipídios da dieta.

Os peixes que foram mantidos em dietas contendo altos níveis de lipídios apresentaram uma tendência de aumentar a atividade da catalase.

Morales *et al.* (2004) encontraram um decréscimo na atividade da catalase no fígado de *Dentex dentex* submetido a 5 semanas de privação alimentar. Do mesmo modo Pascual *et al.* (2003) também relataram queda na atividade da catalase em *Sparus aurata* submetidos à restrição e privação alimentar. Nestas espécies, prolongados períodos de privação alimentar induz a oxidação e o estresse, desencadeando a ativação de alguns mecanismos de defesa antioxidante.

Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a restrição alimentar não induziu mudanças na atividade da catalase (Hidalgo, *et al.*, 2002).

Neste trabalho as rações suplementadas com camu-camu, catoré, embaúba, jauari e munguba, não afetaram o balanço entre a produção e a remoção dos ERO nos peixes, mantendo valores médios de atividade das enzimas antioxidantes muito próximos aqueles mantidos pela ração controle. Porém, foi possível observar um aumento da atividade das enzimas antioxidantes GST e Catalase durante todo o período de alimentação, independente do tipo de fruto usado para suplementar a ração, assim como para os peixes que receberam apenas ração.

Os frutos, de uma maneira geral, são fontes alimentares ricas em vitaminas e outros compostos com atividades antioxidantes (Alceste & Jory, 2000). Esperávamos que a inclusão destes frutos na ração comercial pudesse oferecer uma maior proteção ao estresse oxidativo e consequentemente, uma menor produção de ERO. Este fato não foi observado neste experimento, onde, provavelmente o processamento realizado para a elaboração das rações experimentais, como a secagem em estufa a 55°C durante 12 horas, pode ter afetado a concentração das vitaminas e compostos antioxidantes presentes nesses frutos.

EFEITOS CITOTÓXICO E GENOTÓXICO

Em peixes, a peroxidação lipídica causada pelas espécies reativas ao oxigênio (ERO) é a principal causa de muitas doenças (Sakai *et al.*, 1998). Decorre da ação do ERO que ativa as fosfolipases causando a desintegração dos ácidos graxos polinsaturados e fosfolipídios da membrana celular (Haliwell & Gutteridge, 1999). Entretanto, todos os animais apresentam um sistema para combater a oxidação e evitar as lesões induzidas pela ação desse processo (Jacob, 1995). Desta forma, o metabolismo normal depende, primordialmente, da relação entre a produção do radical livre e a atividade dos fatores de proteção da peroxidação dos lipídios (Mourente *et al.*, 2002). A ação desses fatores de proteção pode ser medida pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sangue, plasma e principalmente fígado dos animais (Ohkawa, 1979).

Marcon & Wilhelm-Filho (1999) observaram que o status das defesas oxidativas no fígado, no sangue e no plasma do tambaqui em seu habitat natural é eficaz em impedir ou em atenuar o estresse oxidativo. A manutenção das defesas oxidativas em níveis elevados no tambaqui em ambiente natural é, possivelmente, um resultado das mudanças na disponibilidade do oxigênio, na oscilação da temperatura e no pH que são observados freqüentemente em águas da bacia de Amazônica, especialmente durante os períodos da transição de hipóxia para hiperóxia.

Sobre os efeitos da alimentação, Rueda-Jasso *et al.* (2004) destacam que já foi demonstrado que a fonte de energia da dieta (proteína, lipídio ou carboidrato digerível) pode modular a oxidação do lipídio em homogenado de músculo da truta de arco-íris. Em experimento usando diferentes níveis de energia não protéica na alimentação de *Solea senegalensis*, os autores encontraram taxas significativamente maior de TBARS nos animais que receberam a dieta com maior concentração de lipídios, e concluíram que a sensibilidade

e os índices de peroxidação de lipídios estão correlacionados com o grau de insaturação das dietas.

As rações suplementadas com agentes oxidantes podem minimizar o efeito da peroxidação lipídica decorrente dos altos níveis de energia na dieta de peixes. Lin & Shiau (2005) testando sete níveis de concentração de DL- α -tocoferol (0, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de ração) em rações com 4 e 8% de lipídios, observaram queda nos níveis de TBARS em *Epinephelus malabaricus* em decorrência do aumento das concentrações de DL- α -tocoferol nas dietas testadas.

Frutos e sementes são fontes importantes de vitaminas e outros compostos antioxidantes para os peixes (Alcestes & Jory, 2000). Oliveira (2005) observou em tambaquis alimentados com frutos da Amazônia níveis de peroxidação lipídica bastante variáveis, não encontrando diferenças significativas entre as dietas testadas, mas destaca que os animais que receberam a dieta suplementada com munguba e catoré e que foram submetidos ao túnel de natação, apresentaram níveis numericamente maiores de TBARS.

Os dados de Oliveira (2005) corroboram aqueles vistos neste trabalho, pois os níveis de TBARS parecem não terem sido influenciados pela dieta dos peixes. Porém, foram observadas diferenças significativas entre os períodos de alimentação, assim como o efeito da privação alimentar, mas os resultados encontrados em função dos tratamentos não foram diferentes dos apresentados pela ração controle.

As respostas biológicas a agentes estressantes podem se manifestar em vários níveis do organismo, modificando padrões normais da fisiologia e bioquímica do animal, até mudanças moleculares, na qual a integridade gênica e processos celulares podem ser afetados. A formação de alterações morfológicas no envoltório nuclear foi descrita por Carrasco *et al.*, 1990, como núcleo que apresenta uma pequena evaginação do envelope nuclear, o qual contém eucromatina (reiforme), núcleo apresentando evaginações maiores

que o núcleo em forma de rim (lobado) e núcleo apresenta um corte notável no conteúdo do material nuclear (segmentado), que também são relatados em eritrócitos de peixes como uma das conseqüências da exposição destes animais à contaminantes químicos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos no meio ambiente. Porém, os mecanismos moleculares que levam a tais alterações nucleares ainda não foram descritos (Palhares & Grisolia, 2002) e os animais podem produzir essas anormalidades naturalmente, por um erro no processo de divisão celular (Heddler *et al.*, 1991).

Além da análise das anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE), o teste cometa é utilizado para detectar lesões no DNA. Estas lesões, após serem processadas, podem resultar em mutação. Entretanto, diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção pelos próprios mecanismos de reparo do DNA (Tice, 1995).

A sensibilidade destes testes aos efeitos de agentes contaminantes tem sido descrita para algumas espécies de peixes tropicais. Pretti *et al.* (2007) descrevem o aumento das anormalidades nucleares eritrocíticas e de índices de danos observados pelo teste cometa em *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. Bucker *et al.*, 2006 observaram um aumento gradual no índice de danos em teste cometa de *Eigenmannia virescens* em diferentes tempos de exposição ao benzeno.

Os valores de ANE detectados neste experimento não apresentaram diferenças entre os tratamentos e o grupo controle nos períodos de alimentação testados. Já o índice e a frequência de danos resultantes do teste cometa apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os períodos de alimentação (1, 15 e 30 dias de alimentação), sendo menores nos animais que receberam alimentos por um dia. Porém, essa diferença parece não estar ligada à presença de frutos na ração, já que, para todos os períodos testados, os tratamentos apresentaram médias semelhantes ao controle.

Diante disso, podemos afirmar que as anormalidades nucleares eritrocíticas e os índices de danos do DNA não foram causados pela presença de agentes tóxicos contido nos frutos, já que esses índices não diferiram significativamente daqueles encontrados no controle.

CONCLUSÃO

A inclusão dos frutos e sementes utilizados neste experimento, em substituição a 50% da ração comercial na dieta dos tambaquis não comprometeu os índices de desempenho zootécnico desses animais, quando comparados aos animais alimentados com a ração controle.

Essas rações não promoveram alterações nos níveis normais dos parâmetros hematológicos e nos índices hematimétricos, não causaram diferenças significativas na atividades das enzimas GST e Catalase e nem danos nucleares ou fragmentos de DNA, nos tambaquis quando comparados aqueles que receberam apenas a ração controle.

Embora as rações suplementadas com camu-camu, catoré, embaúba, jauari e munguba não tenham provocado alterações nos parâmetros hematológicos, enzimáticos e citogenotóxicos, foram encontradas diferenças significativas nessas respostas em função dos períodos de alimentação testados (1, 15 e 30 dias), indicando que os peixes passaram por períodos de estresse durante a realização do experimento, que refletiram nos parâmetros hematológicos, mecanismos oxidantes e danos celulares.

Não foi possível observar benefícios relacionados a uma melhor resistência ao estresse oxidativo provavelmente pelo tipo de processamento que foi realizado no preparo das rações experimentais, que pode ter causado perda de vitaminas e de compostos antioxidantes presentes nos frutos utilizados nessas rações.

As respostas das análises realizadas na condição estressante de privação alimentar parecem não terem sido influenciadas pelo tipo de dieta que os peixes receberam, mantendo as médias dos parâmetros analisados próximas àquelas encontradas nos peixes do grupo controle.

Os frutos e sementes testados neste trabalho apresentam potencial para a incorporação na ração do tambaqui, visto que não provocaram alterações no metabolismo dos animais, podendo diminuir os custos da produção de peixes para pequenos produtores.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) ALIMENTADO COM FRUTOS E SEMENTES DA AMAZÔNIA

RESUMO

Os peixes amazônicos têm ao seu alcance uma grande disponibilidade de itens alimentares que fazem parte de sua dieta natural, e, para aproximadamente 200 espécies de peixes dessa região, entre eles o tambaqui, frutos e sementes constituem a maior fonte de nutrientes e energia. O conhecimento do hábito alimentar desses animais na natureza possibilitou a inclusão de frutos e sementes na dieta de peixes criados em cativeiro. Entretanto, a qualidade dos frutos e sementes e seus efeitos metabólicos devem ser investigados por metodologias específicas, uma vez que, para muitas espécies vegetais, ainda não foram avaliados os principais constituintes químicos, tampouco seus efeitos fisiológicos nos animais que delas se alimentam. Este trabalho teve como objetivo identificar, através da técnica de DD-PCR, transcritos diferencialmente expressos em tambaqui alimentado com ração suplementada com os frutos camu-camu, catoré, embaúba, jauari e com a semente de munguba. A expressão diferencial de genes gerou fragmentos que demonstraram similaridade com os genes das enzimas Adenilato Quinase (AK), Superóxido Dismutase (SOD), Apolipoproteína (APO) e Citocromo P450 (CYP 20A1), indicando necessidade de um melhor monitoramento nos níveis de agentes antioxidantes das rações após a inclusão de frutos que atendam à demanda necessária para melhorar o “status” oxidativo celular da espécie. Outros sete transcritos expressos não apresentaram similaridade com as enzimas depositadas no GenBank, sendo candidatos a futura investigação para a compreensão de processos específicos do metabolismo dos animais alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia.

IDENTIFICATION AND GENE DIFFERENTIAL EXPRESSION IN TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) FED WITH AMAZONIAN FRUITS AND SEEDS

ABSTRACT

Amazonian fishes have access to a large number of feed items which are part of their natural diet, and for approximately 200 fish species in the region, including the “tambaqui”, fruits and seeds are their main sources for nutrients and energy. The knowledge of the food habits of these animals in nature, made possible the inclusion of fruits and seeds in fish diet reared in captivity. However the quality of fruits and seeds, as well as their metabolic effects on fish must be investigated through specific methodologies, since there are several vegetable species, that have not yet been evaluated on their chemical constituents, neither their physiological effects on animals fed with them. This work aims to identify, through, differential display-PCR (DD-PCR) methodology for the main differentially expressed transcripts in tambaquis fed with supplemented formulated feed with the fruits camu-camu, catoré, embaúba, jauari and seeds of munguba. The differentially expressed genes generated fragments that showed similarity with Adenylate Kinases (AK), Superoxide Dismutase (SOD), Apolipoprotein (APO) and Cytochrome P450 (CYP 20A1) enzymes encoding genes, indicating that there is a need for a better monitoring of oxidative processes levels in the cells of this fish species fed with supplemented formulated. Seven other transcripts expressed in the same experiment did not show similarity with any genes deposited in the GenBank, being candidates for future research that will allow the understanding of these animals specific metabolism process when fed with commercial rations supplemented with Amazonian fruits and seeds.

INTRODUÇÃO

Os peixes amazônicos têm à sua disponibilidade uma grande diversidade de itens que fazem parte de sua dieta natural. Para aproximadamente 200 espécies de peixes da região, os frutos e sementes são os grandes mananciais naturais de nutrientes e energia (Goulding, 1980).

Os peixes ligados à floresta de inundação são, em sua maioria, frugívoros, que evoluíram em estreita relação com as árvores e arbustos amazônicos (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Entre essas espécies está o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que é um frugívoro especialista de frutos como *Hevea spruceana* (seringa-barriguda) e *Astrocarium jauari* (jauari) (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Imperatriz-Fonseca & Por, 2003).

Silva *et al.* (2003) destacaram mais de 130 espécies de frutos e sementes, distribuídos em 36 famílias de plantas identificados como alimentos do tambaqui. Durante os meses de cheia, o conteúdo estomacal dos peixes contém quantidade relativamente alta destes itens, coincidindo com o período de frutificação das árvores presentes nas áreas de várzeas e igapós. A grande variedade e disponibilidade de itens provenientes das florestas inundadas levam a espécie a incluir em sua dieta uma mistura de frutos e sementes para conseguir melhor equilíbrio de proteína, carboidratos, gorduras e vitaminas (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

Com base no conhecimento do hábito alimentar natural do tambaqui, alguns autores sugeriram a possibilidade do uso de frutos e sementes como uma fonte alternativa de alimentos na piscicultura intensiva desses peixes na Amazônia (Pereira-Filho, 1995; Silva, 1996; Araujo-Lima & Goulding, 1998).

Estudos sobre o valor nutricional (Waldhoff *et al.*, 1996), a eficiência alimentar (Roubach, 1991), digestibilidade (Silva *et al.*, 2003) e aspectos fisiológicos e bioquímicos (Oliveira, 2005) desses animais alimentados com algumas espécies de frutos e sementes da

Amazônia foram realizados no intuito de avaliar a eficiência do mesmo e a possibilidade de inclusão desses itens na dieta de peixes em cativeiro, visando a diminuição dos custos de produção.

A qualidade dos frutos e sementes e seus efeitos metabólicos devem ser investigados por metodologias específicas, uma vez que, para muitas espécies vegetais, ainda não foram avaliados os principais constituintes químicos, tampouco seus efeitos fisiológicos nos animais que delas se alimentam. Os peixes frugívoros não se alimentam de todas as sementes que estão disponíveis e de tamanho apropriado pra serem quebradas, algumas espécies vegetais produzem muitas sementes por ano, mas são ingeridas apenas ocasionalmente pelos animais (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

O estudo da expressão diferencial de genes é um dos mais promissores caminhos para entender os mecanismos de desenvolvimento (Kozian & Kirschbaum, 1999) e respostas às mais diferentes condições nos quais os organismos são submetidos, incluindo as mudanças ocorridas em função dos tipos de dietas fornecidas aos peixes (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2001; Lilleeng *et al.*, 2007).

Uma série de metodologias pode ser usada para identificação e isolamento de transcritos diferencialmente expressos em peixes. Entre as metodologias de maior destaque atualmente estão a Hibridização Subtrativa Supressiva (HSS); o cDNA AFLP, o DD-PCR (Differential Display – PCR) e micro arranjos de DNA (Freeman *et al.*, 2000). Os micro arranjos de DNA, apesar de gerar um grande volume de informações, é uma técnica bastante cara, limitando seu uso em muitos laboratórios. Assim, a técnica do DD-PCR, apesar de gerar menor volume de informações que os micro arranjos, torna-se uma alternativa viável, pois apresenta custo relativamente menor e maior facilidade de implementação.

Este trabalho teve como objetivo identificar, através da técnica de DD-PCR, transcritos diferencialmente expressos em tambaqui alimentado com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Para o estudo da expressão diferencial de genes foi utilizado o fígado de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomun*) alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia.

As rações que compuseram os tratamentos deste experimento foram constituídas de uma mistura composta de 50% de ração comercial (36% de proteína) moída e 50% de fruto moído, que posteriormente à mistura, foram repeletizadas em moedor de carne elétrico e secas em estufa a 55°C por 12 horas. A ração controle foi constituída apenas de ração comercial (36% de proteína) moída, repeletizada e seca em estufa nas mesmas condições das rações tratamentos.

Os frutos escolhidos para compor as rações experimentais foram: camu-camu (*Myrciaria dúbia*), catoré (*Crataeva benthamii*), embaúba (*Cecropia latiloba*), munguba (*Pseudobombax munguba*) e jauari (*Astrocarium jauari*). Para a confecção da ração suplementada com munguba, foi utilizada apenas a semente do fruto, para a ração suplementada com jauari, somente a polpa foi utilizada e para as demais rações foram utilizados os frutos inteiros de camu-camu, de catoré e de embaúba.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 6. Constituído por três períodos de alimentação (1, 15 e 30 dias) e 6 tratamentos (um controle e cinco rações suplementadas com frutos), com quatro repetições cada, totalizando 24 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi composta de um aquário com

capacidade de 310L, preenchidos com 80L de água, providos de aeração e renovação de água constantes, contendo 10 juvenis de tambaquis com peso médio de $57,1 \pm 2,8$ g e comprimento padrão médio de $11,9 \pm 0,2$ cm. O período de aclimação dos peixes foi de duas semanas, onde todos os animais foram alimentados com a ração controle duas vezes ao dia *ad libitum*.

Os peixes foram alimentados por um período de 30 dias e submetidos a posterior período de privação alimentar por 21 dias. Durante o período experimental, foi retirado um peixe de cada aquário após o 1° dia, 15° dia e 30° dia de alimentação. Esses animais foram anestesiados com MS 222, sacrificados e levados para a coleta de tecido, o mesmo ocorrendo com os peixes submetidos à privação alimentar.

De cada animal foi retirado o fígado, que foi acondicionado em tubos *ependorf*® estéreis, colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO DD-PCR

A expressão diferencial de genes de tambaqui foi obtida por meio da técnica “Differential display polymerase chain reaction – DD-PCR” proposta por Liang & Pardee, (1997).

O protocolo do DD-PCR foi organizado em cinco etapas:

1. Isolamento do RNA total, quantificação e verificação da integridade do RNA;
2. Tratamento do RNA;
3. Síntese de cDNA por transcriptase reversa;
4. Amplificação do DNA por PCR - DD-PCR;
5. Isolamento e clonagem dos amplicons selecionados.

1. ISOLAMENTO DO RNA TOTAL, QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA

A amostra de fígado (50 – 100 mg) foi homogeneizada com 1000 µL de reagente Trizol®; para a separação das fases foram adicionados 300 µL de clorofórmio, em seguida, a amostra foi misturada em vortex e centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C.

A primeira fase do sobrenadante foi transferida para outro tubo *ependorf* estéril e a precipitação do RNA foi feita com 500 µL de isopropanol 100% e centrifugação de 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi lavado com etanol a 75%, centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C e posteriormente eluído em água com DEPC.

A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro (SHIMATZU – UV 240 – Graphicord) em absorvância de 260nm (A_{260}), onde A_{260} equivale a uma concentração de 40 µg.mL⁻¹ de RNA. Para o cálculo da concentração foi utilizada a fórmula [RNA em µg.mL⁻¹] = $A_{260} \times D \times 40 \text{ µg.mL}^{-1}$, onde D é o valor da diluição da amostra.

A integridade da amostra foi verificada usando gel desnaturante de agarose (1,5%) contendo 1,5 g de agarose dissolvida em 60 mL de água, 20 mL de MOPS 5X (0,4 M de MOPS, 0,1 M de acetato de sódio, 0,01M EDTA) e 20 mL de formaldeído. As amostras foram coradas com “front” (930 µL de H₂O com DEPC, 150 µL de MOPS (10X), 240 µL de formamida, 100 µL de glicerol, 50 µL de azul de bromofenol, 5 µL de Brometo de etídeo 10mg/mL) e aplicadas no gel. O gel foi fotografado e analisado no aparelho Image master VDS – Pharmacia Biotec.

2. TRATAMENTO DO RNA

Amostras de 5µg de RNA foram tratadas com 1µL de tampão 10X da Dnase; 1 µL de Dnase e água mili Q estéril com DEPC em quantidade suficiente para completar o volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos e a DNase foi inativada com aquecimento a 65°C por 10 minutos.

3. SÍNTESE DE cDNA POR TRANSCRIPTASE REVERSA

Para a síntese do cDNA, foram utilizados três *primers* oligo dT ancorados (AAGCT₁₁M, onde M pode ser G, A ou C). O RNA total de cada amostra foi dividido em três grupos, onde, para cada grupo foi utilizado um dos três *primers*.

Cada reação foi realizada com 5µg de RNA tratado com Dnase, 1µL de dNTP mix 10mM, 1µL de um dos Oligo dT ancorado, 1µL de Transcriptase Reversa (MMLV-RT), 4 µL de tampão 5X da transcriptase e água Mili Q autoclavada em quantidade suficiente para completar um volume final de 20 µL.

As amostras foram incubadas em termociclador (PCR ATC 401 – Apollo Instrumentation) para um ciclo nas seguintes temperaturas: 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

O cDNA foi quantificado em espectrofotômetro (SHIMATZU – UV 240 - Graphicord) em absorvância de 260 nm (A_{260}), onde A_{260} equivale à uma concentração de 33 µg.mL⁻¹ de DNA fita simples. Para o cálculo da concentração foi utilizada a fórmula [DNA em µg.mL⁻¹] = $A_{260} \times D \times 33 \text{ µg.mL}^{-1}$. Onde D é o valor da diluição da amostra.

A qualidade do cDNA foi observada em gel de agarose 1% contendo 100 mL de TAE 1X (242 g de Tris-base, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100mL de EDTA 50mM pH 8,0, água destilada para completar um volume final de 1000mL) , 1 g de agarose, corado com 5 µL de Brometo de Etídio. O gel foi fotografado em aparelho Image master VDS – Pharmacia biotec.

4. AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR PCR - ddPCR

Para todas as amostras de cDNA foram realizadas 3 reações de amplificações, utilizando cada um dos 3 *primers* arbitrários (Tabela 1), separadamente. Todas as amplificações foram realizadas com uma réplica.

As amostras foram amplificadas seguindo o seguinte protocolo: 500 ng de cDNA, 1 µL de dNTP mix 10mM, 1 µL de um dos 3 *primers* arbitrários, 1,5 µL de MgCl₂, 1µL de Taq polimerase, 5 µL de tampão 5X da Taq polimerase e água Mili Q estéril em quantidade suficiente para um volume final de 25 µL.

Tabela 1. *Primers* arbitrários utilizados amplificação do cDNA.

PRIMER ARBITRÁRIO	SEQUÊNCIA
MOB 1	AAGGTTGCACTGT
MOB 5	AAGGTTGATTGCC
PAI 2	AAGGTTGCACCAT

As amostras foram incubadas em termociclador para ciclagem de PCR “touchdown”, nas seguintes condições: 6 ciclos de 94°C por 15 segundos, 43°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundo; 6 ciclos de 94°C por 15 segundos, 40°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundo e 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 38°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundo, com uma extensão final de 72°C por 60 segundos e hold de 4°C.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, constituído por 100 mL de TAE 1X e 2 g de agarose, corado com 10 µL de Brometo de Etídio. Para a visualização dos fragmentos expressos diferencialmente, o gel foi fotografado em equipamento Image Master VDS – Pharmacia biotec. Os marcadores de peso molecular utilizados foram de 100 e 200 pb.

5. ISOLAMENTO E CLONAGEM DOS AMPLICONS SELECIONADOS

Após a análise dos géis com os produtos do DD-PCR, os fragmentos selecionados foram excisados do gel de agarose e purificados com o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System - PROMEGA, seguindo o protocolo do fabricante.

Em seguida, os fragmentos purificados foram ligados em vetor pGEM® -T Easy Vector System - PROMEGA (Figura 1), usando 10 µL do fragmento purificado, 10 µL de tampão 2X, 1 µL do vetor pGEM®, 1 µL de T4 DNA ligase. A reação foi mantida a 16 °C por, no mínimo, 3 horas.

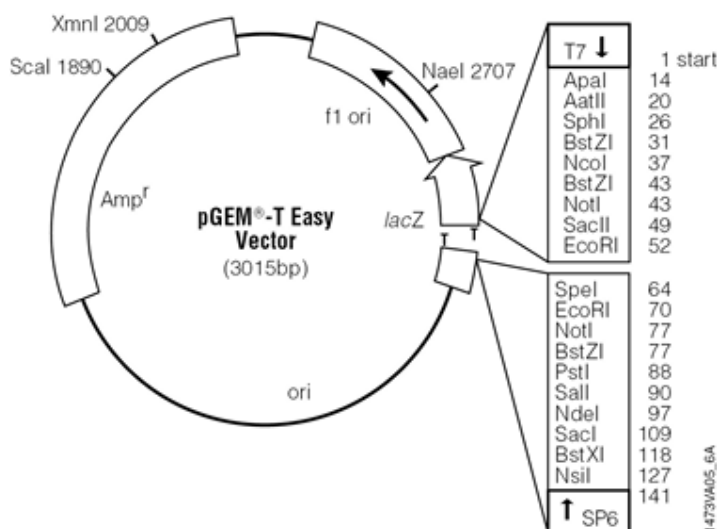


Figura 1. Vetor pGEM® -T Easy Vector System - PROMEGA

Os fragmentos ligados ao vetor foram inseridos em *Escherichia coli*, linhagem Mos Blue competentes, por choque térmico (gelo por 30 minutos, 42°C por 40 segundos e gelo por 2 minutos). As células foram incubadas em 800 µL de meio LB sem antibiótico, sob agitação (150 rpm) a 37°C por uma hora. Posteriormente, a cultura foi semeada em meio LB sólido previamente tratado com X-gal (sistema galactosidase para seleção de colônias com inserto) e IPTG (15mg/mL), com ampicilina (50 mg/ml) e tetraciclina (15 mg/mL), e

mantida a 37°C pelo período de 14 -18 horas. Foram selecionadas três colônias brancas de cada fragmento clonado, que foram novamente semeadas em meio de cultura LB líquido com ampicilina e tetraciclina e mantidas a 37°C por 16 a 18 horas, sob agitação (150 rpm).

O DNA plasmidial das bactérias, contendo os fragmentos clonados, foi extraído por mini-preparação de plasmídeo (Mini-Prep), seguindo o protocolo adaptado de Sambrook *et al.* (1989). Após o crescimento, 500 µL de cada cultura foi transferida para um tubo *ependorf* com 100 µL de glicerol 70% e armazenada em freezer -80 °C, para a solução estoque.

O restante das culturas foi transferido para tubos *ependorf* que foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto, os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos bacterianos eluídos em 100 µl de Solução I (23 mL de Glicose 20%; 10 mL de EDTA 0,5M – pH 8,0; 13 mL de Tris HCL 1M – pH 7,4; água destilada para completar o volume final de 500 mL). Em seguida procedeu-se a lise alcalina das células com 200 µL de Solução II (0,2 N de NAOH e 1% de SDS) e após a homogeneização por inversão, as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos. Posteriormente, cada tubo recebeu 150 µL de Solução III (60 mL de Acetato de potássio 5M; 11,5 mL de Ácido acético glacial e 28,5 mL de água destilada), foram agitados cuidadosamente e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm, para separação do DNA celular dos restos bacterianos. Os sobrenadantes de cada tubo foram transferidos para outros tubos contendo 5 µL de Rnase e incubados por 60 minutos a 65°C e 5 minutos a 85°C. A separação das fases foi realizada com a adição de igual volume de uma solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (1:1:1) e posterior centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos a 4 °C. A primeira fase do sobrenadante foi transferida para um tubo e o DNA plasmidial foi precipitado com dois volumes de etanol 100%, a reação foi incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Os sedimentos foram lavados com 200 µL etanol 70%, incubados no gelo por 5 minutos e centrifugados a 14.000

rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado secar a temperatura ambiente, por no mínimo 30 minutos e reidratado com 20 µL de água Mili Q estéril.

Para verificar a eficiência da extração do DNA plasmidial, os produtos da extração foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%.

SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento dos fragmentos clonados foi realizado com o kit DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator Cycle v. 3.1 e o equipamento ABI PRISM , Applied Biosystems. A reação de sequenciamento foi realizada com 2 µL de cada fragmento, 1 µL de Big Dye, 1 µL de *primer* M13 (5 pmol/µL) (reverse), 1,5 µL de tampão do Big Day e água Mili Q estéril em quantidade suficiente para completar um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: 39 ciclos de 96 °C por 15 minutos, 50 °C por 1 minuto e 60°C por 4 minutos.

As amostras foram precipitadas com 40 µL de Isopropanol 65%, mantidas no escuro, em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O isopropanol foi removido invertendo-se a placa com movimento brusco e os sedimentos foram lavados com 400 µL de etanol 60% e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. O etanol foi removido por movimento brusco e com um “spin” da placa invertida em uma centrifugação em 800 rpm por 30 segundos. As amostras foram secas a 37 °C por 15-30 minutos e posteriormente foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturada a 93°C por 3 minutos, colocadas no gelo e encaminhadas ao seqüenciador.

As seqüências geradas foram submetidas ao Blast (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleotídeos (BlastN) e proteínas (Blastx) e comparados com as seqüências depositadas no National Center for Biotechnology Information - NCBI (GenBank)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e ao Banco de dados do Centro Universitário Nilton Lins, para confirmação da identidade do transcrito selecionado.

RESULTADOS

A concentração do RNA total extraído do fígado de tambaqui alimentado com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia foi bastante variada, apresentando valores médios entre $0,58 \pm 0,01$ até $1,61 \pm 0,36$ (Tabela 2). Todas as amostras utilizadas para a síntese de cDNA apresentaram dois fragmentos visíveis em gel de agarose desnaturante (Figura 2), com poucos sinais de degradação. Em caso de amostras degradadas, nova extração de RNA total era realizada, até que o padrão de um bom RNA fosse visualizado no gel.

Tabela 2. Concentração do RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), extraído do fígado de tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentado com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia.

Período de Alimentação	Ração Controle	Ração + Munguba	Ração + Catoré	Ração + Embaúba	Ração + Jauari	Ração + Camu-Camu
1 dia	$0,660 \pm 0,05$	$0,610 \pm 0,16$	$0,685 \pm 0,015$	$0,580 \pm 0,01$	$0,660 \pm 0,21$	$0,760 \pm 0,16$
15 dias	$0,850 \pm 0,25$	$0,790 \pm 0,11$	$0,920 \pm 0,18$	$0,880 \pm 0,28$	$0,600 \pm 0,00$	$0,710 \pm 0,11$
30 dias	$1,610 \pm 0,36$	$0,850 \pm 0,25$	$1,050 \pm 0,05$	$1,425 \pm 0,02$	$0,950 \pm 0,05$	$1,400 \pm 0,40$
Privação Alimentar	$1,145 \pm 0,25$	$1,325 \pm 0,12$	$1,270 \pm 0,07$	$1,160 \pm 0,23$	$1,245 \pm 0,05$	$1,055 \pm 0,13$

Os valores estão expressos como média das réplicas de cada tratamento \pm SEM.

Os 3 tipos de oligonucleotídeos dT ancorados (AAGCT₁₁A, AAGCT₁₁C e AAGCT₁₁G) foram eficientes para a síntese dos cDNA, que foram avaliados em gel de agarose 1% (Figura 3).

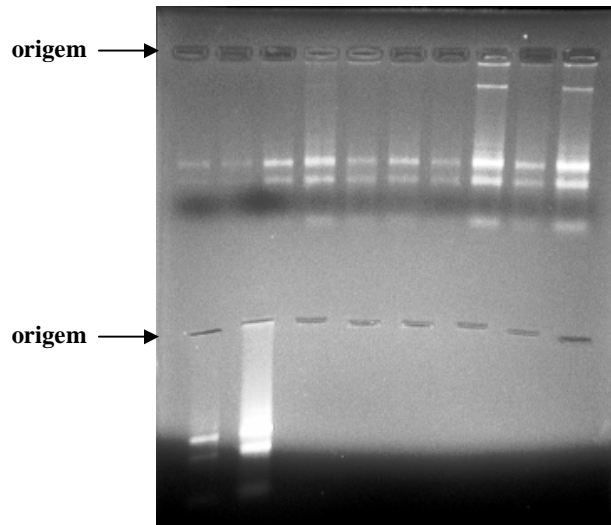


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose desnaturante do RNA total do fígado de *Colossoma macropomum* alimentado com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia.

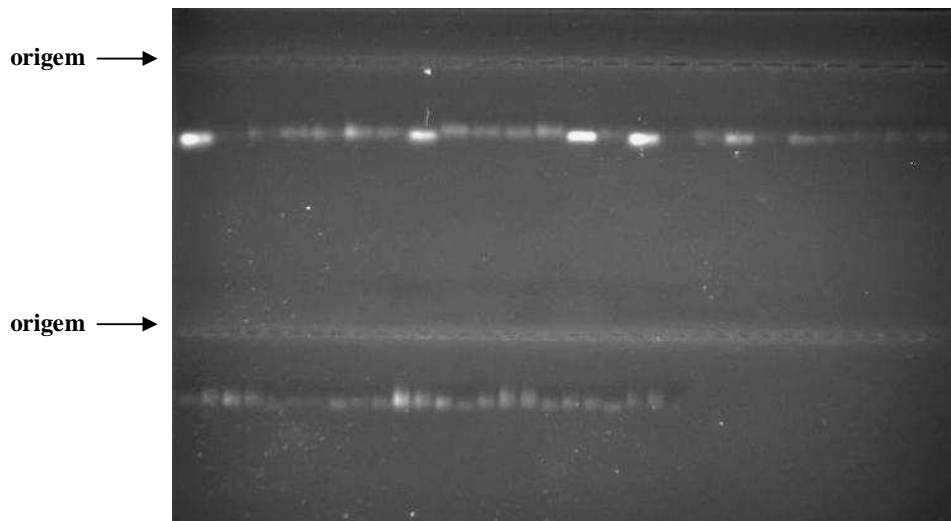


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% do cDNA de *Colossoma macropomum* sintetizado com os oligos dT ancorados.

A combinação dos 3 tipos de oligo dT usados na síntese de cDNA, em conjunto com os 3 *primers* arbitrários (MOB1, MOB 5 e PAI 2), geraram diferentes géis para cada período de alimentação (1, 15 e 30 dias) e para a privação alimentar.

A Figura 4 mostra o perfil em gel de agarose 2% da amplificação do cDNA de fígado de tambaqui alimentado com as rações experimentais por 1 dia, usando o *primer* arbitrário PAI 2.

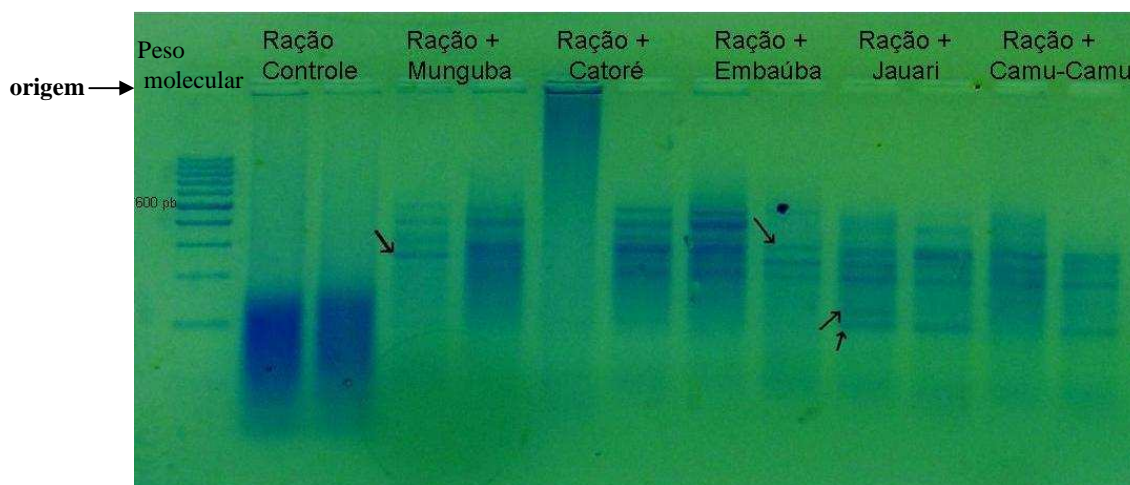


Figura 4. Perfil da expressão diferencial de genes do fígado de *Colossoma macropomum*, alimentado com as rações experimentais por 1 dia, usando o *primer* PAI 2. As setas indicam aos transcritos diferencialmente expressos.

Os fragmentos observados nos géis apresentaram tamanhos entre 600 a 200 pares de bases e a corrida em gel de agarose permitiu que esses fragmentos fossem separados, possibilitando o isolamento dos transcritos selecionados.

Dos fragmentos observados, 57 foram selecionados, ligados em Vetor pGEM[®]-T e clonados em bactéria *E. coli*, linhagem Mos Blue. O resultado da transformação das bactérias foi verificado através da cultura dessas células em meio LB sólido contendo IPTG e substrato cromogênico X-GAL. Somente as colônias brancas indicavam aquelas que receberam o Vetor pGEM[®]-T contendo o fragmento selecionado. Dos 57 fragmentos selecionados, apenas 34 foram clonados com sucesso.

Os DNAs plasmidiais das bactérias clonadas com sucesso, foram extraídos por “Mini-Prep” e os resultado das extrações foram observados em gel de agarose 1% (Figura 5). As bandas que apareceram no gel referem-se às três formas do DNA plasmidial que podem ser encontrados após sua extração das bactérias clonadas: a forma circular, a forma linear e a forma torcida. Os DNAs plasmidiais que apresentaram integridade e ausência de contaminação de RNA foram submetidos ao sequenciamento.

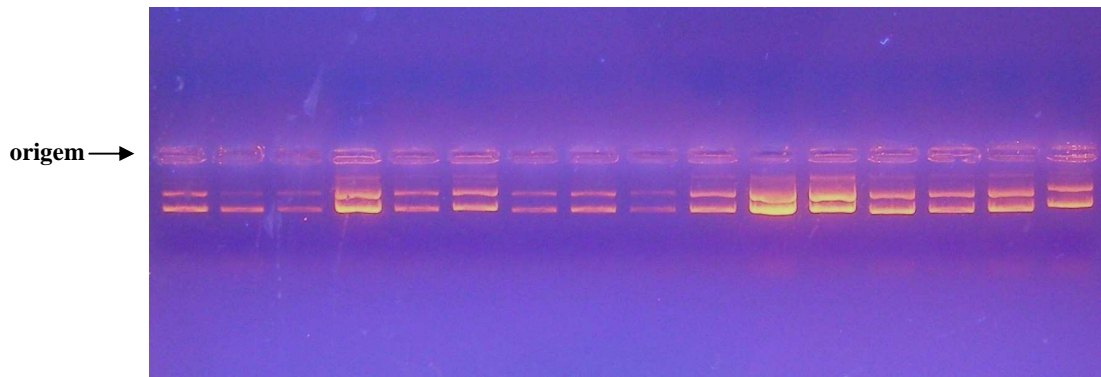


Figura 5. Resultado da extração do DNA plasmidial, através de “Mini-Prep”.

Os fragmentos clonados foram seqüenciados e analisados no programa VecScrem (NCBI - National Center for Biotechnology Information) para a retirada da seqüência do vetor. Esta análise gerou 26 seqüências que foram submetidas ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), os resultados de 23 seqüências são mostrados na Tabela 3, já que 03 seqüências submetidas ao BLAST só apresentaram similaridade com o Vetor pGEM[®]-T.

Nem todos os fragmentos clonados resultaram em seqüências com similaridade a proteínas conhecidas. De acordo com a análise realizada, 07 seqüências não apresentaram similaridades com aquelas depositadas no GenBank e 02 seqüências foram proteínas não identificadas.

Tabela 3 - Transcritos diferencialmente expressos detectados pela DDRT-PCR e comparados ao banco de dados do GenBank.

Número do Fragmento	Condição de alimentação	Combinação entre Oligo dT e Primer arbitrário	Similaridade encontrada no BLAST	e - value
01	30 dias	dT – G, MOB-1	Nenhuma similaridade	-----
02	30 dias	dT – G, MOB-1	Nenhuma similaridade	-----
11	30 dias	dT – G, MOB-5	Nenhuma similaridade	-----
47	01 dia	dT – C, PAI-2	Nenhuma similaridade	-----
48	01 dia	dT – C, PAI-2	Nenhuma similaridade	-----
53	Privação alimentar	dT – C, PAI-2	Nenhuma similaridade	-----
54	Privação alimentar	dT – C, PAI-2	Nenhuma similaridade	-----
56	Privação alimentar	dT-G, PAI-2	Produto de proteína não-identificado	3e- 35
57	Privação alimentar	dT-G, PAI-2	Produto de proteína não-identificado	7e- 21
50	15 dias	dT-G, MOB-5	Microsatélite de salmão	7e- 6
09	30 dias	dT-G, MOB-5	Microsatélite de salmão	3e- 9
38	15 dias	dT-C, PAI-2	Proteína hipotética (DNA humano)	0,64
03	Privação Alimentar	dT-G, MOB-1	Adenilato Quinase 2 de <i>Danio rerio</i>	3e- 3
52	Privação alimentar	dT-C, MOB-1	Proteína hipotética TVAG_369910	3e -32
43	1 dia	dT-A, PAI-2	Proteína Titin	7e-101
46	1 Dia	dT – C, PAI-2	Proteína Titin	7e-101
49	Privação alimentar	dT-A-PAI-2	Proteína Titin	7e-101
41	15 dias	dT-A, MOB-5	Superóxido Dismutase –Mn	2e-11
55	Privação alimentar	dT-C, PAI-2	Superóxido Dismutase –Mn	2e-11
40	15 dias	dT-C, PAI-2	Apolipoproteína	3e- 6
42	1 dia	dT-A, PAI-2	Apolipoproteína	3e- 6
46	1 dia	dT-C, PAI-2	Apolipoproteína M	3e- 3
34	15 dias	dT-C, MOB-5	Citocromo P 450 (20A1)	4e -34

A Tabela 3 apresenta os dados do BLAST realizado no banco de dados GenBank do NCBI, em função do período de alimentação e da combinação do tipo de Oligo dT e *primers* arbitrários. É apresentando também o valor do *e-value*, que é a probabilidade de um dos resultados de uma busca ter acontecido ao acaso. Portanto, quanto menor o valor, melhor é o

resultado. Valores de *e-values* menores que zero são expressos como potência de 10; por exemplo, 10^{-30} é o mesmo que e-30. Uma similaridade é relevante quando o *e-value* for menor que $1e^{-4}$.

Dentre as proteínas identificadas, destacamos aquelas cuja expressão parece estar ligada à alimentação experimental, são elas: Adenilato quinase (AK), Superóxido dismutase-Mn (SOD); Citocromo P450 (CYP 20A1) e Apolipoproteína (APO). As Figuras 6, 7, 8 e 9 mostram os fragmentos que apresentaram similaridade com essas proteínas.

As seqüências da Superóxido dismutase Mn (SOD), do Citocromo P450 e da Apolipoproteína (APO) foram formadas através de *contigs*, a seqüência da Adenilato quinase foi obtidas através da comparação de uma seqüência *singlet*.

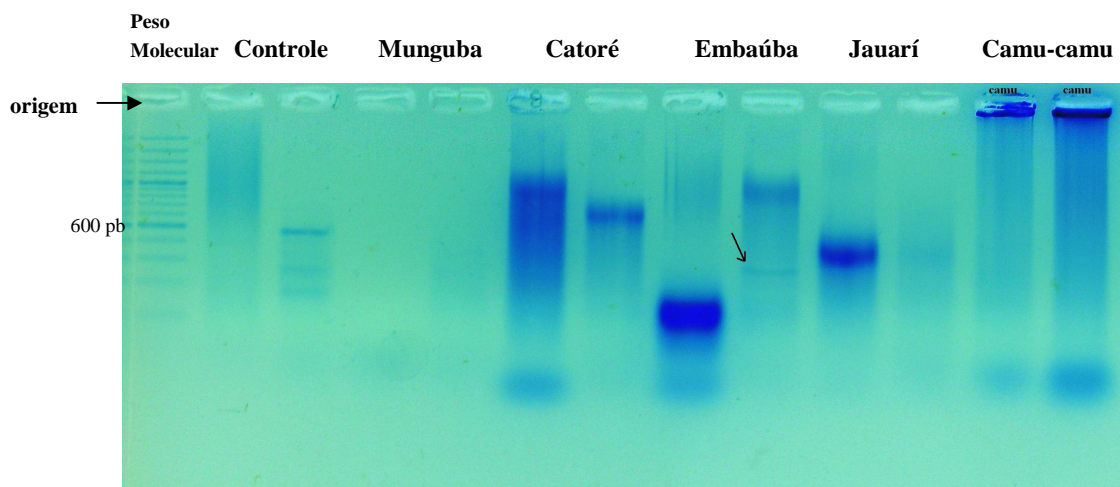


Figura 6. Fragmento de DNA de *Colossoma macropomum* com similaridade à enzima Adenilato Quinase 2 (AK2) no período de privação alimentar.

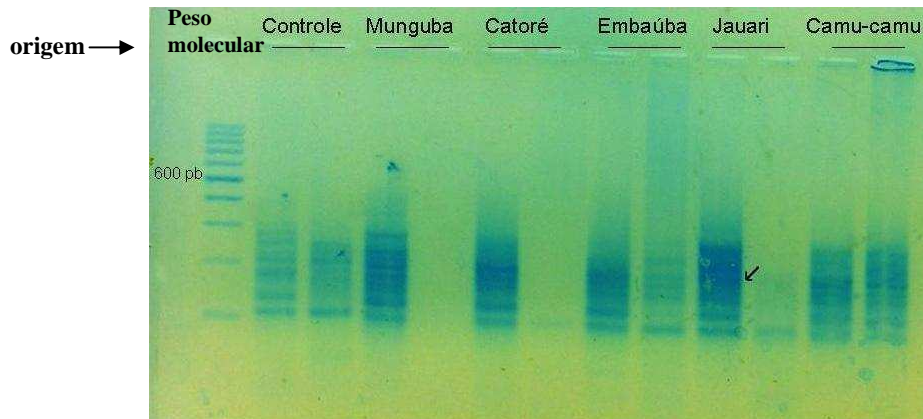


Figura 7. Fragmento de DNA de *Colossoma macropomum* com similaridade à enzima Superóxido dismutase – Mn (SOD) no período de privação alimentar

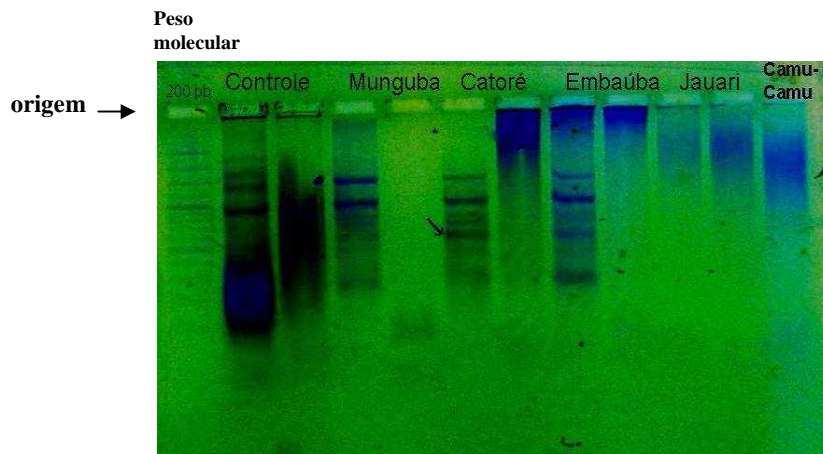


Figura 8. Fragmento de DNA de *Colossoma macropomum* com similaridade à enzima Citocromo P450 (CYP 20A1) no período de 15 dias de alimentação.

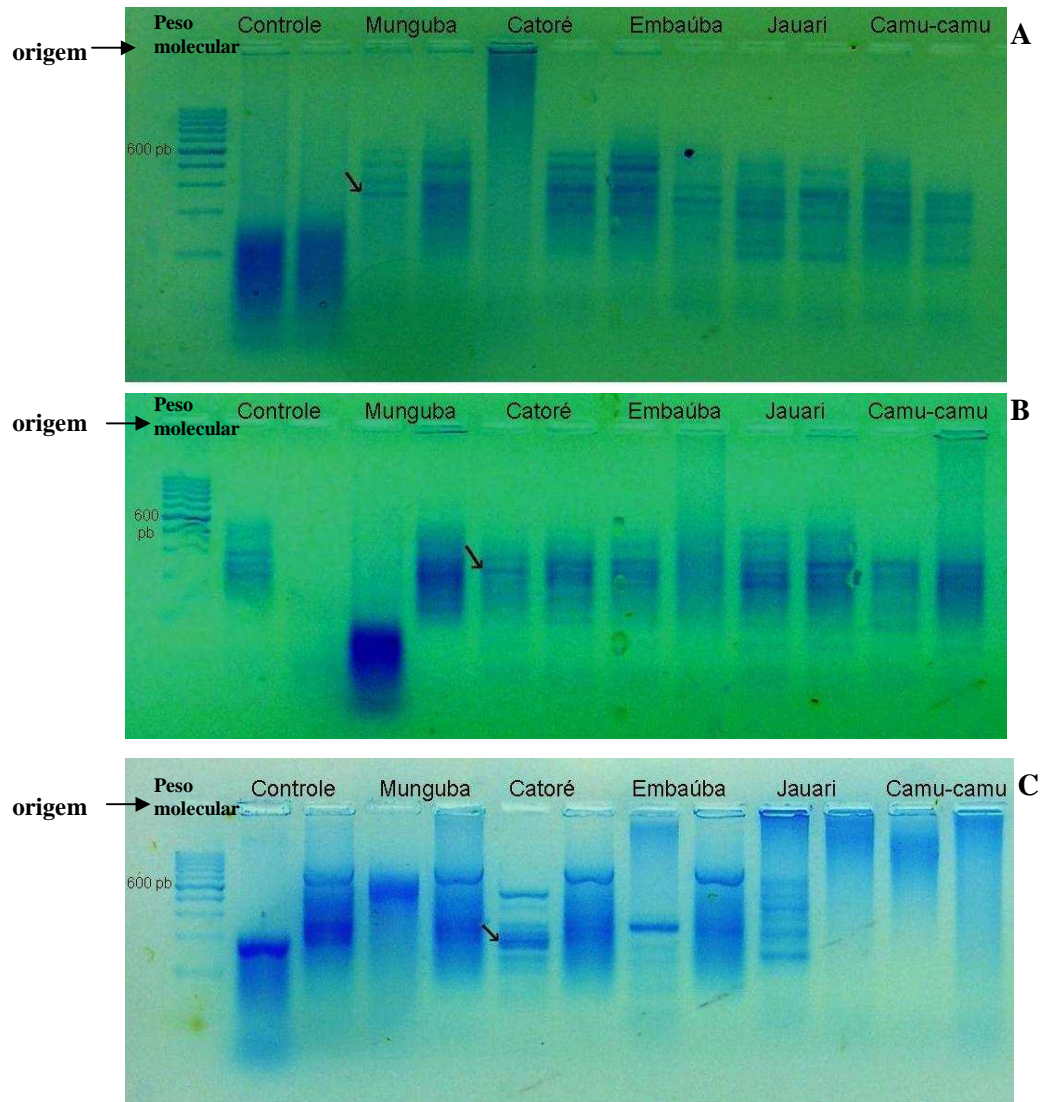


Figura 9. Fragmentos de DNA de *Colossoma macropomum* com similaridade a proteína Apolipoproteína (APO). A e B no período de 1 dia de alimentação e C no período de 15 dias de alimentação.

Tabela 4 - Transcritos diferencialmente expressos por tratamento e condição alimentar

Número do fragmento	Condição de alimentação	Fruto	Similaridade no Blast
03	Privação alimentar	Embaúba	Adenilato Quinase 2
34	15 dias de alimentação	Catoré	Citocromo P450 (20A1)
41 e 55	15 dias de alimentação	Munguba	Superóxido Dismutase – Mn
40, 42 e 46	Privação alimentar	Jauari	Apolipoproteína
	15 dias de alimentação	Jauari	
	1 dia de alimentação	Munguba	
	1 dia de alimentação	Catoré	

Dois fragmentos encontrados nos peixes que receberam ração com munguba durante 15 dias e nos peixes que foram submetidos à privação alimentar após receber ração com jauari, apresentaram similaridade com a enzima anti-oxidante Superóxido dismutase-Mn. Os peixes que receberam ração suplementada com munguba e posteriormente foram submetidos à privação alimentar, apresentaram um fragmento com similaridade à enzima Adenilato quinase 2. O fragmento que apresentou similaridade com a enzima de desintoxicação Citocromo P450 foi encontrado nos peixes que receberam ração suplementada com catoré por 15 dias. Três fragmentos expressos em peixes que receberam ração suplementada com munguba e catoré por 1 dia e com jauari por 15 dias (Tabela 4), apresentaram similaridade com a Apolipoproteína, principal constituinte da Lipoproteína de alta densidade (HDL).

DISCUSSÃO

Neste experimento, o fígado foi o tecido utilizado para a análise da expressão diferencial de genes em tambaqui alimentado com ração suplementada com frutos e sementes da Amazônia. O fígado desempenha um papel fundamental no metabolismo dos nutrientes absorvidos no trato digestivo e é igualmente importante para o metabolismo e desintoxicação de agentes que podem acompanhar os itens alimentares (Olsivik *et al.*, 2007).

A padronização da extração do RNA do fígado apresentou dificuldades, uma vez que as amostras de RNA, em muitos momentos, se apresentavam degradadas quando observada

em gel desnaturante. Este problema foi solucionado reduzindo o tempo de armazenamento do tecido (Freezer -80°C) procedendo a extração do RNA logo após a dissecação do órgão, ou quando isso não era possível, armazenando o tecido em períodos curtos de até 15 dias.

A integridade do RNA é essencial ao se trabalhar com expressão gênica. Cuidados especiais devem ser tomados durante o isolamento das amostras de RNA para que estejam livres da presença de contaminantes (Malhotra *et al.*, 1998). A qualidade e integridade do RNA são fundamentais para assegurar uma quantificação válida da concentração do RNA nas amostras (Gilsbach *et al.*, 2006) e esta etapa é importante para a síntese de cDNA e consequentemente para a comparação entre os padrões da expressão de genes das amostras.

O estudo das diferenças nos modelos de expressão gênica é um dos mais promissores processos para o entendimento dos mecanismos de diferenciação e desenvolvimento. E, entre as técnicas, o DD-PCR tem sido aplicado com sucesso em várias áreas, pois sua maior vantagem está na simplicidade e possibilidade de detectar virtualmente todo o mRNA expresso quando usadas combinações de *primers* suficientes (Kazian & Kirsch, 1999).

Embora esta técnica tenha facilitado a identificação dos genes diferencialmente expressos, o DD-PCR é limitado por apresentar uma reprodutibilidade variada, redundância dos transcritos de mRNA e um significativo índice de falso positivo (fragmentos que não representam genes diferencialmente expressos) (Mahadeva *et al.*, 1998). Porém, com o avanço da técnica, a porcentagem de falsos positivos fica entre 25 – 30% (Malhotra *et al.*, 1998).

Apesar dessas desvantagens, neste experimento foi possível identificar seqüências de transcritos que apresentaram similaridade com os genes que expressam as proteínas titin, apolipoproteína e citocromo P450 e as enzimas adenilato quinase e superóxido dimutase-Mn.

A proteína Titin, também denominada TTN ou “Conectin”, é uma proteína gigante, constituída por um filamento único, longo, de aproximadamente 30.000 amino-ácidos (Labeit *et al.*, 1997), expressa principalmente em tecido muscular. Sua função está relacionada à contração e elasticidade muscular, através da transmissão de força na linha Z e na manutenção da tensão de descanso na região da banda I (Itoh-Satoh *et al.*, 2002).

A expressão desta proteína no fígado de peixes alimentados com frutos e sementes da Amazônia, detectada neste trabalho, provavelmente está relacionada à musculatura lisa presente no fígado que contaminou a amostra durante a extração de RNA, não estando relacionada às condições experimentais às quais os peixes foram submetidos. Portanto, tornam-se necessários outros estudos para determinar se a sua expressão está sendo influenciada pelos tipos de dietas experimentais.

A Adenilato Quinase (AK) faz parte de uma família de enzimas fortemente conservada, que catalisa a reação reversível de transferência de fósforo do ATP (adenosina tri-fosfato) para o AMP (adenosina mono-fosfato), formando duas moléculas de ADP (adenosina di-fosfato) (Bruin *et al.*, 2004). Esta reação é regulada pela disponibilidade de AMP ou ADP (Stanojevic *et al.*, 2008). Atualmente, três isozimas principais de Adenilato Quinase (AK1, AK2 e AK3) são descritas em vertebrados. Cada isozima tem uma distribuição celular distinta e um substrato preferencial, onde a AK1 está localizada no citoplasma e o ATP é o substrato; a AK2 catalisa a mesma reação que a AK1, mas está localizada no espaço intra-membrana das mitocôndrias e a AK3, que está presente na matriz mitocondrial e tem como substrato preferencial a GTP, em detrimento à ATP (Yoneda *et al.*, 1998).

A AK1 citoplasmática participa do metabolismo energético quando níveis locais do fosfato de alta energia são baixos, sustentando os níveis do ATP celular à custa do ADP (Yoneda *et al.*, 1998). Segundo Souza-Júnior *et al.* (2005) a atividade da AK1 em células

musculares pode sofrer influência das espécies reativas de oxigênio (ERO). Os autores destacam que durante o esforço físico, o metabolismo muscular produz precursores de ERO. Esses precursores acumulam-se nos tecidos e órgãos e o primeiro efeito de tamponação do conteúdo de ATP muscular é a e a hidrólise da fosfocreatina. A subsequente diminuição do fornecimento de ATP pode levar a um transitório acúmulo de ADP, a qual estimula a reação catalisada pela AK formando AMP, que rapidamente é desaminado formando IMP e amônia pela ação da enzima AMP desaminase. O IMP (inosina mono-fosfato) é transformado em hipoxantina.

Filler & Criss (1971) estudando o desenvolvimento da enzima Adenilato Quinase no fígado de rato, observaram que quando um tecido está sob um abastecimento de energia razoavelmente constante, uma atividade (ou a habilidade de manter a homeostase de energia) muito pequena da AK é esperada; mas, quando o abastecimento de energia muda repentinamente, a atividade da AK do fígado aumenta.

Estas informações são confirmadas neste experimento, onde o fragmento que apresentou similaridade no BLAST com a enzima Adenilato Quinase foi isolado de tambaqui que recebeu a ração suplementada com embaúba, submetido a posterior período de privação alimentar, indicando que este fruto não foi capaz de suprir a demanda energética após o peixe ser submetido à condição estressante de privação alimentar.

A enzima Superóxido dismutase (SOD) faz parte do sistema de defesa antioxidante dos animais, minimizando o estresse oxidativo gerado pelas espécies reativas ao oxigênio (ERO). A geração de ERO é uma condição inevitável do metabolismo do oxigênio em organismos aeróbicos (Johnson *et al.*, 2002), e os peixes, como todos os animais aeróbicos, são suscetíveis aos efeitos da ERO e por isso apresentam um inerente e efetivo sistema de defesa aos agentes oxidativos (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). Este sistema envolve enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px), que

agem diretamente nos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, convertendo-os em espécies menos reativas (Scandalios, 2005).

A SOD desempenha um papel importante na via antioxidante como a 1ª linha de defesa contra o estresse oxidativo por catalisar a molécula reativa do oxigênio ($O\cdot^-$) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é posteriormente reduzido à água pela catalase (Mruk *et al.*, 2002; Hartog *et al.*, 2003).

Em animais aquáticos várias condições são relatadas como indutoras de estresse oxidativo, principalmente os efeitos de poluentes (Yin, *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2006) e hipóxia (Sampaio *et al.*, 2008).

Além dos estudos realizados com as condições indutoras de estresse oxidativo, alguns autores têm apresentado resultados sobre os efeitos da alimentação nas respostas a esse tipo de estresse. Rueda-Jasso *et al.* (2004) mostraram que a espécie de peixe *Solea senegalensis* apresenta aumento significativo da atividade da SOD quando alimentadas com dietas com alto nível de energia não-protéica. Pascual *et al.* (2003) observaram aumento na atividade da SOD em *Sparus aurata* submetidos a períodos de restrição e privação alimentar. Este mesmo comportamento foi observado por Morales *et al.* (2004) em *Dentex dentex* submetidos à privação alimentar; porém, a atividade da SOD voltou ao nível normal quando foram re-alimentados.

Para manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação da ERO, alguns autores sugerem o uso de agentes antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico (vitamina C), o alfa-tocoferol (vitamina E) e o beta caroteno (precursor da vitamina A) (Lee *et al.*, 1998). Nesse sentido, as vitaminas e flavonóides presentes nos frutos mostram efeitos antioxidantes, atuando no controle das concentrações de O_2^- e H_2O_2 (Bianchi & Antunes, 1999). Neste experimento não foi possível observar o efeito protetor das vitaminas e agentes antioxidantes presentes nos frutos utilizados na suplementação das rações. Isto pode ter

acontecido em virtude do tipo de processamento realizado durante a confecção dessas rações, que após a mistura com os frutos e repeletização, foram submetidas à secagem em estufa a 55 °C por um período de 12 horas. Este processo pode ter ocasionado a perda ou inativação das vitaminas e outros agentes antioxidantes.

Cho *et al.*, (2006) destacaram que mudanças na atividade da enzima SOD em tecidos de peixes têm sido observadas como respostas comuns e extensivamente usadas como importantes bioindicadores de estresse oxidativo. Porém, estes estudos têm se baseado apenas em métodos bioquímicos, como medidas de atividades da enzima em extratos de tecidos. Os autores enfatizam que apesar da importante contribuição dessas metodologias, a regulação transcricional dos níveis de mRNA da SOD em peixes tem sido pouco estudada.

A expressão da enzima Superóxido Dismutase foi verificada neste experimento em peixes submetidos à privação alimentar. Esse resultado condiz com os encontrados por Pascual *et al.* (2003) que observaram um aumento na atividade da SOD em exemplares de *Sparus aurata* que receberam níveis de ração referentes a 1, 0,5% e 0% da biomassa, quando comparados com os que receberam 2%. Observaram também, por análise de isozimas, mudanças no padrão da SOD, onde os peixes controle (2%) apresentaram duas bandas referentes à enzima SOD-Mn e três bandas referentes a SOD-Cu e Zn. Os peixes submetidos à privação alimentar apresentaram duas bandas de tamanho intermediário a dos peixes controle, caracterizando uma nova isoforma da SOD, que desapareceu após a retomada da alimentação dos peixes com níveis de 2% da biomassa.

Esses resultados indicam que a enzima SOD comporta-se como indicador do estresse oxidativo em consequência de uma dieta imprópria nos peixes. A análise da atividade das enzimas GST e Catalase (Figuras 5 e 6 – Capítulo I), realizadas em tambaquis alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes da Amazônia demonstraram que a atividade destas enzimas aumentou no decorrer do período experimental,

independentemente do fruto utilizado, indicando que a mudança na expressão da SOD, que é uma das enzimas do sistema de defesa antioxidante, pode ter ocorrido em função do acúmulo de ERO nos tecidos desses animais.

A outra proteína que apresentou similaridade com fragmentos gerados pela técnica do DD-PCR no tabaqui foi a Apolipoproteína M (Apo M). As apolipoproteínas são os principais componentes protéicos das lipoproteínas e são classificadas em apo A (apoA-I, apoA-II e apoA-IV), apo B (apoB-100 e apoB-48), apo C (apoC-I, apoC-II, apoC-III), apo E (Novak & Bydlowski, 1996) e apo M (Xu & Dahlbäck, 1999). A apolipoproteína M (apo M) é uma proteína recentemente descoberta, bastante expressa no fígado e no rim dos vertebrados (Zhang *et al.*, 2007; Feingold *et al.*, 2008). É encontrada em todas as classes principais das lipoproteínas. Porém, a maior parte da apo M é encontrada nas lipoproteínas de alta-densidade (HDL) (Faber *et al.*, 2004).

Recentemente experimentos indicaram que a apo M é necessária para a formação do pré β - HDL e efluxo do colesterol para o HDL, sugerindo efeito protetor contra arteriosclerose. Zhang *et al.*, (2007) demonstraram que hiperglicemia em ratos provoca queda nos níveis de apo M e que a concentração de glicose de 30mM inibe significativamente a expressão dessa proteína em cultura de hepatoblastoma linhagem Hepg 2. Em humanos o nível de apo M está correlacionado principalmente ao colesterol total do plasma, onde a produção de apo M conduz a uma diminuição nos níveis de colesterol (Feingold *et al.*, 2008), mas esse mecanismo ainda não é muito bem conhecido (Faber *et al.*, 2004).

Feingold *et al.* (2008) demonstraram que os níveis de mRNA hepático e dos rins de ratos de laboratório e os níveis de circulação da apo M no plasma diminuem durante processos de inflamação e infecção, concluindo que a apo M apresenta uma resposta aguda negativa, que decresce durante estes processos. As implicações fisiológicas e patológicas da

queda dos níveis da apo M ainda não estão claras e os autores sugerem que, assim como a alta expressão da apo M reduz a arterioesclerose, a diminuição dos níveis dessa proteína pode acelerar o desenvolvimento de doenças.

Além do papel no transporte reverso do colesterol e das propriedades antiarteriogênicas, muitas outras funções são atribuídas ao HDL e as apolipoproteínas em mamíferos. Porém, para os outros grupos animais, como os peixes, as informações são limitadas e a relevância fisiológica da expressão das diferentes apolipoproteínas nos tecidos está provavelmente subestimada (Concha *et al.*, 2003). Estes autores mostraram que a presença da apolipoproteína A-I, presente na pele da carpa (*Cyprinus carpio*) pode estar ligada à atividade antimicrobiana e destacam que é improvável que a HDL e suas apolipoproteínas sintetizadas e segregadas na epiderme deste peixe participem somente da homeostase do colesterol, especialmente em se tratando do local, onde uma quantidade importante de proteína estaria sendo constantemente perdida do revestimento do muco para o meio aquático. Os autores sugerem que esta proteína poderia desenvolver importante papel na proteção da pele da carpa, assim como em outros teleósteos.

Estas informações são corroboradas por Villarroel *et al.* (2007) que demonstraram a atividade antimicrobiana da apo A-I em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e por Johnston *et al.* (2008) que purificaram a apo A I do plasma de peixes *Morone saxatilis*, examinando *in vitro* sua atividade antibacteriana contra *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* e *Mycobacterium marinum*. Seus resultados indicaram que esta proteína é um agente antibacteriano eficaz em concentrações abaixo dos níveis fisiológicos do plasma.

Neste experimento, os peixes alimentados com dietas suplementadas com frutos e sementes não apresentaram sinais visíveis de infecções ou inflamações que pudessem sugerir mudanças nos níveis de expressão da apolipoproteína em função destes fatores. As informações geradas até agora sobre o papel biológico da apo M em peixes torna este gene

um candidato a futuras investigações sobre as funções metabólicas e sua regulação em função da dieta alimentar desses animais.

A enzima citocromo P450 (CYP) compreende uma superfamília de hemoproteínas que catalisa a oxidação de uma variedade de produtos químicos exógenos, bem como substratos endógenos tais como esteróides e ácidos graxos, vitaminas e prostaglandinas (Nelson *et al.*, 1996). Este sistema está presente em diferentes tecidos como rim, pulmão, pele, intestino, córtex adrenal, testículo, placenta e outros, mas é particularmente ativo no fígado (Orellana & Guajardo, 2004).

Sua expressão e atividade são influenciadas por diversos fatores como a idade, sexo, dieta, espécie, tecido e estado hormonal (Coon *et al.*, 1992). Olsvik *et al.* (2007), demonstraram que a CYP é transcrita desigualmente em diferentes partes do fígado de salmão (*Salmo salar*), expostos por sete dias a β - naftoflavona. Estes autores observaram que a transcrição desta enzima foi mais elevada na seção média do fígado, quando comparada com as partes proximais e distais do órgão, sugerindo que a transcrição aconteça principalmente nos hepatócitos e que aqueles que estão mais próximos dos vasos sanguíneos que chegam ao fígado, respondem mais fortemente à ação do xenobiótico.

Considerando as funções metabólicas do Citocromo P450 e todos os fatores que influenciam na sua expressão, tornam-se indispensáveis estudos mais aprofundados para determinar o envolvimento desta enzima nas respostas à introdução de frutos e sementes na dieta de tambaqui.

CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho constituem o primeiro estudo sobre expressão gênica diferencial em peixes alimentados com adição de frutos e sementes da Amazônia em suas rações.

A técnica do DD-PCR possibilitou a análise da expressão dos genes regulados pela alimentação de tambaqui com dietas suplementadas com frutos e sementes da Amazônia, em diferentes períodos de alimentação (1, 15 e 30 dias) e submissão a privação alimentar.

Os fragmentos de DNA isolados demonstraram similaridade com os genes das enzimas Adenilato quinase, Superóxido dismutase, Apolipoproteína e Citocromo P450.

A presença da enzima antioxidante sugere a necessidade de um melhor monitoramento nos níveis de vitaminas das rações, com a inclusão de frutos que atendam à demanda necessária para melhorar o status da defesa oxidativa da espécie e no tipo de processamento utilizado para a confecção das rações experimentais, para que não haja influência na concentração ou atividade dos agentes antioxidantes presentes nos frutos.

Sete transcritos selecionados neste experimento não apresentaram similaridades com seqüências depositadas no GenBank e 2 transcritos foram considerados produtos de proteínas não identificados. Essas seqüências são candidatas a futuras investigações para a compreensão de processos específicos do metabolismo dos animais alimentados com rações suplementadas com frutos e sementes Amazônia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de frutos e sementes na suplementação de rações para peixes criados em cativeiro na Amazônia é uma prática viável para a região. Alguns estudos têm se dedicado a investigar o efeito da introdução de frutos, sementes e subprodutos vegetais na ração de peixes, através de análises de dados biométricos, de digestibilidade, efeitos hematológicos, enzimáticos e citogenotóxicos. Neste trabalho foram utilizadas respostas fisiológicas e citogenotóxicas para se avaliar o efeito da inclusão de frutos na ração de tambaqui.

Porém, para colaborar com a busca de novas informações sobre os efeitos causados pela suplementação das rações comerciais com frutos e semente, propusemos também avaliar estas respostas através da expressão diferencial de genes. Análise de expressão gênica ainda não é uma ferramenta utilizada com muita frequência em trabalhos com alimentação de peixes. Entretanto, pode oferecer informações sobre mudanças que ocorrem em grupos de muitas enzimas ou proteínas ao mesmo tempo, cuja atividade seria difícil de avaliar, necessitando de análises específicas para cada uma destas enzimas/proteínas em particular.

Embora a técnica do “Differential Display PCR”, utilizada neste trabalho para identificar genes diferencialmente expressos, apresente algumas limitações, com índices de falso positivo entre 25 a 30%, necessitando do auxílio de outras técnicas para a validação de seus resultados a confiabilidade dos dados foi sustentada pela identificação dos genes responsáveis por enzimas e proteínas descritas na literatura como indicadoras do estado nutricional de peixes e também por medidas paralelas, como os resultados bioquímicos e fisiológicos, que indicaram que os frutos adicionados à ração não preveniram as EROS, provavelmente em função do tipo de processamento realizado na confecção dessas rações.

Os dados encontrados por Pascual *et al.* (2003) indicam que a enzima SOD comporta-se como indicador do estresse oxidativo em consequência de uma dieta

inadequada nos peixes. Mudanças nos níveis da expressão do gene da Apolipoproteína M estão correlacionadas com alterações nos níveis de colesterol do plasma (Feingold *et al.*, 2008), embora este mecanismo ainda não esteja totalmente descrito, e a atividade da Adenilato Quinase esteja relacionada ao requerimento energético do organismo.

As perspectivas desta pesquisa relacionam-se à validação dos transcritos diferencialmente expressos, através da PCR em tempo real, que é uma metodologia confiável, capaz de quantificar a concentração do produto de PCR gerado durante cada ciclo de amplificação. Porém, será necessário repetir os experimentos de alimentação de tambaqui com as rações suplementadas com frutos, para garantir o isolamento de RNA de alta qualidade, que não interfira na precisão dos resultados da PCR em tempo real. A integridade do RNA é essencial para a validade da quantificação dos genes expressos, uma vez que estudos recentes demonstraram que a degradação da amostra altera significativamente a estabilidade do gene de referência (Gilsbach *et al.*, 2006).

Serão desenhados *primers* com base nas seqüências obtidas dos fragmentos diferencialmente expressos e testados nas amostras. A partir daí obteremos quantidade apropriada de ácido nucléico alvo durante cada ciclo de amplificação da PCR.

Com estes procedimentos será possível observar se ocorrem diferenças significativas na expressão dos genes da Apolipoproteína, Adenilato Quiase, Superóxido Dismutase e Citocromo P450 em tambaqui alimentado com rações suplementadas com diferentes frutos e sementes da Amazônia.

Aliado a isto, estaremos analisando também os níveis de vitaminas B, caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (Vitamina C) e alfa-tocoferol (provitamina E) das rações contendo frutos e sementes da Amazônia para verificar a presença desses agentes anti-oxidantes após as etapas de preparo e processamento das rações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhan, K.G.; Hashen, M.B.; Abu-Shabana, M.B.; Kamel, A.H. 2000. Vitamina C deficiency in the catfish *Clarias gariepius*. *Aquacult. Nutr.*, 6: 129-139.
- Alceste, C.C.; Jory, D.E. 2000. Tilapia – Alternative protein source in tilapia feed formulation. *Aquacul. Maneg.*, 26(4).
- Almeida, G. S. de C. 2003. Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Dissertação de mestrado*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 47 p.
- Almeida, L. C. de. 2006. Perfil digestivo e metabólico de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), alimentados com diferentes teores de proteínas e lipídios. *Disertação de mestrado*. São Carlos: UFSCar. 77 p.
- Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. 186 p.
- Aride, P. H. R. 2003. Vitamina E em dietas para tambaqui (*Colossoma macropomum*): determinação dos níveis ideais, efeito sinérgico da vitamina C, e interação com o ferro. Manaus/Am. *Tese de Doutorado*. INPA/FUA. 129p.
- Baldisseroto, B. 2004. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria. Ed. UFSM.
- Barcellos, L.J.G.; Kreutz, L.c.; Souza, C. De; Rodrigues, L.B.; Fioreze, I.; Quevedo, R.M.; Cericato, L.; Soso, A.B.; Fagundes, M.; Conrad, J.; Lacerda, L.A.; Terra, S. 2004 Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, 237: 229-236.
- Bianchi, M.L.P.; Antunes, L.M.G.1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição*, 12(2):123-130
- Brow, B.A. 1976. *Hematology: principles and procedures*. 2ª ed. Philadelphia. Lea & Febiger.
- Bruin, W. de; Oerlemans, F.; Wieringa, B. 2004. Adenylate kinase I does not affect cellular growth characteristics under normal and metabolic stress conditions. *Experimental Cell Research*, 297: 97– 107.
- Bücker, A.; Carvalho, W.; Alves-Gomes, J.A. 2006 . Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta amazônica*, 36(3): 357 – 364
- Carneiro, D.J. 1981. Digestibilidade protéica em dietas isocalóricas para o tambaqui, *Colossoma macropomun* CUVIER (Pisces, Characidae). *In: Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Jaboticabal: Associação Brasileira de Aqüicultura, p. 78-80.

- Carrasco, K. R.; Tilbury, K.L.; Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 47:2123–2136.
- Carter, C.G.; Houlihan, D.F.; Kiessling, A.; Medale, M.; Jobling, M. 2001. Physiological effects of feeding. *In: Houlihan, D.F.; Boujard, T.; Jobling, M. (Eds). Food intake in fish.* Blackwell Science. 448p.
- Carvalho, S.R. 1998. Efeito da privação alimentar sobre aspectos hematológicos e bioquímicos de *Colossoma macropomun* (Serrasalminidae). Relatório PIBIC. INPA/FUA. Manaus, AM. 15 p.
- Castagnolli, N. 2000. Piscicultura intensiva e sustentável. *In: Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.* W.C. VALENTI; C. R. POLI; J. A. PEREIRA & J. R. BORGHETTI (Ed.). 399p.
- Chagas, E. C. 2001. Influência da suplementação do ácido ascórbico (Vitamina C) sobre o crescimento e a resistência ao estresse em tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). *Dissertação de Mestrado.* INPA/FUA. Manaus/AM. 80 p.
- Chagas, E. C.; Val, A. L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos em tambaquis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(3): 397-402.
- Cho, Y.H.; Yoo, S.D.; Sheen, J. 2006. Regulatory functions of nuclear hexokinase I complex in glucose signaling. *Cell.*, 127: 579-589.
- Claro-Jr, L.; Ferreira, E.; Zuanon, J. Araújo-Lima, C. 2004. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazônica*, 34(1):133-137.
- Concha, M.I., Molina, S., Oyarzun, C., Villanueva, J., Amthauer, R., 2003. Local expression of apolipoprotein A-I gene and a possible role for HDL in primary defense in the carp skin. *Fish Shellfish Immunol.* 14, 259–273
- Coon, M.J.; Ding, X.; Pernecky, S.J.; Vaz, A.D.N. 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J*, 6: 669-73.
- Corrêa, M. P. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas.* Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. Vol 1 a 6.
- Cuenco, M.; Stickney, R.; Grant, W. 1999. Fish bioenergetic and growth in aquiculture points: II. Effects of interactions among size, temperature, dissolved oxygen, unionized ammonia and food on growth for individual fish. *Ecological Modeling*, 27: 191-206.
- Cyrino, J.E.; Kubitzka, F. 1996. *Piscicultura.* Ed. Sebrae. Coleção Agroindústria. Cuiabá-MT. 8: 86-90.
- De la Higuera, M. 1987. Requerimientos de proteína y aminoácidos en peces. *In: CAICYT. Nutrición en Acuicultura II. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura.* Madrid, España. p. 53-98.

- Faber, K., O. Axler, B. Dahlback, and L. B. Nielsen. 2004. Characterization of apoM in normal and genetically modified mice. *J. Lipid Res.*, 45: 1272–1278
- Fagbenro, O.; Adedire, C.O.; Ayotunde, E.O.; Amine, E.O. 2000. Haematological profile food composition and digestive enzyme assay in the gut of the African bony-tongue fish, *Heterostis (Clupisudis) niloticus* (Cuvier, 1829) (Osteoglossidae). *Tropical Zoology*, 13: 1-9
- Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrit.*, 18:872-879.
- Figueiredo-Garutti, M.L.; Navarro, I.; Capill, E.; Souza, R.H.S.; Moraes, G.; Gutiérrez, J.; Vicentini-Paulino, M.L.M. 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 132: 467–476
- Filler, R.; Criss, W.E. 1971. Development of Adenylate Kinase Isoenzymes in Rat Liver. *Biochem. J.*, 122: 553-555.
- Fracalossi, D. M.; Allen, M. E.; Nichols, D. K.; Oftedal, O. T. 1998. Oscars, *Atrionotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *Journal of Nutrition*, 128(10):1745-1751.
- Francis, G.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199: 197-227
- Freeman, W.M.; Robertson, D.J.; Vrana, K.E. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*, 29:1042-1055.
- Gilsbach, R.; Kouta, M.; Bönisch, H.; Brüß, M. 2006. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*, 40: 173-177.
- Gornati, R.; Terova, G.; Vigetti, D.; Prati, M.; Saroglia, M. & Bernadini, G. 2004. Effects of population density on seabass (*Dicentrarchus labrax*, L.) gene expression. **Aquaculture**, 230: 229-239.
- Goulding, M. 1980. *The fish and the forest. Exploration in Amazonian Natural History*. Los Angeles: University of California Press. 280p.
- Graef, E. W. 1995. As espécies de peixes com potencial para a criação no Amazonas. In: Criando peixes na Amazônia. A.L. Val & A. Honczaryk. (Eds.). p. 29-43.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. 1974. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journ. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Oxford.

- Hartog, G.J.M.D.; Haenen, G.R.M.M.; Vegt, E.; Vijgh, W.J.F.; Bast, A. 2003. Superoxide dismutase: the balance between prevention and induction of oxidative damage. *Chem.-Biol. Interact.*, 145: 33– 39.
- Heddler, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Ticker, J.D.; Vanparys P.; MacGregor, J.T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18: 277-291.
- Hepher, B. 1993. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge: Cambridge University. 406 p.
- Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M., De La Higuera, M. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 183– 193.
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N.1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton Univ. Press. Princeton. 53 p.
- IBAMA. 1989. *Criação de peixes*. Diretoria de Recursos Naturais e Desenvolvimento. Departamento de Pesca. Brasília. 28 p.
- Imperatriz-Fonseca, V.; Por, F. D. 2003. Floresta Amazônica. <http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/ecossist/amazon/apresent.htm>. Acessado em 20 de julho de 2004
- Itoh-Satoh, M.; Hayashi, T.; Nishi, H.; Koga, Y.; Arimura, T.; Koyanagi, T.; Takahashi, M.; Hohda, S.; Ueda, K.; Nouchi, T.; Hiroe, M.; Marumo, F.; Imaizumi, T.; Yasunami, M.; Kimura, A. 2002. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 291: 385-393.
- Ituassú, D. R.; Santos, J. R. S. Dos; Roubach, R.; Pereira-Filho, M. 2004. Desenvolvimento de tabaqui submetido a períodos de privação alimentar. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39(12):1199-1203.
- Jacob, R.A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, New York, 15 (5):755-766.
- Johnson, D.A.; Andrews, G.K.; Xu, W.; Johnson, J.A. 2002. Activation of the antioxidant response element in primary cortical neuronal cultures derived from transgenic reporter mice. *J Neurochem*, 81:1233-1241
- Johnston, L.D.; Brown, G.; Gauthier, D.; Reece, K.; Kator, H.; Veld, P.V. 2008. Apolipoprotein A-I from striped bass (*Morone saxatilis*) demonstrates antibacterial activity in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 1-9.
- Kalyane, M.; Michaelidis, B.; Mouton, K.1993. Effects on adenosine on glucose metabolism of *Rana ridibunda* erythrocytes. *Journal Experiment Biology*. 177:41-50.
- Kampen, E.J.; Zijlstra, W.G. 1964. Standardization of hemoglobinometry: II. The hemoglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta* 6: 538-544.

- Kozian, D.H.; Kirschbaum, B.J. 1999. Comparative gene-expression analysis. *TIBTECH*, 17:73-77.
- Kubitza, F. 1998. *Nutrição e alimentação de peixes cultivados*. Campo Grande, MS. 44p.
- Labeit, S.; Kolmerer, B.; Linke, W. 1997. The giant protein titin: emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circulation Research*, 80: 290-294.
- Lee, K.J.; Kim, K.W.; Bai, S.C. 1998. Effects of different diet levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 29: 237-244.
- Liang, P. & Pardee, A. B. 1997. *Methods in molecular biology: Differential display methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 306 p.
- Lilleeng, E.; Froystad, M.K.; Ostby, G.C.; Valen, E.C.; Krogdahl, A. 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin RNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147: 25-36.
- Lin, Y.H.; Shiau, S.Y. 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture*, 248: 235-244
- Lorenzi, H. 1996. *Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas*. Nova Odessa, SP: Editora Plantarium.
- Lorenzi, H.; Melo Filho, L. E. de. 2001. *As plantas tropicais de R. Burle Marx*. São Paulo: Editora Plantarium de Estudo da Flora. 488 p.
- Loureiro, A. A.; Silva, M. F. da.. 1968. *Catálogo das madeiras da Amazônia*. Ministério do Interior. SUDAM.
- Love, R.M.; Black, D. 1994. Dynamics of stored energy in the North sea cold *Gadus morhua* and cultured rainbow trout, *Salmo gairdineri*. *Comp. Physiol. Zool.* 63: 630-638.
- Lovell, T. 1988. *Nutrition and feeding of fish*. New York: Capman & Hall, 259 p.
- Lovshin, L. L; Cyrino, J. E. P.1998. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. *In: Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes*, 2. Piracicaba. *Anais*. p. 1-20.
- Lundsteadt, L. M. 2003. Aspectos adaptativos dos processos digestivos e metabólicos de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscan*) arraçados com diferentes níveis de proteína e energia. *Tese de doutorado*. São Carlos: UFSCar. 140 p
- Machado, C.R., Garofalo, M.A.R., Roselino, J.E.S., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H. 1988. Effects of starvation, refeeding and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71: 429-437.

- Mahadeva, H.; Starkey, M.P.; Sheikh, F.N.; Mundy, C.R.; Samani, N.J. 1998. A Simple and Efficient Method for the Isolation of Differentially Expressed Genes. *J. Mol. Biol.*, 284: 1391-1398
- Maia, L. M. de A. 2001. *Frutos da Amazônia : fonte de alimento para peixes*. Manaus: SEBRAE /AM – Programa de Desenvolvimento Empresarial Tecnológico. 143 p.
- Malhotra, K.; Foltz, L.; Mahoney, W.C.; Schueler, P.A. 1998. Interaction and effect of annealing temperature of primer used in Differential Display – RT – PCR. *Nucleic Acid Research*, 26: 854-856.
- Marcon, J.L.; Wilhelm Filho, D. 1999. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 123: 257–263
- Martinez-Alvarez, R.M.; Morales, A.E.; Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15: 75-88.
- Maués, M. M.; Couturier, G. 2002. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 5(4): 441-448.
- McCord, J., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108(8): 652–659.
- MacFarlane, W.J.; Cubitt, K.F.; Williams, H.; Rowsell, D.; Moccia, R.; Gosine, R.; McKinley, R.S. 2004. Can feeding status and stress level be assessed analyzing patterns of muscle activity in swimming rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)? *Aquaculture*, 239: 467-484.
- Melo, J.F.B.; Tavares-Dias, M.; Lundstedt, L.M.; Moraes, G. 2006. Efeito do conteúdo de proteína na dieta sobre os parâmetros hematológicos e metabólicos do bagre sul americano *Rhamdia quelen*. *Revista Ciência Agroambiental*, 1 (1): 43-51.
- Mendes, F.A. 2001. Efeito da vitamina D no ganho de peso e nos níveis de cálcio e fósforo inorgânico de *Colossoma macropomum* (Characiformes, Serrasalminidae). Manaus/Am. *Dissertação de mestrado*. INPA/FUA. 63p.
- Merola, N.; Cantelmo, O.A. 1987. Growth, conversion and mortality of cage-reared tambaqui, *Colossoma macropomum*, fed various dietary feeding regimes and protein levels. *Aquaculture*, 66: 223-233.
- Mesquita-Saad, L. S. B. de. 2001. O teor de Vitamina C em peixes da Amazônia: aspectos adaptativos. *Tese de Doutorado*. PPG-INPA/FUA. Manaus/AM. 120 p.
- Millward, D.J. 1989. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture*, 79:1-28.

- Moberg, G. P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. *In*: Moberg, G.; Mench, J. A. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Davis: University of California. p.1-22.
- Morales, A.E.; Pérez-Jiménez, A.; Hidalgo, A.C., Abellán, E.; Cardenete, G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 139:153–161
- Mori-Pinedo, L.A. 1993. Estudo da possibilidade de substituição do fubá de milho (*Zea mays* L.) por farinha de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em rações para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). *Dissertação de Mestrado*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. 66p.
- Mori-Pinedo, L. A.; Pereira Filho, M.; Oliveira-Pereira, M. I. de. 1999. Substituição do fubá de milho (*Zea mays*, L.) por farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*, H.B.K.) em rações para alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). *Acta Amazônica*, 29(3): 447-453.
- Mourente, G.; Díaz-Salvago, E.; Bell, J. G.; Tocher, D.R. 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture*, 214: 343–361.
- Mruk, D.D.; Silvestrini, B.; Mo, M.Y.; Cheng, C.Y. 2002 Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65: 305-311.
- Nelson, D.R. et al. 1996. CYP450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6 (1): 1-42.
- Novak, E. M.; Bydlowski, S. P. 1996. Biologia molecular das dislipidemias: variação genética das apolipoproteínas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 67: 411-417.
- Ogata, H.Y.; Oku, H.; Murai, T. 2002. Growth performance and macronutrient retention of offspring from wild and selected red sea bream (*Pagrus major*). *Aquacult.* 206: 279-287.
- Ohkawa, H. 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction *Analyt. Biochem.*, 95: 351-358.
- Oishi, C.A. 2007. Resíduo da castanha da Amazônia (*Bertholletia excelsa*) como ingrediente em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomun*). *Dissertação de mestrado*. Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/FUA. Manaus/AM. 60 p.
- Oliveira, A. M. de. 2005. Aspectos fisiológicos e bioquímicos do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) alimentado com dietas suplementadas por frutos e sementes de áreas alagadas. *Dissertação de mestrado*. Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/FUA. Manaus/AM. 73p.

- Oliveira, A.M.; Val, A.L.; Chagas, E.C.; Roubach, R. 2001. Efeito da temperatura sobre os parâmetros hematológicos de *Colossoma Macropomun* alimentado com vitamina C. relatório PIBIC. INPA/FUA. Manaus-AM.
- Olsvik, P.A; Lie, K.K.; Saele, O.; Sanden, M. 2007. Spatial transcription of CYP1A in fish liver. *BMC Physiology*, 7:12
- Orellana, M.; Guajardo, V. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile*, 132: 85-94.
- Palhares, D & Grisolia, C. K.2002. Comparision between the micronucleus frequencies of Kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 25 (3): 281-284.
- Parolin, P. 2002. Life history and environment of *Cecropia latiloba* in Amazonian floodplains. *Revista de Biologia Tropical*, 50(2):531-545.
- Pascual, P; Pedrajas, J.R.; Toribio, F.; López-Barea, J.; Peinado, J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*, 145:191-199.
- Pereira-Filho, M. 1995. Alternativas para a alimentação de peixes em cativeiro. *In: Criando peixes na Amazônia*. A.L. Val & A. Honczaryk. (Eds.). p. 75-82.
- Pereira-Filho, M.; Fonseca, F.A.L.; Silva, J.A.M.; Brandão, L.V. 2008 Nutrição e boas práticas de manejo em aquicultura1. *PUBVET*, 2(18):1 -27.
- Picard, D. J.; Schulte, P. M. 2003. Variation in gene expression in response to stress in two populations of *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 137: 205-21.
- Piedras, S.R.N.; Pouey, J. L. O. F.; Moraes, P.R.R; Rodrigues, F. R. 2006. Resposta de alevinos de jundiá (*rhamdia* sp.) alimentados com diferentes níveis de proteína bruta e energia digestível. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12(2): 217-220.
- Pinto, L. G. Q.; Pezzato, L. E.; Miranda, E. C. de; Barros, M. M. 2001. Desempenho do piaçu (*Leporinus macrocephalus*) arraçoado com dietas contendo diferentes teores de tanino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30 (4): 1164-1171.
- Pretti, E.; Cavalcante, D.; Simonato, J.D.; Martinez, C.B.R. 2007. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG. 1-2
- Rhodes, L. D.; Van Beneden, R. J. 1996. Gene expression analysis in aquatic animals using differential display polymerase chain reaction. *In: Techniques in Aquatic Toxicology*. Ostrander, G. K. (ed.). CRC Press.
- Roubach, R. 1991. Uso de frutos e sementes de florestas inundáveis na alimentação de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). *Dissertação de mestrado*.

Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/FUA. Manaus/ AM. 79 p.

Rueda-Jasso, R.; Conceição, L.E.C.; Dias, J.; De Coen, W.; Gomes, E.; Rees, J.F.; Soares, F.; Dinis, M.T.; Sorgeloos, P. 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 231: 417–433.

Saint-Paul, U. 1986. Potential for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. *Aquaculture*, 54: 205-240.

Sakai H, Ikari A, Shimizu T, Sato T; Takeguchi N. 1998. Cyclic GMP-dependent cytoprotection against ethanol-induced damage in rabbit isolated gastric parietal cells. *Eur J Pharmacol.*, 361:109–117.

Salati, E.; Santos, A. A.; Lovejoy, T. E.; Klabin, I. 1998. *Porque salvar a Floresta Amazônica*. Manaus: INPA. 114 p.

Saldaña, A.L.; Lopez, M.E.M. 1988. Formulación y evaluación de dietas para *Colossoma macropomun* en México. *Anais do VI Simpósio Latinoamericano de Acuicultura e V Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*, Florianópolis- SC. 323-336.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659 p.

Sampaio, F.G.; Boijink, C.L.; Oba, E.T.; Santos, L.R.B.; Kalinin, A.L.; Rantin, F.T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147: 43–51.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Aranda, A.; Madrid, J.A. 2001. Differential Effects of Meal Size and Food Energy Density on Feeding Entrainment in Goldfish. *Journal of Biological Rhythms*, 16(1): 58-65.

Scandalios, J. G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 995-1014

Silva, J. A. M. da. 1996. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) nas florestas inundáveis da Amazônia Central. *Tese de doutorado*. Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/UFAM. Manaus/AM. 142 p.

Silva, J. A. M.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M. I. de. 2000. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) natural food. *Revista Brasileira de Biologia*, 60 (4): 599-605.

Silva, J. A. M.; Pereira-Filho, M.; Oliveira-Pereira, M. I. De. 2003. Valor nutricional e energético de espécies vegetais importantes na alimentação do tambaqui. *Acta Amazônica*, 33(4): 687-700.

Silva, J. A. M.; Pereira-Filho, M.; Cavero, B. A. S.; Oliveira-Pereira, M. I. 2007. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) *Acta Amazônica*, 37(1): 157 - 164

Silva, M. F. da. 1977. *Nomes vulgares de plantas da Amazônia*. Belém, INPA. 222 p.

Silva, S.S.; Anderson, T.A.1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*. Chapman and Hall, London. 319 p.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrology, morphology of the rivers courses, and river types. *In: The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. SIOLI, H. (Ed.). Junk Publishers. Netherlands. 580 pp.

Souza Junior, T.P.de; Dubas, J.P.; Pereira, B.; Oliveira, P.R. de. 2005. Efeitos da suplementação com CrH₂O sobre a quimioluminescência urinária em universitários submetidos a 8 semanas de treinamento de força. *Conexões*, 3 (2): 62-73.

Sperandio, L. M. *Manejo nutricional e alimentar para peixes em taque-rede: noções gerais*. Disponível em <http://www.abrappesq.com.br/materia3.htm>. Acessado em 24/05/2008.

Stanojevic, V.; Habener, J. F.; Holz, G.G.; Leech, C.A. 2008. Cytosolic adenylate kinases regulate K-ATP channel activity in human b-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368: 614–619.

Steffens, W. 1989. *Principles of fish nutrition*. Chichester: Ellis Horwood. 384 p.

Suares, M.D.; Hidalgo, M.C.; Garcia-Gallego, M.; Sanz, A.; De La higuera, M. 1995. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A(3): 421-428.

Takahasi, A.; Prada, M.; Cahanio, H.; Vieira, E. M. 1994. Consumo de sementes de *Pseudobombax munguba* (Bombacaceae) e *Cecropia* sp. (Cecropiaceae) por peixes em uma área de floresta inundada da Amazônia. *Projeto Livre 4 – Ecologia da Floresta Amazônica*. OTS/UNICAMP.

Takahashi, N. S. *Nutrição de peixes*. Disponível em: <http://www.abrappesq.com.br/materia11.htm> . Acessado em 24/05/2008

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. 1ª ed. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, v. 1000. 144p.

Tavares-Dias, M.; Sandrim, E.F.S.; Moraes, F.R.; Carneiro, P.C.F. 2001. Physiological responses of tambaqui *Colossoma macropomun* (Characidae) to acute stres. *B. Inst. Pesca*, 27(1):43-48.

- Tice, R. 1995. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. *In*: Phillips, D. H.; Vennit, S. (Eds.). Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK. p. 315-339.
- Val, A.L., Almeida-Val, V. M. F. 1995. *Fishes Of The Amazon And Their Environment: Physiological And Biochemical Aspects*. Hidelberg : Springer. p.224.
- Valvanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ.*, 64, 178–189.
- Vijayan, M.M.; Moon, T.W. 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food – deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. Journ. Fish Aquat. Sci.*, 49: 2260-2266.
- Villachica, H. L. 1996. *El cultivo del cultivo de camu-camu (Myrciaria dubia (H.B.K.) McVaugh) en la Amazonia peruana*. Lima: Mirigraf.
- Villarroel, F.; Bastías, A.; Casado, A.; Amthauer, R.; Concha M.I. 2007. Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: Evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 197-209
- Waldhoff, D. & Alencar, L. M. de. 2000. Production and chemical composition of fruit from trees in floodplain Forest of Central Amazônia and their importance for fish production. *In*: The Central Amazon Floodplain: actual use and options for a sustainable management.
- Waldhoff, D.; Maia, L. A. de. 2000. Production and chemical composition of fruit from trees in floodplain Forest of Central Amazônia and their importance for fish production. *In*: The Central Amazon Floodplain: actual use and options for a sustainable management. Junk, W.J.; Ohly, J.J.; Piedade, M.T.F.; Soares, M.G.M. (eds). Leiden: Backhuys Publishers. 584 p.
- Waldhoff, D.; Saint-Paul, U.; Furch, B. 1996. Value of fruits and seeds from the floodplain forest of Central Amazonia as food resource for fish. *Ecotropica*, 2: 143-156.
- Wells, R.M.G., Baldwins, J., Seymour, R.S., Christian, K. & Brittain, T. 2005. Red blood cell function and haematology in two tropical freshwater fishes from Australia. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 141: 87-93.
- Wilson, R.P.1989. Amino acid and proteins. *In*: Halver, J. (Ed). Fish nutrition. Washington: Academic Press.
- Xu, N.; Dahlbäck, B. 1999. A novel human Apolipoprotein (ApoM). *J Biol Chem.*, 274 (44): 31286-31290
- Yin, Z.; Milatovic, D.; Aschner, J.L.; Syversen, T.; Rocha, J.B.T.; Souza, D.O.; Sidoryk, M.S.; Albrecht, J.; Aschner, M. 2007. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res.*, 1131:1–10

Yoneda, Y.; Sato, M.; Maeda, M.; Takagi, H. 1998. Identification of a novel adenylate kinase system in the brain: Cloning of the fourth adenylate kinase. *Molecular Brain Research*, 62: 187–195

Yuyama, K.; Aguiar, J. P. L.; Yuyama, L. K. O. 2002. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. *Acta Amazonica*, 32(1): 169-174.

Zhang, W. J.; Bird, K. E.; McMillen, T. S.; LeBoeuf, R. C.; Hagen, T. M.; Frei, B. 2007. Dietary alpha-lipoic acid supplementation inhibits atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient and apolipoprotein E/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 117: 421-8