



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

Efeitos da alta densidade e jejum nas modificações
do metabolismo intermediário do pargo (*Pagrus
pagrus*)

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

INÊS VIANA ROSA

Faro 2008



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais



Efeitos da alta densidade e jejum nas modificações do metabolismo intermediário do pargo (*Pagrus pagrus*)

Dissertação de mestrado integrado em Engenharia Biológica

INÊS VIANA ROSA

Orientador:
Professor Doutor Raúl Laíz – Carrión

Co-orientador:
Professora Doutora Débora Power
Professor Doutor Juan Miguel Mancera

Faro 2008

Declaração

O conteúdo, execução do trabalho experimental e interpretação de resultados são da exclusiva responsabilidade da autora.

Inês Viana Rosa

Agradecimentos

Agradeço à Doutora Débora pela incansável ajuda na procura do estágio ideal e por todo o apoio em todo este processo.

Le agradezco al Doctor Juan Mancera por concederme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio. Por todo su apoyo, atención, disponibilidad y conocimientos transmitidos.

Le agradezco también al Doctor Raúl Laíz – Carrión por la paciencia, ayuda y atención siempre que fue necesario.

No puedo dejar de citar a Nacho y darle gracias por su paciencia, su buen humor y por haberme enseñado todas las técnicas de laboratorio. Junto a él mis agradecimientos a los colegas de laboratorio Lucho, Yvette, Yoli y Varela por la forma en que me recibieron, su compañerismo y disposición.

Agradezco a todas las personas que me recibieron de la mejor manera posible en Cádiz y que hicieron que me sintiera como en casa. Hoy los considero grandes amigos y a ellos les deseo lo mejor.

Em particular, agradeço ao Tomás “el brasileño y su péle”, pelas correções linguísticas, pela amabilidade, amizade e claro pelos jantares, as sobremesas e por ter sempre a porta de sua casa aberta para as portuguesas, “valeu carinha”.

Agradeço à Sara que foi sem dúvida a melhor companheira de Erasmus, o seu apoio, humor, amizade e carinho não têm preço.

Agradeço aos meus colegas de curso que me proporcionaram um percurso académico magnífico e que sem eles tudo teria sido bem mais difícil, em particular, ao “grupo de combate”, pois sem eles a finalização desta tese seria impossível.

Agradeço aos meus amigos, que mais uma vez demonstraram que qualquer que seja o obstáculo da minha vida, eles estão presentes.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio e interesse demonstrado em tudo o que faço.

E por último agradeço aos meus pais e à minha irmã, pois sem eles nada disto seria possível. Agradeço aquilo que são e aquilo que fizeram, para que eu fosse hoje o que sou. O amor, o carinho e a amizade que sinto por vocês não tem palavras. Obrigada por tudo.

Abreviaturas

AA totais – aminoácidos totais

Abs – absorvância

ACTH – hormona adrenocorticotrófica

AGS – amiloglicosidase

ATP – Adenosina trifosfato

BCA – Bovin serum albumin

BSA – ácido bicinconínico

CoA – Coenzima A

CRH – corticotropina

Cu – cobre

Cu⁺ – ião cobre

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FSI – índice de gorduras

glc - glicose

H – hidrogénio

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogénio

HSI – índice hepatossomático

KHCO₃ – bicarbonato de potássio

Mg²⁺ – ião magnésio

MSH – hormona estimulante dos melanócitos

NaCl – cloreto de sódio

NAD – nicotinamida adenina dinucleótido

NADH – nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

O₂ – Oxigénio

OH – hidróxido de hidrogénio

PCA – ácido perclórico

PF – peso fresco

R1 – frasco com tampão

R2 – frasco com enzimas

rpm - rotação por minuto

TAG – triglicéridos

U.V – ultra violeta

VSI – índice viscerossomático

Resumo

A biotecnologia pode ser definida, numa perspectiva alargada, como a utilização de seres vivos viáveis, ou porções deles activas, para a produção de bens e serviços. Desta forma a biotecnologia animal requer o conhecimento fisiológico da espécie e como esta reage em ambientes diferentes do seu habitat considerando normal. O jejum e a densidade alta são factores de stresse importantes e habituais em explorações aquícolas e que podem influenciar o metabolismo intermediário dos peixes. No presente estudo pretendeu-se examinar a influência destes, no metabolismo intermediário do pargo (*Pagrus pagrus*), analisando as alterações ao nível dos seus parâmetros plasmáticos, hepáticos e musculares. Desta forma os peixes foram mantidos durante 21 dias em quatro tratamentos diferentes, i) baixa densidade (4Kg/m^3) e alimentado, ii) baixa densidade e em jejum, iii) alta densidade (50Kg/m^3) e alimentado e iv) alta densidade e em jejum. Depois de 14 e 21 dias os exemplares foram pesados, medidos, sacrificados e calculados os diferentes índices (viscerossomático; hepatossomático; e gorduras) e foram retiradas as amostras de plasma, fígado e músculo, de forma a avaliar os parâmetros plasmáticos (cortisol, glicose, triglicéridos, lactato e proteínas), parâmetros hepáticos (glicose, glicogénio, triglicéridos e aminoácidos livres) e parâmetros musculares (glicose, glicogénio, triglicéridos, lactato e aminoácidos livres). Como principais observações, verificou-se que condições de alta densidade e jejum, provocam aumentos nos níveis de cortisol plasmático, principal indicador da activação da resposta de stress em conjunto com um decréscimo nos restantes parâmetros plasmáticos. O decréscimo dos níveis de lactato pode estar ligado à sua utilização como substrato na gliconeogénese hepática. Os níveis de triglicéridos e proteínas apresentaram um decréscimo sugerindo um aumento do metabolismo lipídico e um aumento da sua utilização como fonte de combustível, respectivamente. A nível hepático verificou-se um aumento dos potenciais de gliconeogénese e glicogenólise, observado através da diminuição dos níveis de glicogénio. No músculo as principais observações foram uma diminuição dos níveis de aminoácidos livres sugerindo que estes são a principal fonte de energia dos peixes, ajudando a manter os níveis de glicose.

Palavras-chave: *Pagrus pagrus*, stresse, alimentação, jejum, cortisol.

Abstract

Biotechnology can be defined in a wide perspective as the use of viable living beings, or active portions of these ones, for the production goods and services. Thus, animal biotechnology requires knowledge about the physiology of species, and how these interact with different environments, which are not their natural one. Factors like food restriction and high tank density which influence intermediary metabolism of fish are common in aquaculture.

In the present study the influence of food restriction and crowding on intermediary metabolism of red porgy (*Pagrus pagrus*) was investigated by observing changes in plasmatic, hepatic and muscle parameters. For 21 days, fish were kept on four different treatments, i) fed fish and low density, ii) food-deprived fish and low density, iii) fed fish and high density and iv) food-deprived fish and low density. After 14 and 21 days fish were weighed, measured and viscerosomatic (VSI); hepato-somatic (HIS); and fat, (FSI) indexes determined. Plasma, liver and muscle samples were taken to evaluate plasmatic parameters (cortisol, glucose, triglycerides, lactate and proteins), hepatic parameters (glucose, glycogen, triglycerides and free amino acids) and muscle parameters (glucose, glycogen, triglycerides, lactate and free amino acids). Food-deprivation and high tank density caused plasmatic cortisol levels to rise, the main indicator of stress response activation, along with a decrease in other plasmatic parameters. A decrease in lactate levels may be related to its role as a substrate in hepatic gluconeogenesis. Triglycerides and proteins also decreased suggesting lipid metabolism increased and was the main energy source. An increase in hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis was observed and associated with a decrease in glycogen levels. In muscle a decrease in free aminoacids levels occurred, suggesting they are the main source of energy in red porgy and maintain plasmatic glucose levels.

Keywords: *Pagrus pagrus*, stress, fed fish, food deprived fish, cortisol.

Índice

1.Introdução.....	5
1.1 Interesse da biotecnologia na produção animal.....	6
1.1.1. Modelo experimental.....	7
1.1.2. Distribuição.....	8
1.1.3. Alimentação.....	8
1.1.4. Reprodução.....	9
1.1.5. Interesse para aquacultura.....	9
1.2. Metabolismo intermediário em peixes teleósteos.....	9
1.2.1. Metabolismo de lípidos.....	10
1.2.2. Metabolismo de aminoácidos e proteínas.....	11
1.2.3. Metabolismo de hidratos de carbono.....	11
1.3. Stresse.....	14
1.3.1 Cortisol.....	17
1.3.2 Adaptação geral à situação de stresse.....	18
1.4 Objectivos.....	20
2.Material e Métodos.....	21
2.1 Experiência realizada.....	22
2.1.1 Desenho experimental.....	22
2.1.2 Obtenção das amostras.....	23
2.2 Análise de parâmetros metabólicos no sangue.....	24
2.2.1 Glicose.....	24
2.2.2 Lactato.....	25
2.2.3 Triglicéridos.....	26
2.2.4. Proteínas totais.....	28
2.2.5 Cortisol.....	29
2.3 Análise dos parâmetros metabólicos a nível hepático e muscular.....	29
2.3.1 Procedimento de homogeneização:.....	29
2.4 Análise estatística.....	32
3.Resultados.....	34
3.1 Parâmetros biométricos.....	35
3.2 Factores endócrinos.....	37
3.3 Parâmetros metabólicos do sangue.....	38
3.4 Parâmetros metabólicos hepáticos.....	41
3.5 Parâmetros metabólicos musculares.....	43
4.Discussão.....	47
5. Conclusão.....	54
6. Bibliografia.....	56

Índice de figuras

Figura 1. <i>Pagrus pagrus</i> (Linnaeus, 1758).....	7
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Pagrus pagrus</i>	8
Figura 3. Esquema geral do metabolismo energético.....	10
Figura 4 – Esquema sintetizado das 3 principais vias metabólicas, com destaque para o fígado, sangue e músculo	14
Figura 5 – Estrutura da hormona cortisol.....	17
Figura 6. Principais elementos neuroendócrinos que constituem o sistema de stresse em peixes telósteos, e efeitos fisiológicos da activação do mesmo.....	18
Figura 7 – Esquema do desenho experimental.....	23
Figura 8 – Representação gráfica dos parâmetros que apresentaram diferenças significativas (VSI, HSI, peso do fígado e peso da víscera) ao longo da experiência, para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	37
Figura 9 – Representação gráfica dos níveis de cortisol para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	38
Figura 10 – Representação gráfica dos níveis de glicose no plasma para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	38
Figura 11 – Representação gráfica dos níveis de lactato no plasma para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	39
Figura 12 – Representação gráfica dos níveis de triglicéridos no plasma para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	40
Figura 13 – Representação gráfica dos níveis de proteínas no plasma para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	41
Figura 14 – Representação gráfica dos níveis de glicose e glicogénio no fígado para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	42
Figura 15 – Representação gráfica dos níveis de triglicéridos no fígado para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	42
Figura 16 – Representação gráfica dos níveis de aminoácidos livres no fígado para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	43
Figura 17 – Representação gráfica dos níveis e glicose e glicogénio no músculo para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.....	44

Figura 18 – Representação gráfica dos níveis de triglicéridos no músculo para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.	44
Figura 19 – Representação gráfica dos níveis de lactato no músculo para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.	45
Figura 20 – Representação gráfica dos níveis de aminoácidos no músculo para juvenis de <i>Pagrus pagrus</i> alimentados e em jejum durante 21 dias.	46

Índice de tabelas

Tabela 1 – Valores de parâmetros biométricos para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias..... 35

Tabela 2 – Valores dos índices (viscerossomático (VSI), hepatossomático (HSI) e de gorduras (FSI) para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias.
..... 36

1.Introdução

1.1 Interesse da biotecnologia na produção animal

A biotecnologia pode ser definida, numa perspectiva alargada, como a utilização de seres vivos viáveis, ou porções deles activas, para a produção de bens e serviços. Assim dentro da biotecnologia inclui-se a manipulação genética, a utilização de enzimas e a engenharia de proteínas, a tecnologia de cultura de tecidos animais e vegetais, os biossensores para a monitorização biológica e a tecnologia de processos bioquímicos. A biotecnologia é uma ciência multidisciplinar (englobando química orgânica, bioquímica, microbiologia, biologia molecular e engenharia) pelo que, potencialmente, tem impacto profundo em inúmeras outras áreas, desde a indústria farmacêutica e a medicina à indústria e agropecuária, passando pelo ambiente (Lima e Mota., 2003).

Nos dias de hoje podemos aplicar a biotecnologia em cada uma das seguintes áreas; biotecnologia humana, biotecnologia animal, biotecnologia vegetal, biotecnologia microbiana, e bioprocessos e as suas técnicas usam-se no melhoramento da produção agrícola de espécies vegetais para consumo humano; na produção de peixe em aquacultura; na recuperação de ambientes degradados, no tratamento de esgotos; nas novas tecnologias da saúde que permitem o desenvolvimento e produção de novos instrumentos de diagnóstico e tratamento de doenças até hoje consideradas incuráveis; na reprodução medicamente assistida, na clonagem e em muitas outras áreas, com o âmbito de melhorar a qualidade de vida (www.ordembilogos.pt).

O sucesso da aquacultura depende de 6 factores importantes: (1) controlo completo dos ciclos de reprodução da espécie de peixes em cultura; (2) conhecimento genético; (3) eficiente prevenção e detecção de doenças infecciosas; (4) conhecimento aprofundado das condições óptimas fisiológicas, ambientais e nutricionais para o crescimento e desenvolvimento; (5) fornecimento suficiente de água em excelentes condições e (6) aplicações de técnicas de gestão inovadoras. Estes factores melhoram a indústria da aquacultura, verificando-se um avanço notável durante a última década. Para sustentar este crescimento, no entanto, novos desenvolvimentos de técnicas de biologia molecular e transgénicos terão de ser cada vez aplicadas à indústria da aquacultura. Estas técnicas podem ser empregues para aumentar as taxas de crescimento, controlo dos ciclos de reprodução, melhorar as composições da alimentação, produção de novas vacinas, desenvolvimento de stocks resistentes a doenças genéticas. Nos últimos anos, procuraram-se estratégias para aumentar a produção de peixes através da manipulação

do crescimento hormonal dos peixes e factores de genes de crescimento. (Altman., 1998)

1.1.1. Modelo experimental

O pargo (*Pagrus pagrus*) é um peixe ósseo pertencente à classe Actinopterygii, ordem dos Perciformes e família Sparidae. Desta família também fazem parte algumas espécies tais como o sargo, o besugo, a safia, o goraz ou a dourada, por isso são comuns entre eles algumas características tais como, a forma do corpo, o número de espinhos e raios moles das barbatanas ou, a sua capacidade para mudar de sexo ao longo da vida – fenómeno chamado hermafroditismo (www.horta.uac.pt).

O pargo caracteriza-se por um corpo fusiforme, comprimido lateralmente e com uma protuberância característica sobre os olhos, o dorso alto e coberto de grandes escamas, mas acima de tudo pelo desenvolvimento dos seus dentes. Têm quatro dentes caninos na mandíbula superior e seis na inferior, estes dentes são bem visíveis principalmente em peixes de tamanho maior. São estes dentes juntamente com os inúmeros molares que permitem ao pargo alimentar-se de presas, na sua maioria crustáceos. Possui uma cor rósea prateada ao nível do dorso, com o ventre esbranquiçado. A cabeça é mais escura, dentro da tonalidade do corpo, as barbatanas são rosadas e os lóbulos da cauda de um branco azulado. Possui 12 espinhos dorsais, 10 raios dorsais moles, 3 espinhos anais e 8 raios anais moles. Alcança um tamanho de 91cm e um peso de aproximadamente 7,72g (www.fishbase.org).



Figura 1. *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) (www.fishbase.org).

1.1.2. Distribuição

O pargo distribui-se no Atlântico Este e Central, habita as zonas costeiras do Mediterrâneo, costa atlântica europeia desde o norte das ilhas Britânicas até à costa do Senegal e as ilhas Madeira e Canárias. Na costa americana a espécie ocorre desde Nova York, E.U.A e do Norte do Golfo do México até à Argentina, incluindo a costa continental do Mar das Caraíbas. Os pargos mais jovens são frequentemente encontrados em zonas pouco profundas e abrigadas, normalmente em áreas cobertas de algas e plataformas continentais, e na fase adulta, migram para zonas mais profundas, habitam principalmente zonas a 150m de profundidade, podendo por vezes ser encontrado até 250m de profundidade (www.fishbase.org).

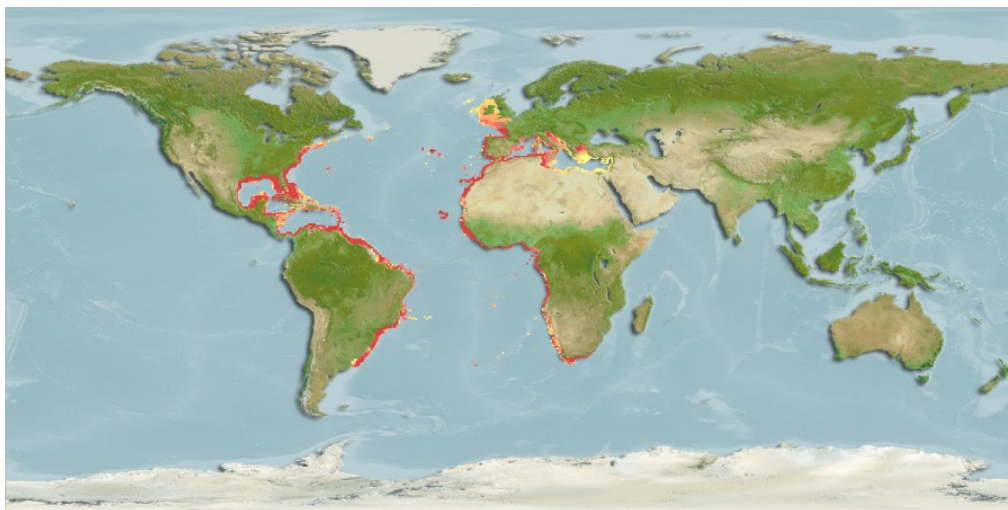


Figura 2. Distribuição geográfica de *Pagrus pagrus* (zonas a vermelho: alta possibilidade de localização) (www.fishbase.org).

1.1.3. Alimentação

Derivado à sua capacidade de habitar em fundos de areias ou rochas tem a facilidade de capturar animais nestes dois tipos de fundos. Desta forma, a sua alimentação é composta essencialmente por crustáceos (caranguejos e pequenos camarões), moluscos (búzios, lulas e polvos) e peixes (www.fishbase.org). Os crustáceos são ricos em pigmentos carotenóides (astaxantina) (Meyers, 1994), estes pigmentos são responsáveis pela cor da pele e músculo, desta forma, quando o pargo é alimentado com dietas ricas em astaxanthin, dispõe de uma pele bem pigmentada (Meyers, 1994). Astaxantina exhibe

também funções biologicamente importantes, incluindo a protecção contra oxidação dos ácidos gordos polinsaturados essenciais e protecção contra raios U.V (Guerin *et al.*, 2003).

1.1.4. Reprodução

O pargo apresenta hermafroditismo sequencial, ou seja, ocorre mudança de sexo durante o desenvolvimento. Ao atingirem a maturidade sexual comportam-se como fêmeas, para mais tarde sofrerem um processo de inversão sexual para machos, quando os órgãos sexuais femininos amadurecem primeiro, trata-se de hermafroditismo protogínico (www.fishbase.org). O Pargo pode atingir a sua maturidade sexual com 3 anos (www.geocities.com). A estação de desova deste peixe é de Março a Junho, com pico em Maio, segundo as distintas localizações geográficas (www.fishbase.org). Quando este período se aproxima, o peixe migra para áreas costeiras rasas para desovar. O macho persegue a fêmea na superfície, de seguida esta, desova e secretam juntos. A cor do corpo dos machos torna-se mais escura que a das fêmeas nesta estação.

1.1.5. Interesse para aquacultura

O seu grande interesse comercial é baseado no elevado preço destas espécies no mercado, juntamente com a sua boa adaptabilidade e taxa de crescimento em cativeiro, razões suficientes para que o pargo seja um bom candidato para a diversidade da indústria da aquacultura. (Cejas *et al.*, 1999). Outra qualidade adicional, está ligada ao facto da utilização de técnicas de cultura em espécies da mesma família, tais como a Dourada (*Sparus aurata*) e o Goraz (*Chrysophrys major*), já tenham sido intensamente estudadas e desenvolvidas.

1.2. Metabolismo intermediário em peixes teleósteos

A definição de metabolismo provém do conjunto de reacções químicas que as substâncias sofrem no interior dos organismos vivos, que podem ser de degradação, quebra de moléculas maiores e mais complexas (via catabólica), ou de síntese de compostos maiores e mais complexos a partir de precursores menores (via anabólica). O catabolismo é acompanhado pela libertação de energia livre (exotérmico). O anabolismo como descreve uma sequência de reacções, requer energia para ser realizado (endotérmico), energia esta, proveniente do catabolismo sob a forma de ATP (Voet,

Donald e Voet, Judith G., 1995). Do ponto de vista termodinâmico, o balanço energético é negativo, o que obriga os organismos, em geral, a uma nutrição permanente. Estas reacções bioquímicas não ocorrem espontaneamente, elas necessitam de catalisadores, substâncias proteicas, que são as enzimas. Estas substâncias têm como função acelerar as reacções, baixando a energia de activação, não alterando, no entanto o seu equilíbrio (Ruiz-Amil *et al.*, 1987). Como ocorrem uma sequência de reacções em que o produto de uma é o reagente da outra, diferentes enzimas catalisam diferentes passos das vias metabólicas, agindo de forma concertada de forma a não interromper o fluxo nessas vias.

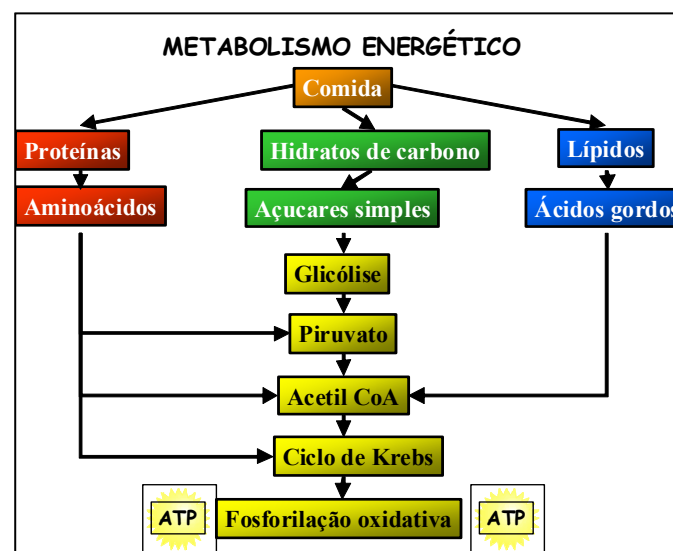


Figura 3. Esquema geral do metabolismo energético. (Tirado de Laíz-Carrión, 2005 (tese de doutoramento)).

1.2.1. Metabolismo de lípidos

Os lípidos são de enorme importância na dieta dos peixes, armazenam-se em quantidades importantes em vários tecidos, principalmente no fígado, músculo vermelho e em forma de gorduras mesentéricas (Sheridan, 1988). Os lípidos utilizados no metabolismo energético, acumulam-se principalmente como triglicéridos (Sheridan, 1988; 1994) e a sua oxidação consiste, na maioria dos tecidos, numa fracção considerável do metabolismo energético (Weber e Haman, 1996). Os lípidos que circulam na corrente sanguínea são provenientes de 3 fontes distintas: i) da dieta, ii) de

processamento a nível hepático, ou iii) aqueles que se acumulam nos vários tecidos principalmente em forma de ácidos gordos.

1.2.2. Metabolismo de aminoácidos e proteínas

Dado que as proteínas são o componente maioritário da dieta dos peixes (Van den Thillart, 1986), o catabolismo proteico nestes animais constitui a principal fonte de energia (Cowey e Walton, 1989). As proteínas não são apenas utilizadas como fonte de energia, servem também para restabelecer as elevadas taxas de intercâmbio de proteína muscular, o que se reflecte nas actividades onde estão implicadas enzimas, na descarboxilação e transaminação de aminoácidos (Moon e Johnston, 1981). As proteínas ingeridas em excesso sofrem degradação formando iões amónio e ureia ou depositam-se na forma de lípidos e hidratos de carbono em tecidos (Cowey e Walton, 1989). Os aminoácidos ingeridos na dieta para além de serem utilizados como combustível, são utilizados para a síntese de proteínas, actuando como material de crescimento para os tecidos (Mommsen e Walsh, 1992; Pannevis e Houlihan, 1992). Os aminoácidos estão presentes no organismo em forma de componentes das proteínas, através da ingestão destas ou através do seu catabolismo (Christiansen e Klungsoyr, 1987). O seu destino principal é, síntese proteica (Mommsen e Walsh, 1992; Pannevis e Houlihan, 1992), síntese de glicose, através da gliconeogénese (Mommsen, 1986; Mommsen *et al.*, 1985) ou utilizado como fonte de energia no fígado (Mommsen e Plisetskaya, 1991; Pannevis e Houlihan, 1992).

1.2.3. Metabolismo de hidratos de carbono

Os peixes teleósteos contrariamente ao que acontece com muitos animais terrestres, têm uma capacidade reduzida para utilizar os hidratos de carbono, e a necessidade de alguns tecidos pela glicose é cumprida mais facilmente pela gliconeogénese do que pela glicogenólise. O grau de utilização dos hidratos de carbono depende dos hábitos alimentares da espécie estudada, assim tendo em conta que a grande maioria de espécies marinhas são carnívoras, têm pouca capacidade de metabolizar hidratos de carbono (Washburn *et al.*, 1992). O alto conteúdo em proteínas e o baixo conteúdo em hidratos de carbono de uma dieta natural, proporciona substratos para a gliconeogénese para a síntese *de novo* de glicose e glicogénio. As proteínas da dieta e a baixa necessidade energética dos peixes, explica o uso relativamente baixo dos hidratos de carbono em

peixes carnívoros (Cowey e Walton, 1989; Baanante *et al.*, 1991; Wilson, 1994; Moon e Foster, 1995). Esta pobre capacidade de utilizar glicose reflecte-se na duração do estado de hiperglicemia, que se prolonga mais nestes animais que em mamíferos, tanto depois de uma administração de glicose como por uma alimentação rica em hidratos de carbono.

A glicose dá entrada no sangue a partir de 3 fontes: i) na dieta (Wilson, 1994; Cowey e Walton, 1989), ii) na degradação de glicogénio (glicogenólise) ao nível do fígado (Collins e Anderson, 1997); e iii) na gliconeogénese (formação de glicose a partir de piruvato, lactato ou glicerol), que acontece ao nível do fígado (Collins e Anderson, 1997). A manutenção da glicemia plasmática no metabolismo dos hidratos de carbono é feita em 3 processos principais (Figura 4):

1) A **glicogenólise** consiste num processo de degradação de glicogénio para formar glicose, é uma forma de armazenamento da glicose facilmente mobilizável, que acontece em todos os vertebrados. Os peixes ao contrário do que acontece com os mamíferos não mobilizam tão facilmente o glicógeno, desta forma, em muitas espécies de peixes não se verifica grandes alterações nos níveis de glicógeno em grandes períodos de jejum. O fígado é o órgão de maior importância, em peixes, para a produção de glicose a partir da glicogenólise para posterior utilização em outros tecidos (Mommesen e Plisetskaya, 1991).

2) A **glicólise** consiste numa sequência metabólica de várias reacções enzimáticas. Em tecidos aeróbicos a glicose é degradada na presença de O_2 tendo como produto final o piruvato, que por sua vez, é transportado para dentro da mitocôndria. Em condições anaeróbicas ocorre a degradação de glicose sem necessidade de O_2 tendo como produto final o ácido láctico, este processo é muitas vezes utilizado por células musculares esqueléticas. O fígado mantém o nível constante de glicose no sangue, produzindo e exportando glicose quando os tecidos precisam dela, e importando e armazenando a glicose quando é fornecida em excesso pelos alimentos ingeridos na dieta. Este processo está presente em todos os tecidos, embora a sua importância dependa do tecido (músculo vermelho > músculo branco > coração > rim > fígado > brânquias) (Knox *et al.*, 1980)

3) A **gliconeogénese** é um processo que ocorre devido à necessidade de alguns tecidos requererem glicose continuamente, no caso dos peixes teléosteos devido à sua dieta pobre em hidratos de carbono a gliconeogénese é responsável por esse papel, produzir glicose a partir de precursores não glicídicos. Isto implica que esta rota ocorra quase permanentemente nos peixes, ao contrário do que acontece com os mamíferos, que só ocorre essencialmente em situações de jejum. A gliconeogénese ocorre principalmente no fígado sendo que os substratos principais são, o lactato produzido fundamentalmente durante a glicólise e a glicogenólise, os aminoácidos provenientes a partir das proteínas da dieta (neste estudo estas proteínas não existirão em animais privados de comer, como irá ser possível verificar nas análises de proteínas plasmáticas) ou da degradação das proteínas musculares e do glicerol proveniente do catabolismo dos triglicéritos. A gliconeogénese tem um papel primordial, pois fornece uma quantidade baixa de glicose, mas essencial para o funcionamento dos tecidos.

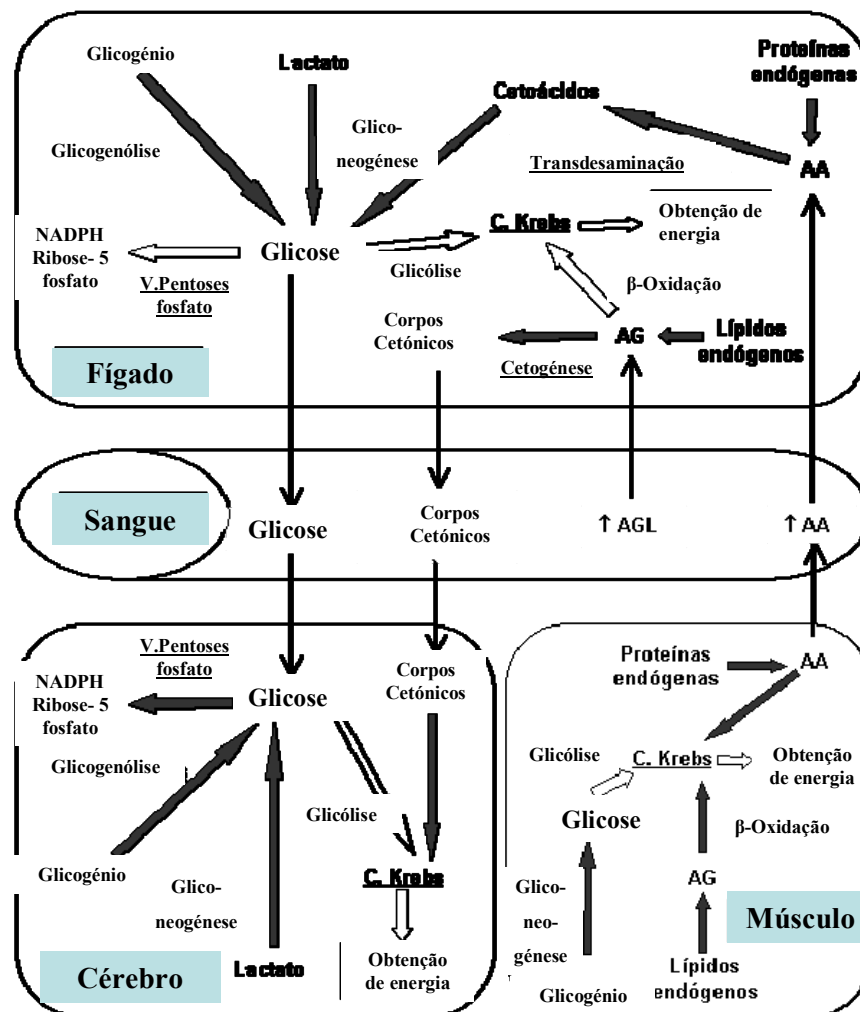


Figura 4 – Esquema sintetizado das 3 principais vias metabólicas, com destaque para o fígado, sangue e músculo (AG- ácidos gordos; AGL- ácidos gordos livres; AA- aminoácidos) (Vagliano *et al.*, 2002)

1.3. Stresse

O stresse é definido como uma situação em que o estado homeostático de um organismo é modificado como consequência de uma acção, de um estímulo intrínseco ou extrínseco ao animal, denominado agente stressante. Desta forma, o animal responde mediante uma série de reacções de comportamento ou fisiológicas com o objectivo de compensar ou adaptar-se à nova situação (Chrousos e Gold, 1992; Wendelaar Bonga, 1997).

Do ponto de vista fisiológico, uma situação pontual de stresse permite a recuperação da homeostasia do seu meio interno alterada pelo agente stressante. Contudo, se a situação

de stresse se converte em crónica a resposta pode perder o seu valor adaptativo e originar problemas. Uma situação contínua de stresse, origina problemas nos processos de crescimento, reprodução, osmorregulação e imunitários. Estes problemas são reflectidos ao nível do organismo e da população (Barton e Iwama, 1991, Mommesen *et al.*, 1999; Iwama *et al.*, 2004).

Nos peixes os possíveis agentes stressantes, aquando um cultivo de uma espécie, são múltiplos e de origens variadas, uma alimentação deficiente, alta densidade de cultivo, baixa oxigenação da água, condições físico-químicas óptimas da água, foto – período, alterações bruscas de temperatura, vibrações e ruídos, etc. Durante a resposta primária a estas situações produz-se a libertação de hormona adrenocorticotrófica, catecolaminas e cortisol, cuja acção conjunta gera a mobilização de glicose que servirá como substrato energético para responder em primeira instância ao factor stressante (Vijayan e Moon, 1994). Outros substratos como o lactato, os aminoácidos e os ácidos gordos cumprem funções similares (Love, 1980; Pickering, 1981; Vijayan *et al.*, 1997).

Peixes expostos a altas densidades estão geralmente em situações de stress e impõe severas exigências energéticas, note-se que neste tipo de ambiente existe sempre competição por vários factores, tais como, alimentação ou oxigénio, exigências estas, que são cumpridas pela mobilização de recursos do corpo, resultando num crescimento e desempenho menores. (Vijayan *et al.*, 1990; Scott- Thomas *et al.*, 1992; Rotllant *et al.*, 2000, 2001).

Quanto à alimentação, uma grande maioria de peixes são capazes de sobreviver um longo período de tempo sem comida, durante a sua vida existem uma série de factores que são responsáveis pela sua alimentação ou a falta desta (Navarro e Gutiérrez 1995). Processos de reprodução, variações temporais ou mesmo inexistência de comida, são alguns dos factores que obrigam uma espécie a controlar e mobilizar as suas reservas de energia (Navarro e Gutiérrez, 1995; Madrid *et al.*, 2001). As respostas metabólicas devido à falta de alimento variam dependendo de vários factores, tais como, a espécie, a idade e o tamanho do peixe (Stimpson, 1965; Shimeno *et al.*, 1990; Méndez e Wieser, 1993). A manutenção da homeostase durante o período de carência está directamente relacionada com a capacidade de mobilização de reservas energéticas, lípidos e glicogénio hepático, pelo menos durante as fases iniciais do jejum e também de uma subsequente activação da gliconeogénese hepática e numa redução da taxa de utilização

da glicose (Sheridan e Mommsen 1991; Navarro e Gutiérrez 1995). O jejum prolongado promove alterações em actividades enzimáticas implicadas no metabolismo intermediário hepático em várias espécies, essas alterações podem ser:

- Aumento do potencial da glicogenólise e da gliconeogénese (Bonamusa *et al.*, 1992; Sangiao- Alvarellos *et al.*, 2005a; Polakof *et al.*, 2006; 2007c);
- Aumento da capacidade de exportar glicose (Metón *et al.*, 2004; Sangiao- Alvarellos *et al.*, 2005a; Polakof *et al.*, 2007c);
- Diminuição da capacidade de fosforilar a glicose (Sundby *et al.*, 1991a; Polakof *et al.*, 2006; 2007c).

Em muitas espécies de peixes, porém o glicogénio não é o principal combustível usado no início de um jejum prolongado, podendo-se mobilizar preferencialmente ou em simultâneo tanto proteínas como lípidos (Cowey e Walton, 1989).

Durante o período de jejum o peixe aparenta utilizar estratégias de conservação de energia catabólica, que vão de encontro às suas necessidades calóricas, minimizando as perdas de energia nos tecidos. Contudo as alterações endócrinas e metabólicas dependem da espécie e da duração do jejum (Navarro e Gutiérrez, 1995; Mommsen *et al.*, 1999; Pottinger *et al.*, 2003). Por exemplo modificações nos níveis de cortisol plasmático, em resposta a carências alimentares, são contraditórias (Mommsen *et al.*, 1999; Pirhonen *et al.*, 2003; Pottinger *et al.*, 2003). De qualquer forma, em algumas espécies os níveis de cortisol plasmático foram, significativamente mais elevados em grupos privados de comer, quando comparados com grupos alimentados (Vijayan *et al.*, 1996; Jørgensen *et al.*, 2002; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005; Polakof *et al.*, 2006; Mancera *et al.*, 2008). Em relação às alterações metabólicas, algumas espécies (*Oncorhynchus mykiss*: Baanante *et al.* 1991; *Pagrus pagrus*: Rueda *et al.*, 1998) preservam reservas de glicogénio, enquanto metabolizam lípidos e/ou proteínas durante o período de jejum, dentro destas, existem algumas que metabolizam primariamente proteína muscular como exemplo, *Anguilla anguilla* L.(Dave *et al.*, 1975; Renault e Moon, 1980), carpa, *Carassius auratus* L. (Storer, 1967), solha *Pleuronectes platessa* L. (Moon e Johnson, 1980) e aquelas que utilizam primariamente lípidos, como por exemplo, lúcio *Esox lucius* L. (Ince e Thorpe, 1976), *Rutilus rutilus*, L. (Mendez e Wieser, 1993), perca dourada (Collins e Anderson, 1995). Alternativamente a outras espécies (*Gadus morhua*: Hemre *et al.* 1993; *Oncorhynchus kisutch*: Larsen *et al.* 2001),

que conservam proteínas e lípidos, enquanto consomem parcialmente as reservas de glicogénio. Uma vez que as fontes de hidratos de carbono na dieta, não estão disponíveis para peixes em jejum, um maior índice de gliconeogénese é utilizado (Gillis e Ballantyne, 1996). Sabe-se que o cortisol aumenta a taxa de gliconeogénese, através do aumento de actividade das enzimas de maior relevância na gliconeogénese (Mommsen *et al.*, 1999).

Os aminoácidos desempenham um papel importante no metabolismo dos peixes (Navarro *et al.*, 1997). Espécies de peixes carnívoros exigem dietas ricas em proteínas, a fim de obter aminoácidos para a síntese de proteínas, formação de glicose e energia. O aumento das concentrações de aminoácidos, observados durante o longo período de carência alimentar, constitui a principal fonte de energia nestas espécies (Sánchez-Muros *et al.*, 1998). Além disso, os aminoácidos têm a capacidade de manter os níveis de glicose durante períodos de jejum prolongados através do gliconeogénese (French *et al.*, 1981).

1.3.1 Cortisol

O cortisol é uma hormona esteroide (Figura 5) produzida pelas células do tecido esteroideogénico da glândula inter-renal dos teleósteos em resposta a stress.

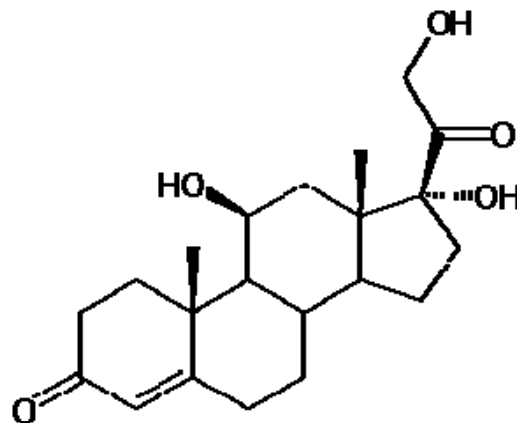


Figura 5 – Estrutura da hormona cortisol (www.icgeb.org)

As células deste tecido são estimuladas pela ACTH (hormona adrenocorticotrófica), que tem como órgão alvo o córtex inter-renal, estimulando a secreção das suas hormonas sobretudo do cortisol, e em algumas espécies pela hormona estimulante dos melanócitos (MSH) (Wendelaar Bonga, 1997). A secreção de ACTH é controlada pela hormona que

liberta corticotropina (CRH) proveniente do hipotálamo e que chega à adenohipófise via neurohipófise, constituindo o denominado eixo hipotálamo – hipofisário – inter-renal.

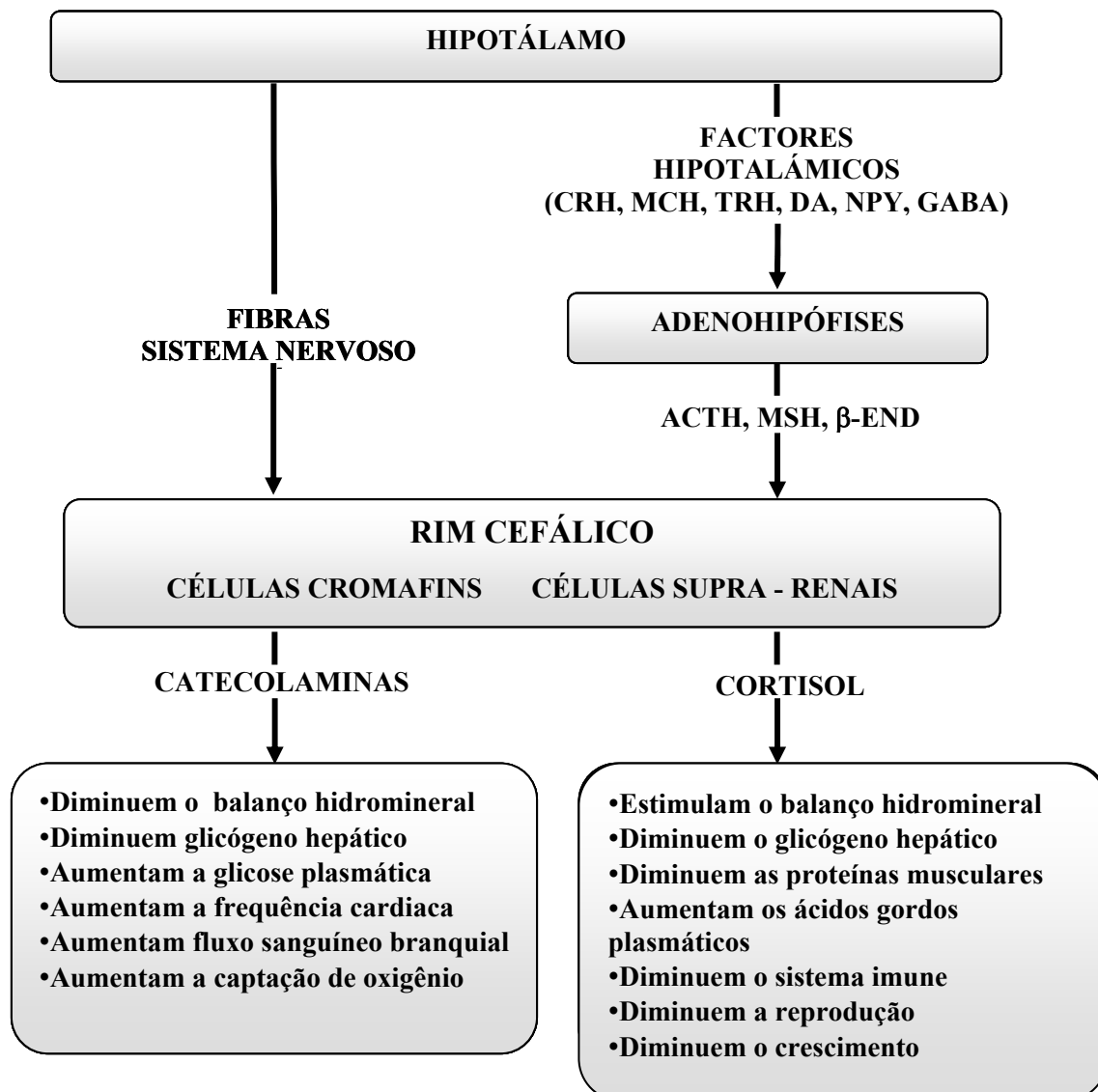


Figura 6. Principais elementos neuroendócrinos que constituem o sistema de stress em peixes teleosteos, e efeitos fisiológicos da activação do mesmo. (Tirado de Wendelaar Bonga, 1997).

1.3.2 Adaptação geral à situação de stress

O organismo responde a uma situação de stress com o chamado síndrome de adaptação geral, nele intervêm o sistema hipotálamo – simpático – cromafim e o sistema hipotálamo – hipófise – inter-renal. A síndrome de adaptação geral apresenta, de acordo com a duração do agente stressante, distintas etapas: a) reacção de alarme, b) fase de

resistência e c) fase de esgotamento (Adams, 1990; Schreck, 1990; Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999; Iwama *et al.*, 2004).

a) Reacção de alarme

Nestes primeiros momentos o animal responde com uma rápida activação do sistema hipotálamo – simpático – cromafim originando a libertação de catecolaminas (adrenalina/noradrenalina) no tecido inter-renal cromafim e de noradrenalina nos terminais nervosos simpáticos. Estas substâncias apresentam uma quantidade de funções fisiológicas, originando:

- i) Actividade motora, ritmo cardíaco, aumento do fluxo sanguíneo em órgãos fisiologicamente mais activos (cérebro, brânquias e músculo esquelético);
- ii) Aumento do fluxo sanguíneo nas brânquias e estímulo da captação/transporte de oxigénio;
- iii) Aumento da glicose plasmática a partir do glicogénio do fígado (gliconeogénese) e síntese de nova glicose a partir de ácidos gordos livres em tecido adiposo (glicogenólise).

b) Fase de resistência

Se a situação de stresse é contínua, o animal acabará por adaptar-se à nova situação e os níveis de catecolaminas voltarão aos seus níveis normais. Durante esta fase é activado o sistema hipotálamo-hipófise- inter-renal e por este motivo ocorre libertação de corticóides supra- renais (em peixes teleósteos, cortisol e corticóide, os mais importantes). A acção dos corticóides supra- renais é mais lenta que a acção inicial das catecolaminas e permitem manter a fase de resistência da adaptação geral. Além disso tanto o cortisol como a ACTH hipofisária estimulam a síntese de catecolaminas a nível do tecido cromafim, com o qual se podem manter valores de catecolaminas superiores aos valores de base durante esta fase de resistência.

c) Fase de esgotamento

Se a situação de stresse é contínua o organismo entra nesta terceira fase. Os níveis de cortisol mantidos durante um longo período de tempo, assim como a activação do

metabolismo para superar a situação de stress interferem com outros processos fisiológicos do animal (crescimento, reprodução, sistema imunitário, etc) e originam situações letais para o animal.

1.4 Objectivos

De forma a podermos aplicar os interesses da biotecnologia na produção animal, utilizando animais vivos ou porções deles activas, é necessário conhecer fisiologicamente o animal e como este reage a diferentes ambientes. O jejum e a densidade alta são factores de stress importantes e habituais em explorações aquícolas e que podem influenciar o metabolismo intermediário dos peixes. No presente estudo pretendeu-se examinar a influência destes, no metabolismo intermediário do pargo (*Pagrus pagrus*), analisando as alterações ao nível dos seus parâmetros plasmáticos, hepáticos e musculares.

2. Material e Métodos

2.1 Experiência realizada

A experiência foi realizada na “Planta Experimental de Cultivos Marinos” do Instituto Oceanográfico Espanhol, Tenerife, Espanha, onde 90 Pargos juvenis (*Pagrus pagrus*) cultivados em água do mar (salinidade de 36ppt) e colocados aleatoriamente em tanques de 1000L de capacidade, durante 4 semanas, em sistema aberto, antes das experiências começarem. Durante a experiência (Abril - Maio 2008) os peixes foram mantidos em ambiente de foto – período natural e temperatura constante (18-19°C). Os peixes foram alimentados, com 2% do peso total do seu corpo em 4 doses diárias (08h30, 10h30, 12h30, 14h30) com kits comerciais (cuja composição continha aproximadamente, % de peso seco; proteínas, 45, gorduras, 23, hidratos de carbono, 16.4, cinzas, 7.8, mistura, 5.9) (Biomar S.A., Brande, Denmark) e 25 mg.kg⁻¹ de extracto de astaxantina proveniente da alga *H. pluvialis* (NatuRose™, Cyanotech, Hawaii, USA). Os 90 peixes foram impedidos de comer 24 horas antes da experiência. A experiência descreveu o cumprimento das directrizes do Conselho da União Europeia (86/609/EU) para o uso de animais em laboratório. Todas as análises e técnicas utilizadas foram realizadas no Departamento de Biología da Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Puerto Real, Universidad de Cádiz, Espanha.

2.1.1 Desenho experimental

10 Peixes foram distribuídos aleatoriamente em tanques experimentais de 1000L e corrigido o volume, de forma a obter as condições ideais de cultura, uma densidade normal de 4 Kg.m⁻³, ou, através da colocação de uma rede dentro do tanque de forma a diminuir o seu tamanho, obter uma densidade alta de 50Kg.m⁻³. Os peixes foram distribuídos em cada tanque da seguinte forma, como mostra a Figura 7. Não se verificou mortalidade.

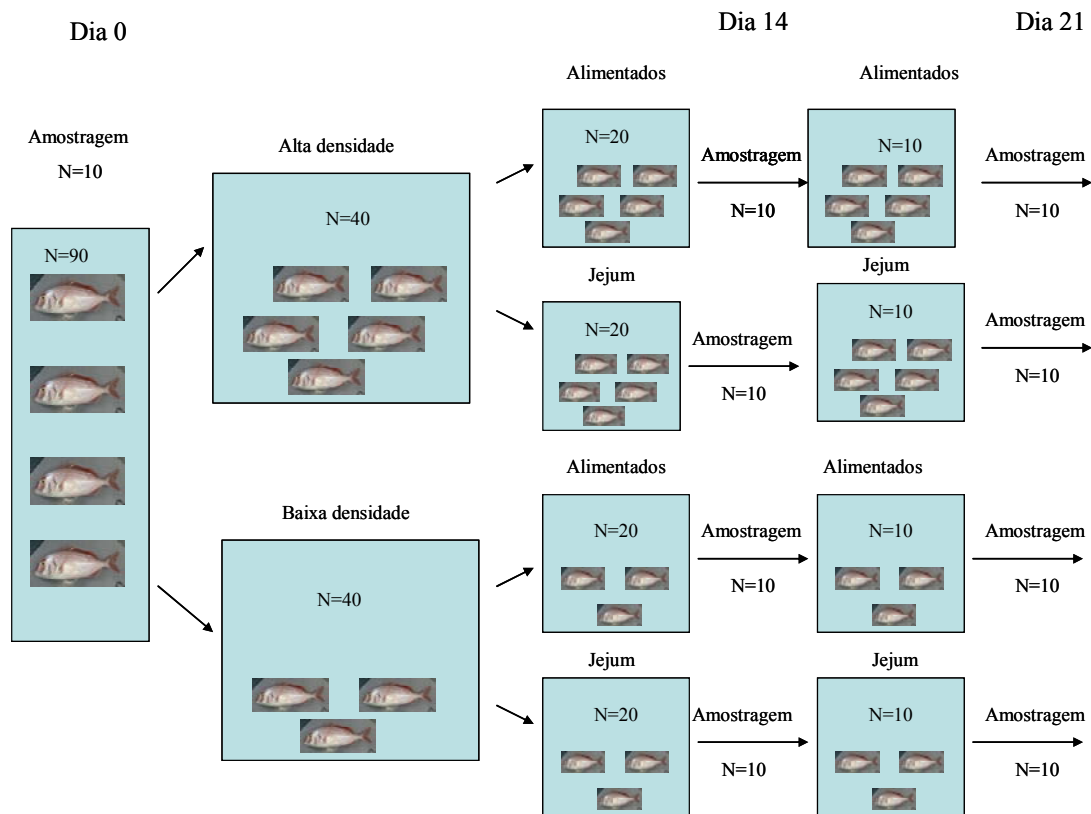


Figura 7 – Esquema do desenho experimental (A experiência realizou-se em 21 dias para juvenis *Pagrus pagrus*, ao dia 0 fez-se a primeira amostragem, que correspondeu ao grupo controlo (N=10), de seguida os peixes foram colocados em 4 tanques (alta densidade alimentado, alta densidade em jejum, baixa densidade alimentado e baixa densidade em jejum), ao dia 14 (N=10) e ao dia 21 (N=10) fizeram-se amostragens. Em todas as amostragens analisaram-se os metabolitos do plasma, fígado e músculo).

2.1.2 Obtenção das amostras

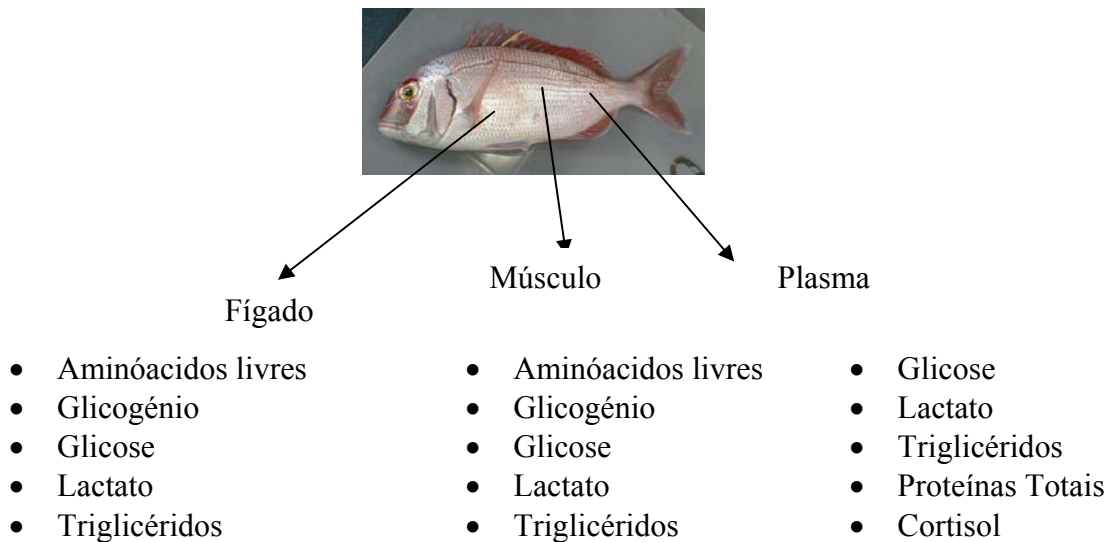
Os peixes foram profundamente anestesiados com 2-fenoxietanol (0,1v/v) pesados (Kg) através de uma balança e medido o seu comprimento (cm). Após a remoção do excesso de água do peixe, as amostras de sangue (aproximadamente 0,5mL/L) foram retiradas, utilizando seringas previamente heparinizadas com heparina de amónia, pressionando a artéria caudal de forma a facilitar a sua remoção, As amostras de sangue foram recolhidas para eppendorfs de 1,5mL, previamente heparinizados, e mantidas a uma temperatura de 4°C. De seguida as amostras foram centrifugadas (utilizando uma centrífuga ALC, mod.4204) durante 3 minutos a 10850rpm. Após centrifugação dividiu-se o plasma em 3 eppendorfs de 0,5mL/L que foram congelados em nitrogénio líquido e armazenados a -80°C até posterior análise. As amostras de fígado e músculo, foram pesadas e para o fígado foi calculado o HSI, FSI e VSI (o HSI é calculado dividindo o

peso do fígado (g) pelo peso total do animal (g), o VSI calcula-se dividindo o peso da víscera pela peso total do animal e o FSI é calculado dividindo as gorduras da cavidade intraperitoneal pelo peso total do animal).

De seguida foram secas com papel absorvente e congeladas em nitrogénio líquido e armazenadas até posterior análise.

2.1.2.1 Fluxograma

O fluxograma explica de forma sucinta os parâmetros analisados para o plasma e para os tecidos (músculo e fígado).



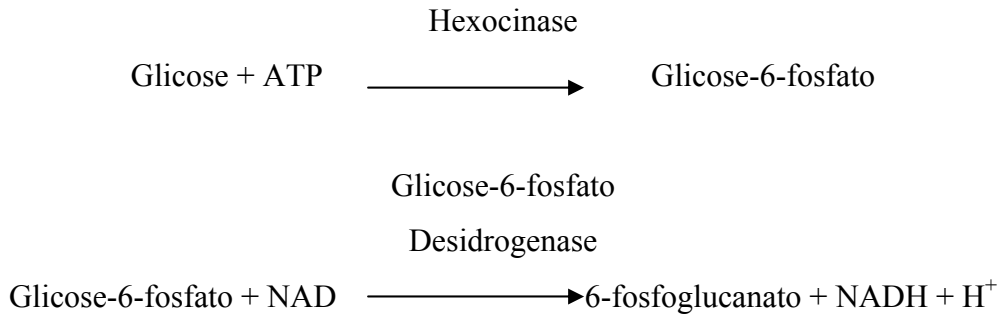
2.2 Análise de parâmetros metabólicos no sangue

2.2.1 Glicose

A concentração de glicose plasmática foi medida mediante um kit comercial da companhia SPINREACT (referência: 1001200) adaptado a uma microplaca de 96 poços.

A glicose é fosforilada pela adenosina trifosfato (ATP) numa reacção catalisada pela hexocinase. Como resultado desta fosforilização, produz-se glicose-6-fosfato que por sua vez é oxidada a 6-fosfogluconato, na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), numa reacção catalisada por glicose-6-fosfato desidrogenase. Durante esta

oxidação uma quantidade equimolar de NAD é reduzida a NADH, que tem a sua máxima absorvância em 340nm. Por este motivo as variações de absorvância que se produzem a 340nm serão directamente proporcionais à concentração de glicose. A reacção realiza-se da seguinte forma:

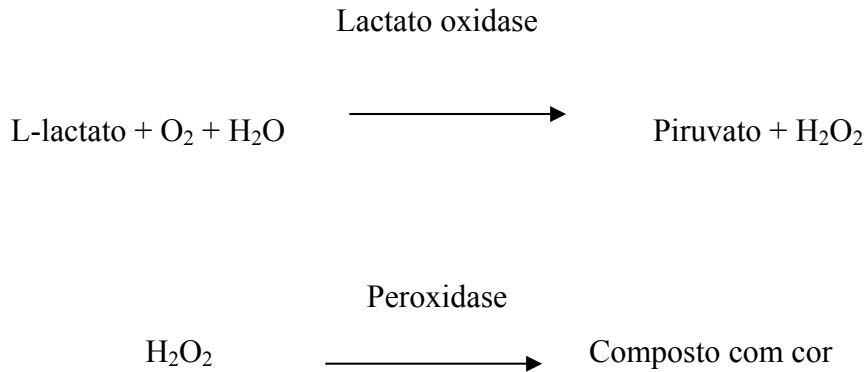


Os padrões de glicose usados (20mM/L) foram feitos a partir de glicose anidra (companhia Spinreact, ref. 1001200) de onde de obtiveram as concentrações de 0, 2, 5 e 10 mM/L. A solução reagente foi preparada adicionando o frasco de enzimas (R2), (constituído por, 2mmol/L NAD⁺, 1000U/L hexocinase e 1000U/L Glicose-6- fosfato) no frasco de tampão (R1), (constituído por 4mmol/L de TRIS a pH 7,5, 2,1 mmol/L de ATP e 0,8 mmol/L de Mg²⁺, agitou-se e incubou-se a 37°C em banho termostático. Em cada poço da microplaca (Costar, Corning Incorporated #3628), distribuíram-se 10µL de cada amostra, em duplicado, e cada standard em quadruplicado, adicionando a todos estes 200µL de solução reagente. A microplaca foi selada com parafilme (Parafilm “M”, Laboratory film American CanTM) e incubada a 37°C durante 5 minutos. De seguida a absorvância foi medida utilizando um comprimento de onda duplo: 340nm de leitura e 550nm de referência. Utilizou-se um leitor de microplacas automático (El 340, Bio-Tek Instrument Winoosk,VT, USA) controlado por um software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY). O ensaio foi linear de 0 a 20mM.

2.2.2 Lactato

Esta análise foi feita utilizando um Kit comercial da companhia SPINREACT (referência: 1001330) adaptado a uma microplaca de 96 poços. O ácido láctico é oxidado a piruvato e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) através de lactato oxidase. Na presença de peróxido de hidrogénio a peroxidase cataliza a condensação oxidativa dos percursos cromogénicos originando um composto de cor que tem uma absorvância

máxima a 540nm. A variação de absorvância a este comprimento de onda é directamente proporcional à concentração de lactato da amostra. A reacção realiza-se da seguinte forma:



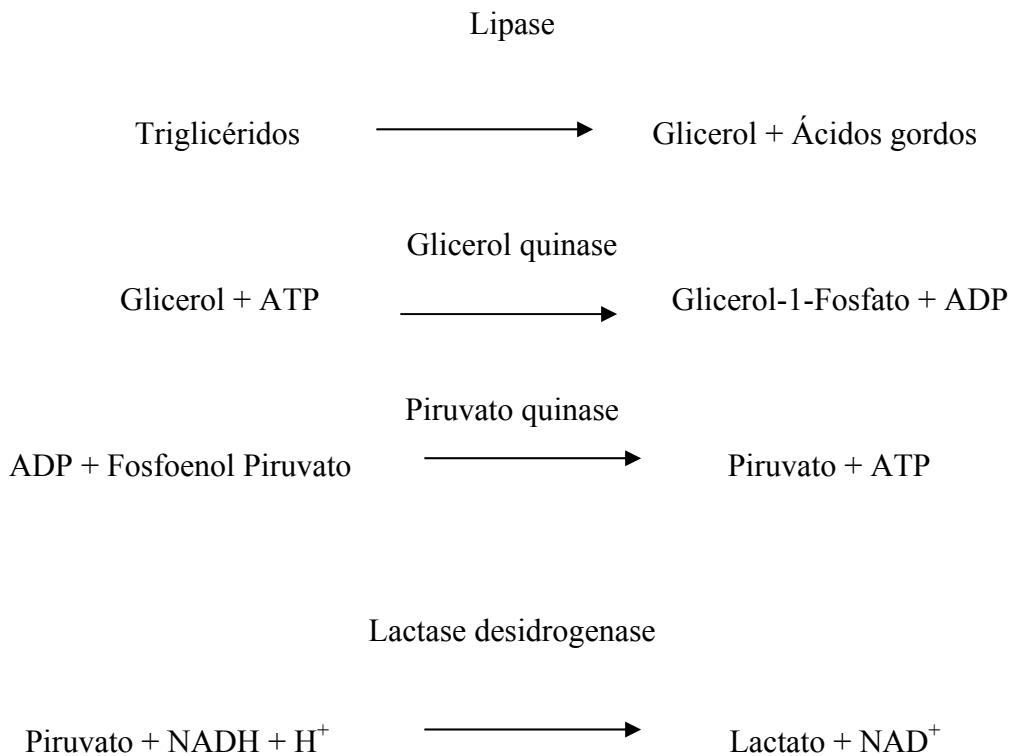
As soluções padrão usadas foram de 0, 5, 10, 15 e 20mg/dL. O reagente foi preparado dissolvendo o frasco de enzimas (R2) (constituído por 800U/L de lactato oxidase, 2000U/L de peroxidase e 0,4mmol/L de 4- Aminofenazona) com 10 mL de solução tampão (R1) (constituído por 50mmol/L de PIPES pH 7,5), adicionou-se posteriormente a esta solução, 10mL de solução isotónica agitou-se suavemente e incubou-se a 37°C em banho termoestático. As amostras de plasma foram diluídas em soro isotónico (0,9g NaCl/100mL água destilada) diluição 1:2 e distribuídas em quantidades de 10µL em duplicado na microplaca, enquanto que os standards foram distribuídos em igual volume, mas em quadruplicado. Posteriormente foram adicionados 200µL de reagente. A placa foi selada com parafilme Parafilm “M”, Laboratory film American CanTM) e incubada a 37°C durante 5 minutos. De seguida a absorvância foi medida utilizando um leitor de microplacas automático (El 340, Bio-Tek Instrument Winoosk, VT, USA) controlado por um software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY), usando um comprimento de onda duplo: 550nm para a leitura e 630nm como referência. O ensaio mostrou-se linear de 0 a 20 mg/dL

2.2.3 Triglicéridos

Esta análise foi feita utilizando um kit comercial da companhia SPINREACT (referência: 1001311) adaptado a uma microplaca de 96 poços. Os triglicéridos são hidrolizados pela lipase para formar glicerol e ácidos gordos, o glicerol formado é

fosforilado pela adenosina trifosfato (ATP) produzindo glicerol-1-fosfato e adenosina difosfato (ADP) numa reacção catalizada pela glicerol quinase. O ATP cataliza novamente, junto com o piruvato, ao reaccionar o ADP anterior com o fosfoenol piruvato, através da piruvato quinase. Finalmente o piruvato é reduzido a lactato através de uma oxidação equimolar de NADH na presença de lactato desidrogenase. O NADH apresenta uma absorvância de 340nm, desta forma a variação de absorvância, medida a este comprimento de onda, é directamente proporcional à concentração de triglicéridos na amostra.

A reacção realiza-se da seguinte forma:



O reagente foi preparado misturando o frasco de tampão (R1) (constituído por, 50mmol/L de GOOD a pH 7,5 e 2mmol/L de p-clorofenol), com o frasco de enzimas (R2) (constituído por 150000U/L de lipoproteína lipase, 500U/L de glicerol quinase, 2500U/L de glicerol-3-oxidase, 440U/L de Peroxidase, 0,1mmol/L de 4-Aminofenazona e 0,1mmol/L de ATP) incubando-se posteriormente a 37° C em banho termoestático.

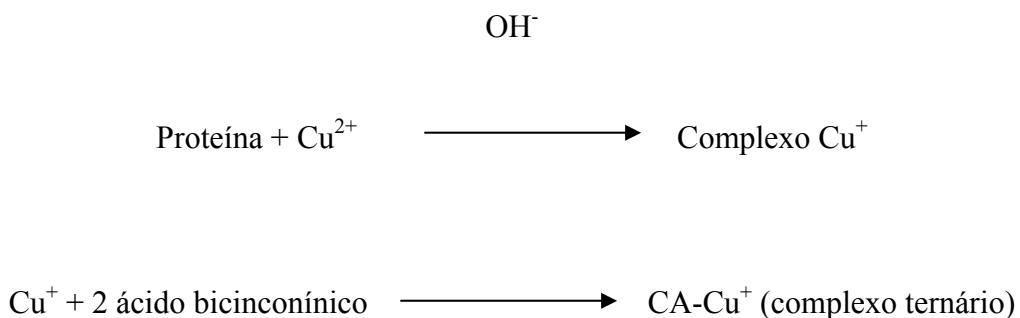
O kit contem soluções padrão de 200mg/dL que mediante sucessivas diluições com água destilada, permitiu fazer uma recta padrão: 0, 25, 50, 100 e 200 mg/dL. As amostras de plasma foram diluídas utilizando uma solução isotónica (0,9g de NaCl com

100mL de água destilada) diluição 1:6. Como controlo foi usada uma solução standard de triglicéridos (200mg/dL). Na microplaca foi colocado em duplicado 10 μ L de amostra diluída e os standards em quadruplicado. Em cada poço foram adicionados 200 μ L de reagente, deixando quatro poços vazios para fazer o branco. A placa foi selada com parafilme (Parafilm “M”, Laboratory film American CanTM) e incubada a 37°C durante 5 minutos. De seguida a absorvância foi medida utilizando um leitor de microplacas automático (El 340, Bio-Tek Instrument Winoosk, VT, USA) controlado por um software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY), utilizando um comprimento de onda simples para 490nm. O ensaio foi linear desde 0 a 200mg/dL. A conversão de mg/mL a mM segue a seguinte fórmula: mg/dL x 0,0113 = mmol/L.

2.2.4. Proteínas totais

A análise foi realizada utilizando um kit comercial BCA Protein Assay kit (Pierce, P.O.#2323) adaptado a uma microplaca de 96 poços.

A análise de proteínas plasmáticas foi feita mediante a redução de Cu^{2+} a Cu^+ , provocando às proteínas um meio alcalino. O ião cobre (Cu^+) forma uma união com as moléculas de ácido bicinonínico (BSA) um composto púrpura hidrosolúvel que apresenta uma forte absorvância a 562nm. A absorvância a este comprimento de onda é directamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. A reacção realiza-se da seguinte forma:



Os standards utilizados foram de 0, 5, 10 e 20 μ g/10 μ L a partir do kit comercial BSA (2mg/mL). A solução do reagente foi feita a partir de uma mistura de 20mL de reagente A (constituído por, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinonínico e tartarato de sódio em 0,1 M de hidróxido de sódio) e 400 μ L de reagente B (constituído por 4% de sulfato de sódio) e colocado em banho termoestático. Na microplaca foram

distribuídos 10µL de plasma, previamente diluídos em água destilada 1:50 (v/v), em duplicado. Os standards foram distribuídos com o mesmo volume, mas em quintuplicado. De seguida adicionaram-se 200µL de reagente em cada poço. A placa foi selada com parafilme (Parafilm “M”, Laboratory film American CanTM) e incubada a 37°C durante 5 minutos. De seguida a absorvância foi medida utilizando um leitor de microplacas automático (El 340, Bio-Tek Instrument Winoosk, VT, USA) controlado por um software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY), usando um comprimento de onda duplo : 550nm para a leitura e 630nm como referência. O ensaio foi linear desde 0 a 20 mg/mL.

2.2.5 Cortisol

Os níveis de cortisol foram quantificados mediante o ensaio ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) adaptado ao método descrito por Rodriguez *et al.* (2000) para testosterona. Os esteroídes foram extraídos a partir de 5µL de plasma em 1,5mL de metanol. Os diversos anticorpos e marcadores enzimáticos foram obtidos pela companhia, Química Cayman (Michigan, EEUU). As microplacas utilizadas (MaxiSorpTM) foram obtidas de Nunc (Roskilde, Dinamarca). A medição dos standards e as amostras de plasma realizaram-se em duplicado. O limite inferior de detecção (90% de união) foi de 0,30 ng mL⁻¹ no plasma. O coeficiente de variação interespecífico (calculado para os mesmos duplicados) foi de 5,4%. A percentagem média de recuperação foi de 95% (n=10). A reactividade cruzada (mais de 1%) do anticorpo anticortisol foi a seguinte: prednisolona (22%), cortexolona (6,1%), cortisona (2,0%) e corticosterona (1,3%). (Dados fornecidos pelo fabricante) (Mancera *et al.*, 2008).

2.3 Análise dos parâmetros metabólicos a nível hepático e muscular

A medição dos parâmetros metabólicos a nível tecidual, exige prévia homogeneização de amostra.

2.3.1 Procedimento de homogeneização:

Pesou-se uma quantidade de tecido e colocou-se em tubos de polipropileno. Adicionou-se um volume de ácido perclórico (composto por 96mL de água miliQ e 4mL PCA

0,6N), que foi calculado em μL , multiplicando o peso da amostra (em gr) por 7500 de forma a obter um factor de diluição de 1/15 (m/v). O ácido perclórico desproteiniza a amostra, desta forma, foi mais fácil a sua homogeneização. Sonicou-se durante alguns segundos num sonicador (Ultra-Turrax T-25 IKA[®]-WERKE) mantendo-se as amostras em frio. Adicionou-se posteriormente a mesma quantidade de volume de ácido perclórico, de solução de bicarbonato de potássio (composto por 100mL de água miliQ e 10,01g de KHCO_3). Centrifugaram-se os tubos de polipropileno a 10000-13000G durante 15 minutos a 4°C, numa centrifuga de modelo 5810 R eppendorf. Distribuiu-se o sobrenadante em tubos de eppendorf de 1,5mL e guardou-se a -80°C até posterior análise.

2.3.1.1. Aminoácidos livres totais

A determinação dos aminoácidos realizou-se por análise colorimétrica com ninhidrina (Sigma N7285).

Partindo da amostra homogeneizada (diluída a 1:15), centrifugaram-se as amostras a 10000-13000 G durante 3 minutos. Diluiu-se o sobrenadante 50 vezes, com 20 μL de amostra e 980 μL de água miliQ, obtendo-se uma diluição final de 1:750. De seguida adicionou-se numa placa de 96 poços: 140 μL de amostra diluída, 80 μL de acetato de cianeto e 80 μL de ninhidrina (volume final de 300 μL por poço). Incubou-se a 100°C durante 15 minutos e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 590nm, utilizando um leitor de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, winoosk; VT, USA) controlado por um software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY).

Para a determinação dos aminoácidos livres totais realizou-se uma recta padrão de L-alanina (Sigma A7469-25G) que segue a seguinte equação:

$$\text{Abs} = a [\text{AA totais}] + b.$$

As concentrações para a recta padrão foram as seguintes:

1. Solução mãe de L-alanina 0,01M (50mL de água miliQ + 0,0445g L-alanina);
2. Solução L-alanina de 0,25mM: 125 μL de solução mãe + 4875 μL de água miliQ;
3. Solução L-alanina de 0,125mM: 2500 μL de solução 2 + 2500 μL de água miliQ;

4. Solução L-alanina de 0,0625mM: 2500 μ L de solução 3 + 2500 μ L de água miliQ;
5. Solução L-alanina de 0,03125mM: 2500 μ L de solução 4 + 2500 μ L de água miliQ;
6. Solução L-alanina de 0,01563mM: 2500 μ L de solução 5 + 2500 μ L de água miliQ;
7. Solução L-alanina de 0,00781mM: 2500 μ L de solução 6 + 2500 μ L de água miliQ.

Para expressar os resultados em μ moles de aa.g tecido-1, utilizou-se a recta obtida e multiplicaram-se os resultados obtidos por 750 (factor de diluição).

2.3.1.2 Glicogénio

A técnica baseia-se na hidrólise da glicose através da acção da amiloglicosidade de acordo com o método Keppler e Decker (1974). A glicose produzida determinou-se a partir do kit comercial da companhia SPINREACT (referência: 1001200) adaptado a uma microplaca de 96 poços (ver 2.2.1). Quando se dá a reacção com o kit, aparece uma coloração, que é directamente proporcional à quantidade de glicógeno presente na amostra.

Partindo da amostra homogeneizada (diluída a 1:15) centrifugou-se as amostras a 10000-13000G durante 3 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Prepararam-se duas soluções de incubação compostas, cada uma, por, 240 μ L de ácido acético + 0,81g de acetato de sódio (trihidratado) e adicionou-se 50mL de água miliQ. A diferença entre ambas as soluções é que a uma delas, adicionaram-se 0,7451 unidades de AGS/ μ L de tecido de quantidade de amiloglicosidase (AGS, Sigma A7420).

Preparou-se a recta de calibração da glicose seguindo o protocolo de determinação de glicose no plasma, mas utilizando 50 μ L de amostra de tecido, incubou-se a 37°C durante 10 minutos e leu-se a 340nm.

Para os diferentes tecidos (músculo e fígado) o procedimento foi diferente.

Músculo:

1. Após a centrifugação prepararam-se as duas soluções, uma com 200µL da solução que continha AGS + 100 µL de amostra (para esta fez-se uma diluição de 1:3) e outra com 200 µL da solução que não continha AGS + 100 µL de amostra;
2. Incubou-se durante 2 horas a 40°C com agitação;
3. Colocou-se numa microplaca em duplicado 50 µL de amostra e 250 µL de reagente;
4. Incubou-se durante 5 minutos a 37°C e fez se a leitura.

Fígado:

1. Após a centrifugação fez-se uma diluição de 1:2 às amostras, de seguida prepararam-se as duas soluções uma com 200 µL da solução que continha AGS + 100 µL de amostras e outra com 200 µL da solução que não continha AGS + 100 µL de amostra;
2. Incubou-se durante 2 horas a 40°C com agitação;
3. Colocou-se numa microplaca em duplicado 50 µL de amostra e 250 µL de reagente;
4. Incubou-se durante 5 minutos a 37°C e fez-se a leitura.

2.3.1.3 Glicose, triglicéridos e lactato:

A partir da amostra homogeneizada e já diluída, centrifugaram-se as amostras a 10000-13000 G durante 3 minutos a 4°C e utilizou-se o sobrenadante. Os procedimentos utilizados para a medição estão descritos na secção 2.2.

2.4 Análise estatística

Os parâmetros (plasmáticos, hepáticos e musculares) foram analisados estatisticamente através da one-way ANOVA dentro dos diferentes grupos (alta densidade alimentado, alta densidade em jejum, baixa densidade alimentado e baixa densidade em jejum), Transformações logarítmicas dos dados foram feitas quando necessárias (isto é, para dados que não apresentavam a distribuição normal nem cumpriam a homogeneidade), para cumprir as condições da análise de variância. As comparações Post-hoc

efectuaram-se utilizando um teste Tukey para grupos mantidos em alta densidade para diferentes N, considerando diferenças estatisticamente significativas a $p < 0.05$.

3.Resultados

3.1 Parâmetros biométricos

A evolução de parâmetros biométricos, comprimento, peso total, peso do fígado, peso da víscera e gorduras de juvenis *Pagrus pagrus* durante os 21 dias do decorrer do experimento para, baixas e altas densidades e para animais alimentados e em jejum estão representados na Tabela 1. Para os parâmetros de comprimento e peso, não se verificaram diferenças significativas entre qualquer grupo, o que explica que provavelmente 21 dias não foram tempo suficiente para que se verificassem alterações.

O peso do fígado apresentou valores significativamente mais baixos ($p < 0,05$) em peixes mantidos em jejum, independentemente da densidade a que foram sujeitos, quando comparados com peixes alimentados. Estas diferenças foram notáveis até ao dia 21 (Figura 8). Para exemplares sujeitos ao mesmo regime alimentar (em jejum ou alimentados), tanto para baixas como para altas densidades não se verificaram diferenças significativas entre si.

O peso da víscera apresentou em todos os grupos decréscimos estatisticamente significativos em relação ao grupo controlo, até ao dia 14, prolongando-se até ao dia 21. Ao fim dos 21 dias verificaram-se diferenças significativas entre o grupo alimentado em baixa densidade e o grupo em jejum em baixa densidade ($p < 0,05$) (Figura 8). Relativamente aos depósitos de gordura na cavidade intraperitoneal, ocorreu uma diminuição em todos os grupos com o decorrer da experiência, contudo essas alterações não foram significativas (Figura 8).

Tabela 1 – Valores de parâmetros biométricos para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com a média (n=10) \pm erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Parâmetros		Comprimento (cm)	Peso total (g)	Peso da víscera (g)	Peso do fígado (g)	Gorduras (g)	
Baixa densidade	Dia 0	Controlo	16,54 \pm 0,45	112,40 \pm 10,60	9,06 \pm 0,90 ^a	1,83 \pm 0,21 ^a	1,68 \pm 0,32 ^a
		Alimentado	15,90 \pm 0,43	101,50 \pm 8,20	6,71 \pm 0,49 ^b	1,80 \pm 0,15 ^a	1,81 \pm 0,18 ^{a,b}
		Jejum	15,92 \pm 0,33	94,58 \pm 4,93	5,66 \pm 0,32 ^{b,c}	1,29 \pm 0,12 ^{a,b}	1,31 \pm 0,19 ^{a,b}
Alta densidade	Dia 14	Alimentado	15,58 \pm 0,46	96,98 \pm 9,20	6,57 \pm 0,52 ^{b,c}	1,48 \pm 0,13 ^{a,b,c}	1,48 \pm 0,27 ^{a,b}
		Jejum	15,56 \pm 0,55	94,45 \pm 8,05	5,20 \pm 0,50 ^{b,c}	1,06 \pm 0,07 ^b	1,53 \pm 0,26 ^{a,b}
		Alimentado	15,29 \pm 0,42	89,77 \pm 6,90	5,91 \pm 0,34 ^{b,c}	1,76 \pm 0,12 ^a	0,97 \pm 0,19 ^{a,b}
Baixa densidade	Dia 21	Jejum	15,81 \pm 0,61	90,65 \pm 12,30	4,47 \pm 0,38 ^c	0,80 \pm 0,10 ^a	0,91 \pm 0,13 ^b
		Alimentado	16,28 \pm 0,41	108,61 \pm 8,57	6,76 \pm 0,52 ^b	1,68 \pm 0,12 ^{b,c}	1,57 \pm 0,22 ^{a,b}
		Jejum	16,14 \pm 0,37	92,59 \pm 7,32	4,84 \pm 0,26 ^{b,c}	0,87 \pm 0,07 ^{b,c}	1,07 \pm 0,18 ^{a,b}

Os valores dos índices (VSI, HSI, FSI) para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias estão representados na Tabela 2. Para o índice víscerosomático (VSI) (Figura 8), assim como para o índice hepatossomático (HSI) (Figura 8), verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os grupos em jejum independentemente da densidade do tanque. Para os grupos alimentados (altas e baixa densidade) essa diminuição ocorreu até ao dia 14 sendo menos acentuada ao dia 21 da experiência. Relativamente ao índice de gorduras (FSI), não se verificaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores dos índices (viscerossomático (VSI), hepatossomático (HSI) e de gorduras (FSI) para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com a média ($n=10$) \pm erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Parâmetros		VSI	HSI	FSI	
Baixa densidade	Dia 0	Controlo	8,08 \pm 0,27 ^a	1,60 \pm 0,07 ^{a,b}	1,41 \pm 0,22 ^{a,b}
		Alimentado	6,69 \pm 0,31 ^{a,b}	1,78 \pm 0,08 ^{a,b}	1,84 \pm 0,21 ^a
	Dia 14	Jejum	6,15 \pm 0,54 ^b	1,39 \pm 0,14 ^b	1,35 \pm 0,17 ^{a,b}
Alimentado		6,90 \pm 0,42 ^{a,b}	1,63 \pm 0,22 ^{a,b}	1,48 \pm 0,21 ^{a,b}	
Alta densidade	Dia 14	Jejum	5,49 \pm 0,20 ^c	1,16 \pm 0,10 ^{b,c}	1,58 \pm 0,17 ^{a,b}
		Alimentado	6,69 \pm 0,30 ^{a,b}	2,00 \pm 0,15 ^a	1,03 \pm 0,15 ^b
	Dia 21	Jejum	5,27 \pm 0,41 ^c	0,96 \pm 0,14 ^c	1,07 \pm 0,15 ^{a,b}
Alimentado		6,24 \pm 0,17 ^b	1,57 \pm 0,09 ^{a,b}	1,43 \pm 0,16 ^{a,b}	
Baixa densidade		Jejum	5,27 \pm 0,23 ^c	0,95 \pm 0,08 ^c	1,15 \pm 0,20 ^{a,b}

A figura 8 apresenta de forma mais clara os parâmetros biométricos que apresentaram diferenças significativas.

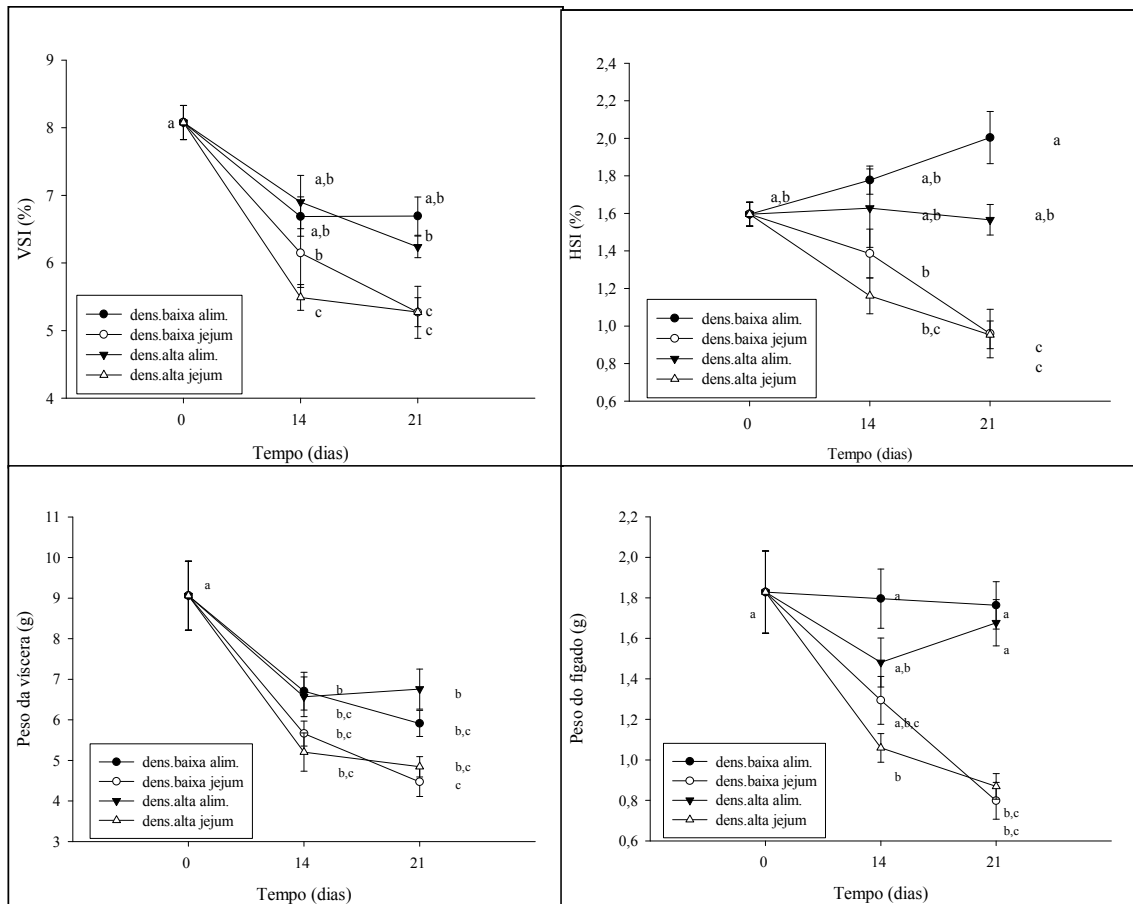


Figura 8 – Representação gráfica dos parâmetros que apresentaram diferenças significativas (VSI, HSI, peso do fígado e peso da víscera) ao longo da experiência, para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com a média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferenças significativas entre grupos (p < 0,05).

3.2 Factores endócrinos

Os níveis de cortisol apresentaram, um aumento para os grupos submetidos a altas densidades, sendo que apenas o grupo alimentado apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controlo. Para os grupos submetidos a baixas densidades não se verificaram alterações. (Figura 9).

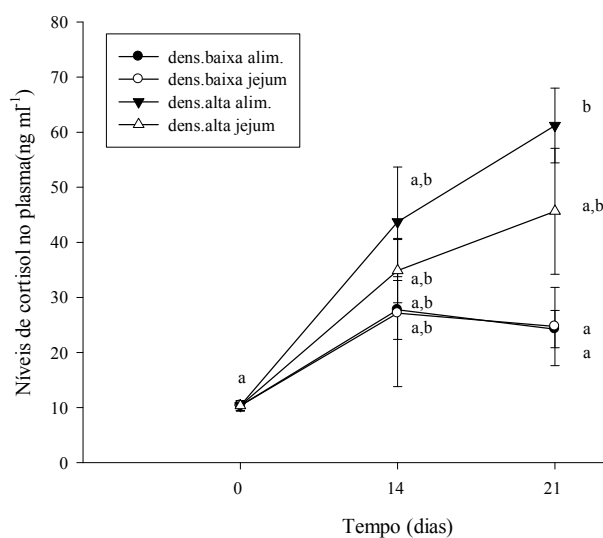


Figura 9 – Representação gráfica dos níveis de cortisol para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média ($n=10$) \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos ($p<0,05$).

3.3 Parâmetros metabólicos do sangue

A Figura 10 apresenta os níveis de glicose plasmática, onde se verifica a ocorrência de pequenos decréscimos ao longo da experiência em todos os grupos, quando comparados com o grupo controle. Contudo, não se verificaram diferenças significativas nos valores dentro de cada grupo e entre os quatro grupos analisados.

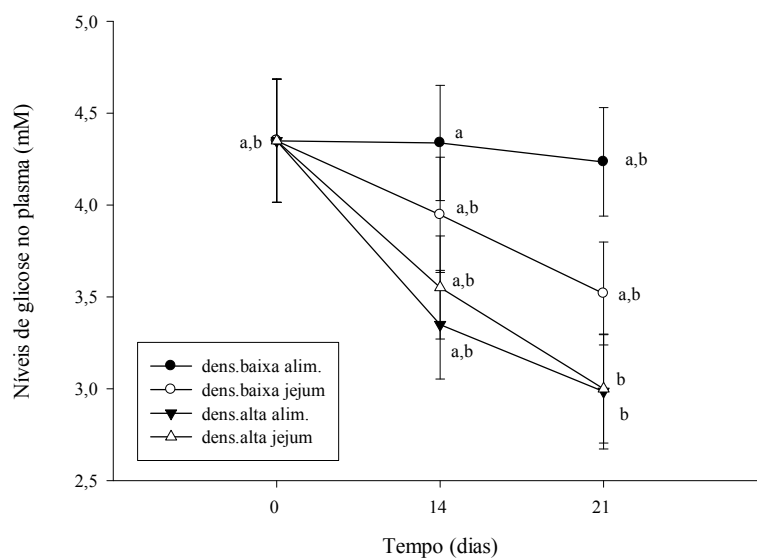


Figura 10 – Representação gráfica dos níveis de glicose no plasma para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os

valores são representados com o valor da média (n=10) \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

A Figura 11 apresenta os níveis de lactato plasmático, onde verifica que, para os grupos em jejum (altas e baixas densidades) houve um pequeno decréscimo e para o grupo alimentado em baixa densidade houve um ligeiro aumento. O grupo alimentado em alta densidade apresentou níveis constantes durante os 21 dias. Os exemplares mantidos a altas densidades apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) mais baixos que os mantidos a baixas densidades. Estas diferenças foram significativas aos 21 dias.

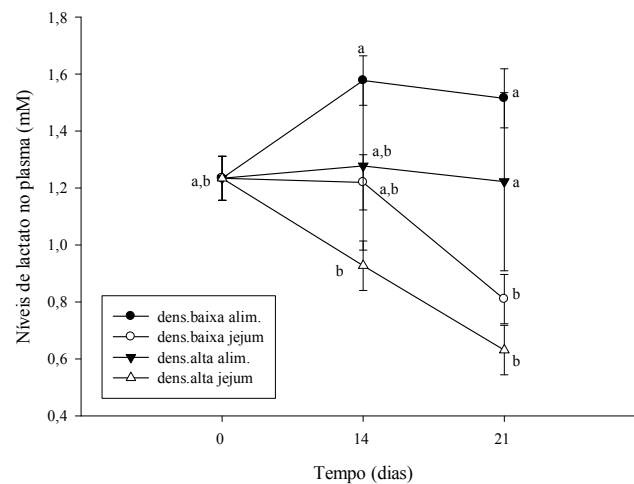


Figura 11 – Representação gráfica dos níveis de lactato no plasma para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

A Figura 12 apresenta os níveis de triglicéridos plasmáticos. Para os grupos em jejum, verificaram-se decréscimos estatisticamente significativos, tanto em grupos mantidos a altas densidades como a baixas densidades, quando comparados com o grupo controlo. Esta diminuição ocorreu aos 14 dias prolongando-se até aos 21 dias.

O grupo alimentado em alta densidade apresentou um decréscimo significativo aos 14 dias, com uma recuperação dos níveis iniciais aos 21 dias. O grupo alimentado em baixa

densidade apresenta os valores mais constantes, não se verificando diferenças significativas dentro deste durante os 21 dias.

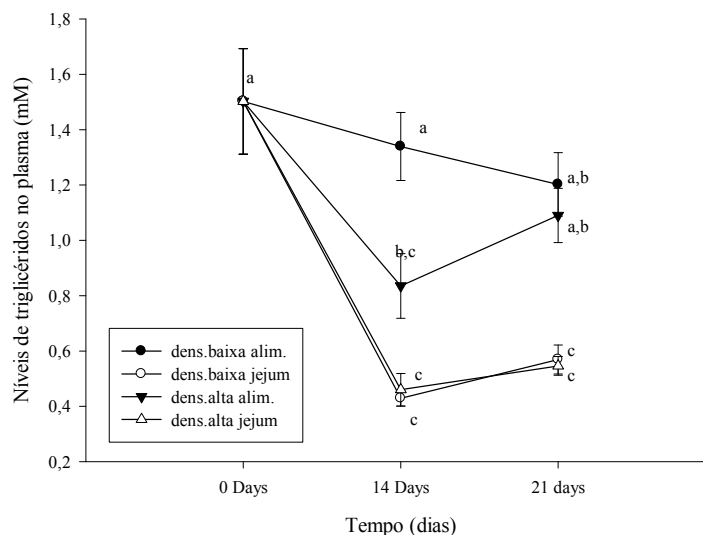


Figura 12 – Representação gráfica dos níveis de triglicéridos no plasma para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos ($p<0,05$).

Nos níveis de proteínas plasmáticas, apresentados na Figura 13, verificou-se um decréscimo estatisticamente significativo para o grupo em jejum submetido a alta densidade, em relação ao grupo de controlo. O grupo alimentado em baixa densidade não apresenta quaisquer tipos de alterações ao longo dos 21 dias.

No final dos 21 dias as diferenças significativas verificaram-se entre os grupos em jejum (altas e baixas densidades) e o grupo alimentado em baixa densidade (Figura 13).

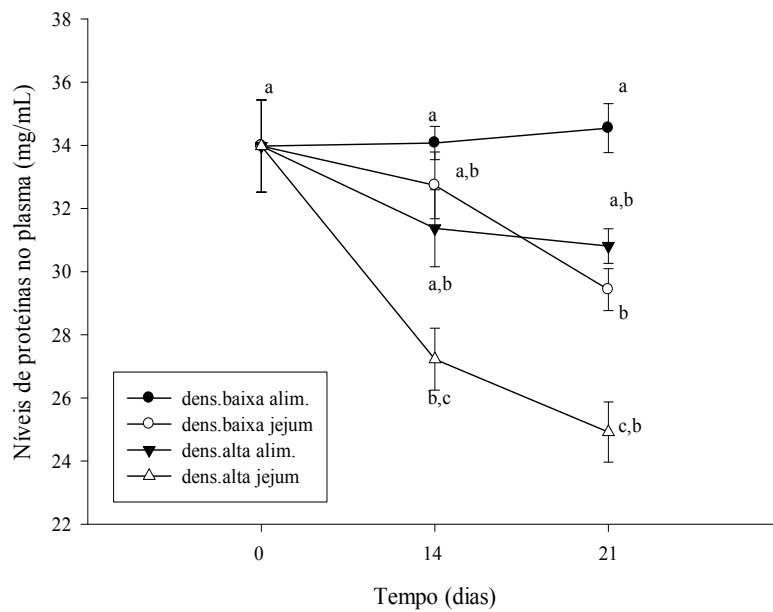


Figura 13 – Representação gráfica dos níveis de proteínas no plasma para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos ($p < 0,05$).

3.4 Parâmetros metabólicos hepáticos

Os níveis de glicose hepática, apresentaram um aumento para todos os grupos. Nos grupos em jejum este aumento foi significativo para os grupos mantidos em alta densidade. Relativamente ao glicogénio hepático, os grupos em jejum (alta e baixa densidade) apresentaram um decréscimo estatisticamente significativo que se manteve até ao dia 21. Para os grupos alimentados (altas e baixas densidades) a situação foi oposta, existiu um aumento dos níveis de glicogénio. Ao fim dos 21 dias as diferenças significativas verificaram-se entre os grupos alimentados e os grupos em jejum (Figura 14)

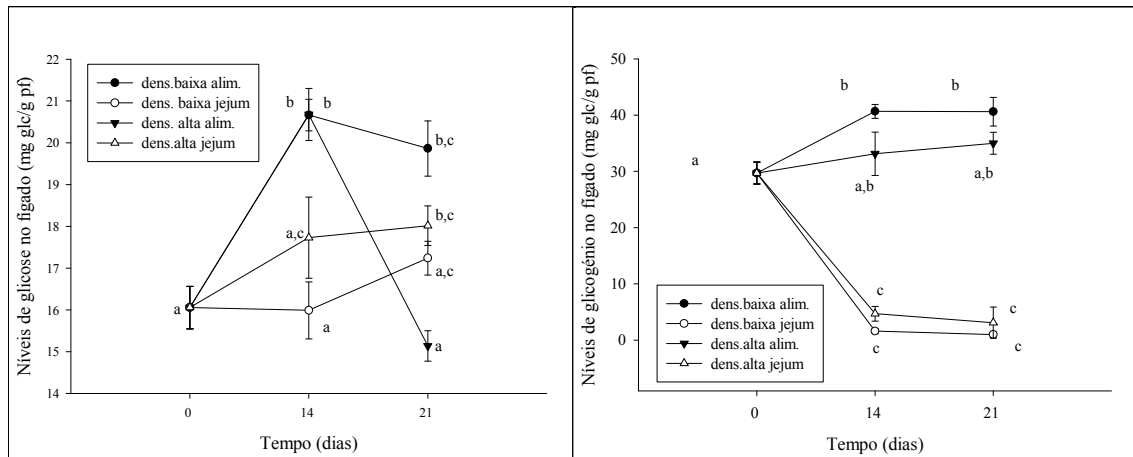


Figura 14 – Representação gráfica dos níveis de glicose e glicogênio no fígado para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

Os níveis de triglicéridos hepáticos aumentaram para os grupos em jejum ao longo da experiência, contudo essas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 15).

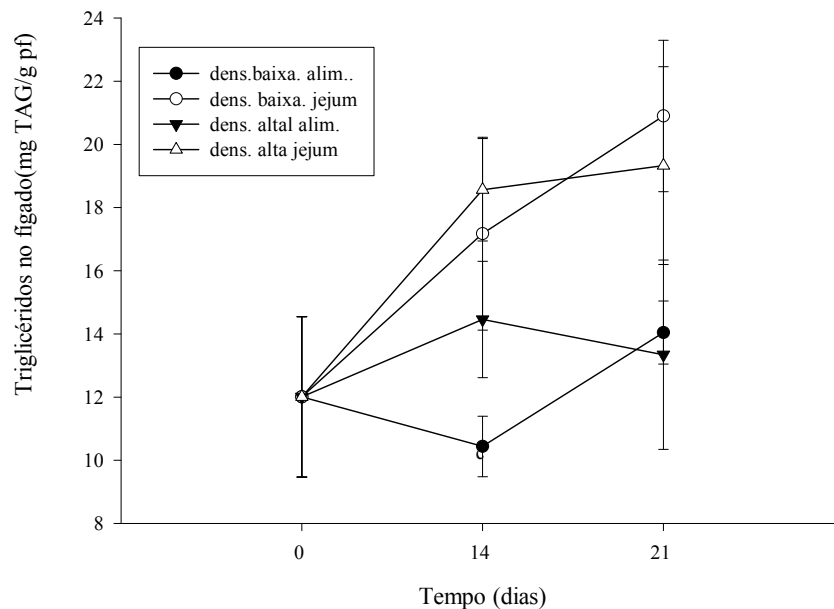


Figura 15 – Representação gráfica dos níveis de triglicéridos no fígado para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

Para os aminoácidos livres hepáticos verificou-se um decréscimo para os grupos em baixa densidade (alimentados e em jejum) e um aumento para os grupos em alta densidade (alimentados e em jejum), estas alterações, apenas aconteceram até ao dia 14. Ao dia 21 todos os grupos voltaram ao seu estado inicial, não havendo diferenças significativas entre eles ao final dos 21 dias (Figura16).

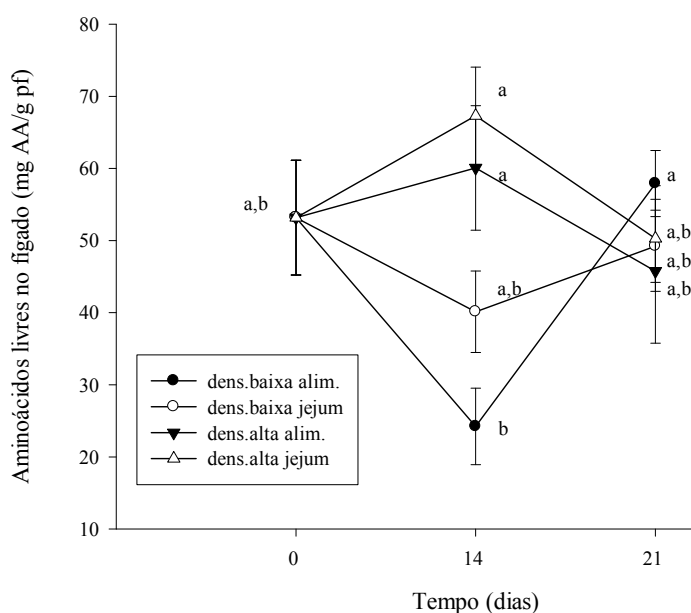


Figura 16 – Representação gráfica dos níveis de aminoácidos livres no fígado para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

3.5 Parâmetros metabólicos musculares

Nesta secção avaliou-se, a evolução dos diferentes parâmetros musculares de juvenis *Pagrus pagrus* durante os 21 dias para baixas e altas densidades e para animais alimentados ou em jejum.

Os valores de glicose e glicogénio muscular, apresentaram valores baixos no músculo e não se verificaram diferenças significativas em nenhum grupo (Figura 17).

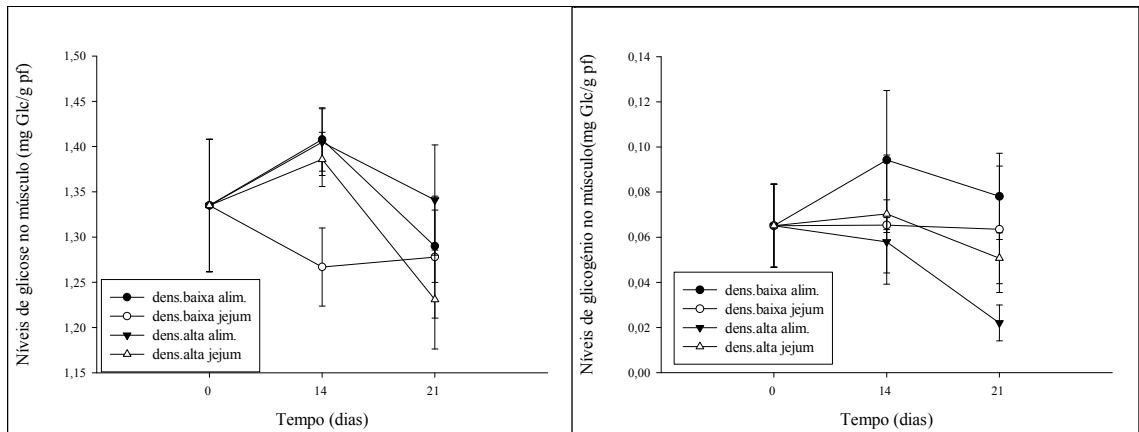


Figura 17 – Representação gráfica dos níveis e glicose e glicogénio no músculo para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

Em relação os níveis de triglicéridos muscular, verificou-se uma tendência de aumento em todos os grupos, sendo esta mais pronunciada em grupos alimentados. Este aumento foi estatisticamente significativo nos animais alimentados em alta densidade em relação ao grupo controlo aos 21 dias (Figura 18).

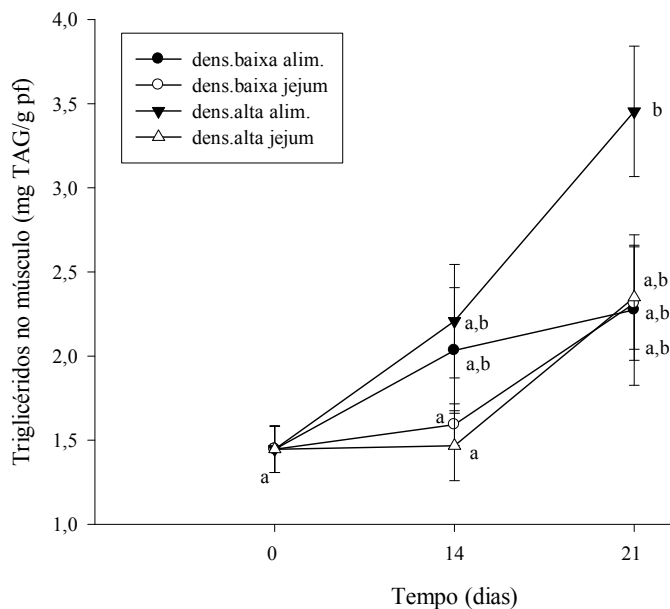


Figura 18 – Representação gráfica dos níveis de triglicéridos no músculo para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) \pm erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

Relativamente aos níveis de lactato muscular apenas se verificaram alterações em relação ao grupo alimentado em baixa densidade onde o aumento ao dia 21 foi estatisticamente significativo em relação aos restantes grupos (Figura 19).

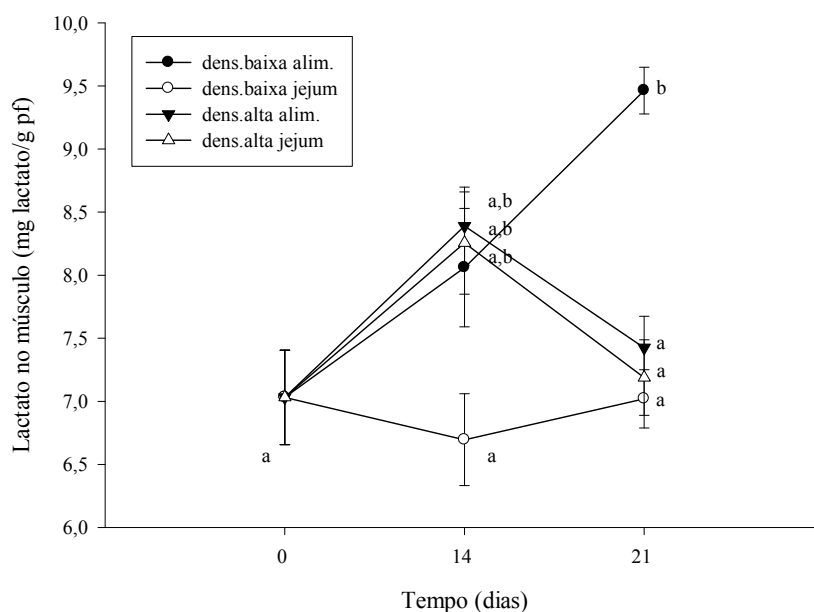


Figura 19 – Representação gráfica dos níveis de lactato no músculo para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

Para os níveis de aminoácidos no músculo houve um decréscimo estatisticamente significativo para os grupos em jejum (altas e baixas densidades), principalmente ao dia 21. Para os grupos alimentados (altas e baixas densidades), houve um decréscimo até ao dia 14, mas até ao dia 21 os valores voltaram a aumentar, não se verificando alterações significativas. Verificaram-se diferenças significativas entre os grupos alimentados e os grupos em jejum (Figura 20).

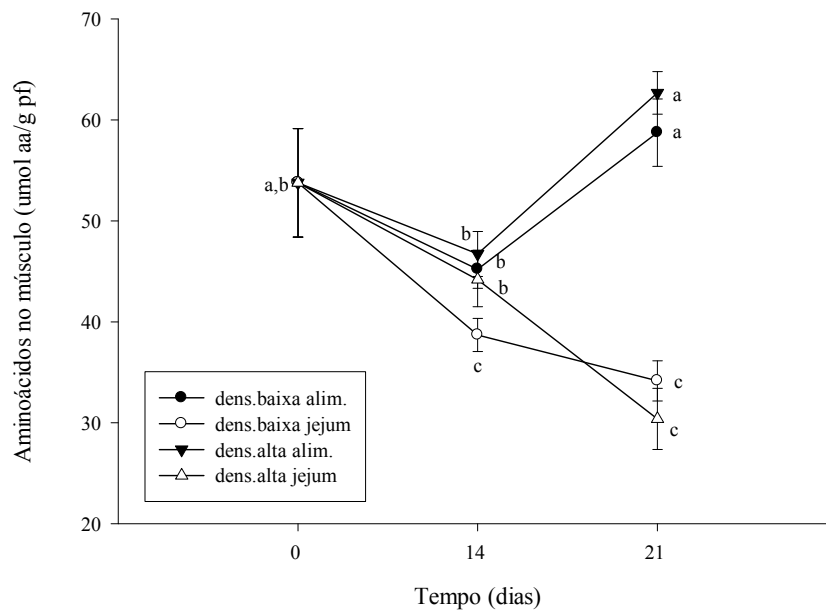


Figura 20 – Representação gráfica dos níveis de aminoácidos no músculo para juvenis de *Pagrus pagrus* alimentados e em jejum durante 21 dias. Os valores são representados com o valor da média (n=10) ± erro padrão. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre grupos (p<0,05).

4. Discussão

Alguns parâmetros endócrinos e bioquímicos são comumente aceites como indicadores de stresse, com o objectivo de estudar a resposta dos peixes durante este estado. Os níveis de cortisol são amplamente utilizados como factor geral ou endócrino de stresse em vertebrados e em particular em peixes (Pickering, 1984; Pickering e Pottinger, 1989). No presente estudo analisaram-se vários factores de stresse, em conjunto com parâmetros metabólicos em diferentes tecidos de *Pagrus pagrus*, com o objectivo de compreender as implicações metabólicas induzidas por um ambiente de alta densidade e jejum, situações frequentes em condições de cultivo industrial. Nesta experiência, as alterações nos parâmetros biométricos (Tabela 1) não se verificaram para os pesos e comprimentos dos grupos, provavelmente 21 dias não foi tempo suficiente para observar diferenças nesta espécie, pela baixa taxa de crescimento específico (Divanach *et al.*, 1993; Cejas *et al.*, 1999; Tejera *et al.*, 2007). Contudo verificou-se uma perda nos pesos do fígado, víscera e gorduras para os grupos em jejum resultando num decréscimo dos índices (HSI e VSI) nestes grupos (Figura 8). Resultados estes já observados em outros estudos com teleósteos (*Salmo salar*: Soengas *et al.*, 1996; *Sparus aurata*: Pascual *et al.*, 2003; Polakof *et al.* 2006; *Dentex dentex*: Morales *et al.*, 2004; *Dicentrarchus labrax*: Pérez-Jiménez *et al.*, 2007).

Os níveis plasmáticos de cortisol, glicose, lactato, proteínas e triglicéridos foram afectados pelas condições de stresse de diferentes formas. Os níveis plasmáticos de **cortisol** (Figura 9) apresentaram uma clara tendência de aumento por efeito da alta densidade, sendo este aumento significativo quando comparado entre animais alimentados e o grupo controlo. Estes resultados estão de acordo com os descritos previamente em *Sparus auratus* (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005). Comparando os níveis de cortisol com os já publicados para *Pagrus pagrus* previamente (Fanouraki *et al.*, 2007; Vargas-Chacoff *et al.* 2008), observou-se neste estudo que os níveis são mais elevados. Estas diferenças podem ser devidas a que a resposta ao stresse crónico seja diferente não só para cada espécie, mas também para cada stock. O aumento dos níveis de cortisol plasmático sob condições de alta densidade em várias espécies, tem vindo a ser demonstrado em muitos estudos (Vijayan *et al.*, 1990; Rotllant e Tort, 1997; Trenzado *et al.*, 2003). Este aumento relacionado com a situação de stresse está envolvido na primeira resposta do organismo, sendo que a segunda é a mobilização de reservas energéticas (Montero *et al.*, 2001). Outros estudos indicam que as catecolaminas aumentam imediatamente, quando confinadas a uma situação de stresse (Gamperl *et al.*, 1994), este aumento passageiro, resulta numa rápida quebra nos níveis

de glicogénio e, conseqüentemente numa elevação na concentração de glicose no plasma (Vijayan e Moon., 1994; Arends *et al.*, 1999). Desta maneira é possível que o cortisol esteja directamente ou indirectamente relacionado com outras hormonas e assim envolvido nas alterações do metabolismo dos hidratos de carbono (Reid *et al.*, 1992).

Em relação à **glicose** plasmática (Figura 10), não se observaram diferenças significativas ao longo da experiência, concordando este resultado com os observados previamente para a mesma espécie (Van der Salm *et al.*, 2004, Rotllant *et al.*, 1997). Fanouraki *et al.*, 2007, observaram que os níveis de glicose plasmática em *Pagrus pagrus* submetidos a um stress crónico apresentaram uma tendência a diminuir, esta hipoglicémia tem sido relatada em estudos anteriores para espécies submetidas a jejum (Navarro e Gutiérrez, 1995; Gillis e Ballantyne, 1996; Soengas *et al.*, 1996; Shimeno *et al.*, 1997; Pérez-Jiménez *et al.*, 2007). Contudo estas concentrações devem normalmente ser mantidas devido a, i) redução da taxa e utilização da glicose, ii) aumento dos potenciais de gliconeogénese e glicogenólise e iii) reforço da capacidade do fígado para exportar glicose (Navarro e Gutiérrez, 1995; Pereira *et al.*, 1995; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005; Polakof *et al.*, 2006). A glicose é um combustível essencial para uma série de tecidos, por isso é particularmente importante que os níveis sejam mantidos constantes durante a fase de jejum (Navarro e Gutiérrez, 1995; Gillis e Ballantyne, 1996).

Em relação ao **lactato** plasmático (Figura 11), não se observaram diferenças significativas aquando comparado com o grupo controlo. Contudo, aos 21 dias, os animais mantidos em jejum, tanto para altas como baixas densidades, apresentaram níveis significativamente inferiores aos exemplares alimentados. Este decréscimo nos níveis de lactato plasmático tem sido relacionado a um aumento da sua utilização como substrato para a gliconeogénese hepática (Vijayan *et al.*, 1996; Polakof *et al.*, 2006). Apesar destes resultados, existem também estudos que mostram níveis de lactato constantes em espécies de peixes sob condições de jejum (Hemre *et al.*, 1990; Blasco *et al.*, 1992; Vijayan *et al.*, 1993; Soengas *et al.*, 1996; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005). Em diversas espécies de telósteos o lactato pode também ser utilizado como fonte energética, em animais mantidos em condições de stresse (Pickering, 1981; Vijayan *et al.*, 1997). Os nossos resultados indicam que os animais mantidos em alta densidade (situação de stresse), apresentam valores mais baixos que os mantidos em baixa densidade (independentemente da condição alimentar), sugerindo que os exemplares de *Pagrus pagrus* sob situações de stresse crónico podem utilizar lactato como metabolito

energético para compensar as necessidades energéticas próprias destas situações (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Barton *et al.* 2002).

Os resultados deste estudo mostram como, situações de jejum ou alta densidade (situações de stresse) podem levar ao aumento dos níveis de cortisol plasmático (Figura 13). O cortisol estimula a depleção dos lípidos totais no fígado e no músculo vermelho de salmão, e estimula a depleção de triglicéridos no fígado através do aumento da actividade da triglicérido – lipase (Sheridan, 1994, Mommsen *et al.*, 1999). Os níveis de **triglicéridos** plasmáticos observados neste estudo (Figura 12), apresentaram decréscimos mais acentuados para grupos em jejum. Devido à inexistência de energia externa, proveniente da alimentação, o peixe utiliza as reservas lipídicas de forma a repor os níveis energéticos. Desta forma, existe um aumento do metabolismo lipídico (Sheridan e Mommsen, 1991; Polakof *et al.*, 2006), resultados já apresentados em alguns estudos em animais em jejum (Santulli *et al.*, 1997; Shimeno *et al.*, 1997; Polakof *et al.*, 2006; Pérez-Jiménez *et al.*, 2007; Mancera *et al.*, 2008).

Em situações de jejum os peixes utilizam as suas reservas lipídicas, como recurso inicial à falta de energia (energia esta proveniente da alimentação), as proteínas são armazenadas devido à sua extrema importância ao nível estrutural, utilizadas somente em caso de necessidade extrema. No presente estudo os níveis de **proteínas** plasmáticos (Figura 13), apresentaram decréscimos para os grupos em jejum, sugerindo o seu papel como fontes de combustível em situações de jejum prolongado, resultados já demonstrados em alguns estudos (Echevarría *et al.*, 1997; Shimeno *et al.*, 1997; Polakof *et al.*, 2007). Esta diminuição dos níveis de proteínas plasmáticas acentua-se em exemplares mantidos em condições de jejum (independentemente da sua condição de densidade), o que sugere que as proteínas plasmáticas podem ser utilizadas como fonte de energia em peixes, ajudando a manter os níveis de glicose. O uso de proteínas como fonte de combustível, em situações de jejum, corresponde a 24% da energia necessária para *O. mykiss* (Lauff e Wood, 1996). Além disso, os níveis de proteínas plasmáticas diminuem significativamente após prolongado estado de jejum em várias espécies (Echevarría *et al.*, 1997; Shimeno *et al.*, 1997; Polakof *et al.*, 2007).

Todas estas alterações observadas em níveis metabólicos plasmáticos permitem-nos sugerir que o cortisol produzido por stresse crónico, devido a alta densidade e jejum, poderá actuar produzindo alterações no metabolismo hepático ou mobilizando substratos, quer sobre o fígado, quer aumentando a procura energética em outros

tecidos. No presente estudo, no fígado dos animais mantidos em condições de jejum, observou-se um aumento do potencial glicogenólítico e gliconeogenólítico. Este aumento do potencial gliconeogenólítico no fígado é reforçado pelos dados obtidos em outras espécies (Bonamusa *et al* 1992) considerado por uma diminuição dos níveis de glicogénio (Figura 14). Um aumento do potencial glicogenólítico e gliconeogenólítico no fígado tem sido observado em outras espécies (Foster e Moon., 1991; Sheridan e Mommsen., 1991; Soengas *et al.*, 1996, 1998; Figueroa *et al.*, 2000; Figueiredo- Garutti *et al.*, 2002; Pottinger *et al.*, 2003; Kirchner *et al.*, 2005) e pode ser atribuído, na maior parte, ao aumento dos níveis de cortisol no plasma (Van der Boon *et al.*, 1991; Pickering, 1992; Wendelaar Bonga, 1997; Bernier e Perry, 1999). O efeito da densidade não apresentou variações significativas nos níveis de glicogénio, podendo este estar camuflado devido em grande parte ao efeito de jejum prolongado. Contudo, este efeito da densidade foi possível observar nos valores de glicose hepática (Figura 14). Tem-se observado que peixes submetidos a elevadas densidades de cultivo apresentam uma diminuição nos seus processos aeróbios, juntamente com um aumento da gliconeogénese hepática e uma baixa utilização de hidratos de carbono (Scott-Thomas *et al.*, 1992; LeFrançois *et al.*, 2001; Ruane *et al.*, 2002). De qualquer forma não foram observadas diferenças significativas diferentes nos valores de triglicéridos hepáticos (Figura 15), provavelmente devido a depleção das reservas lipídicas no fígado (Mommsen *et al.*, 1999). Atendendo aos resultados nos valores de aminoácidos livres no fígado (Figura 16), observou-se que ao dia 14 os valores foram maiores em animais mantidos a altas densidades, enquanto que aos 21 dias os níveis foram restabelecidos para valores similares aos do grupo controlo, isto mostra que quando existem alterações de homeostasia o organismo tenta repor o equilíbrio, uma sugestão, poderá ser os decréscimos de proteínas plasmáticas, que poderão ser utilizadas para repor estes níveis, provocados pela situação de stresse.

Tendo em conta que o músculo tem uma baixa capacidade de acumular reservas, os resultados obtidos, onde não se observou nenhuma alteração nos níveis de glicogénio e glicose muscular (Figura 17), já eram de esperar.

Durante períodos prolongados de jejum o catabolismo proteico do músculo é iniciado, desta forma os aminoácidos são a principal fonte de energia dos peixes, ajudando a manter os níveis de glicose (Cowey e Walton, 1989). As estratégias metabólicas empregues, parecem estar relacionadas, em grande parte, à quantidade e locais de armazenamento de lípidos (Love, 1970). Peixes “gordos” tais como o arenque, têm

grandes concentrações de lípidos no músculo, neste tipo de espécies existe uma pequena quebra de proteínas mesmo depois de largos períodos de fome (Inui e Ohshima, 1966; Love, 1970). Em contraste, espécies com menos quantidades de reservas lipídicas, as então chamadas de “peixes não gordos”, tendem a manter as reservas de hidratos de carbono, em detrimento da proteína activada pela gliconeogénese (Stimpson, 1965; Butler, 1968; Renaud e Moon, 1980). Os resultados do presente estudo sugerem que o pargo em situações de jejum, utiliza os aminoácidos em detrimento dos triglicéridos (Figura 19). É possível observar (Figura 20) que os níveis de aminoácidos para os grupos em jejum decrescem significativamente quando comparados com o grupo controlo.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que, não só as condições de altas densidades suscitam respostas de stresse, resposta primária (aumento de cortisol) e secundária (alterações metabólicas) em pargo, mas também a privação de alimentação. A maior parte das alterações são confirmadas por estudos prévios para outras espécies. Para além disso, os resultados obtidos para *Pagrus pagrus* confirmam a informação, indicando que os animais alimentados e mantidos a altas densidades apresentam maior sensibilidade ao stresse que os animais não alimentados mantidos a altas densidades. Este resultado não concorda com o observado previamente em dourada (Laiz-Carrión *et al*, 2005), onde o jejum aumenta a sensibilidade ao stresse em animais mantidos em altas densidades de cultivo. Esta discrepância poderá ser explicada pela manutenção de uma situação de alerta pela competição da comida entre animais alimentados e animais não alimentados, de onde poderia surgir um fenómeno de esgotamento energético em condições de stresse crónico prolongado. Futuras investigações seriam necessárias para poder fornecer informações sobre o assunto.

Neste estudo foi analisado o efeito de situações típicas aquando a manipulação de animais (jejum e alta densidade), no metabolismo da *Pagrus pagrus*. Para isso, foram analisados indicadores biométricos, assim como, parâmetros metabólicos ao nível plasmático, hepático e muscular. Os resultados permitiram-nos conhecer as modificações metabólicas que sofre esta espécie, quando submetida a estas condições de stresse (jejum e densidade) e desenvolver dietas que ajudem a reduzir os problemas metabólicos associados a estas situações. Estas dietas serão de grande utilidade para a prevenção de situações de stresse (agudo ou crónico), por exemplo em situações de manipulação *in vivo* ou simplesmente por transferência de animais entre tanques, a administração de uma dieta adequada antes ou durante a situação de stresse pode

atenuar as alterações metabólicas que o stresse induz. Também seria interessante a sua administração antes de uma situação de jejum, por exemplo em períodos de inverno, onde as baixas temperaturas induzem uma redução da ingestão, com a finalidade de preparar metabolicamente o animal antes das futuras modificações que podem sofrer.

5. Conclusão

O presente estudo mostra alterações nos níveis metabólicos plasmáticos, hepáticos e musculares, após prolongado período de jejum.

Condições de alta densidade e jejum, provocam aumentos nos níveis de cortisol plasmático, principal indicador da activação da resposta de stress em conjunto com um decréscimo nos restantes parâmetros plasmáticos.

O decréscimo dos níveis de lactato plasmático pode estar ligado à sua utilização como substrato na gliconeogénese hepática.

Os níveis de triglicéridos e proteínas plasmáticos apresentaram um decréscimo sugerindo um aumento do metabolismo lipídico e um aumento da sua utilização como fonte de combustível, respectivamente.

A nível hepático verificou-se um aumento dos potenciais de gliconeogénese e glicogenólise, observado através da diminuição dos níveis de glicogénio.

No músculo, uma diminuição dos níveis de aminoácidos livres sugeriu que estes são a principal fonte de energia dos peixes, ajudando a manter os níveis de glicose.

Os animais mantidos a altas densidades e alimentados apresentam maior sensibilidade ao stress que os animais em altas densidades e em jejum.

Os resultados demonstraram uma boa adaptabilidade do pargo e são necessários para melhorar o cultivo desta espécie.

6. Bibliografia

Adams M S, 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. American Fisheries Society Symposium 8, 1-8.

Altman, Arie 1998 "Agricultural Biotchnology" 527-528.

Arends RJ, Mancera JM, Muñoz JL, Wendelaar Bonga SE, Flik G. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J Endocrinol* 163:149- 157.

Baanante, I.V., P. Garcia de Frutos, L. Bonamusa, and F. Fernández. 1991. Regulation of fish glycolysis- gluconeogenesis: role of fructose-2, 6 -P₂ and PFK-2. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 11-17.

Barton B.A. and Iwama G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 129:3?26

Barton B.A., Morgan J.D and Vijayan, M.M (2002) Physiological and condition- related indicators of environmental stress on fish. In: *Biological Indicators of Aquatic Ecosystems Stress* (ed. by S.M. Adams), pp. 111-148. American Fisheries Society, Bethesda.

Bernier Nicholas J, Perry Steve F. 1999. The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction. *Aquaculture*, 177,285-295.

Bjerkeng B, Bolaños A, Cejas JR, Jerez S, Lorenzo A, Tejera N, Rodríguez C, 2007. Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources *Aquaculture*, 270, 218-230.

Blasco, J., Fernández, F., Gutiérrez, J. 1992. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. *J. Comp. Physiol. B.* 162, 539-546.

Bonamusa, L., P. Garcia de Frutos, F. Fernández, and I.V. Baanante. 1992. Nutritional effects on key glycolytic- gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1: 113-125.

Butler, D.G. Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 10, 85-91 (1968)

Cejas, J. R., Forés, R., Samper, M., Villamandos, J.E., Jerez, S., 1999. Resultados preliminares de engorde del bocinegro (*P. pagrus*). Actas del VII Congreso Nacional de Acuicultura, 19-21 Mayo 1999, Las Palmas de Gran Canaria, España, Ed. Viceconsejería de Agricultura y Pesca, Gobierno de Canarias, p.83.

Christiansen, D.C and L. Klungsøyr. 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 701-711.

Chrousos and Gold, J. *Am. Med. Assoc.* 267: 1244-1252 (1992)

Collins, A.L. and T.A. Anderson. 1997. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and apaxial muscle of the golden perch. *J. Fish Biol.* 50: 1158-1165.

Cowey, C.B. and Walton. 1989. Intermediary metabolism. *In* fish nutrition. J. Halver, editor. Academic Press New York, 259-329.

Dave, G., Johansson-Sjoberg, M.L., Larsson, A., Lewander, K. & Lidman, U. (1975). Metabolic and haematological effects of starvation in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp Biochem Physiol* 52A, 423-433.

Divanach P, Fanouraki E, Pavlidis M, 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*) Aquaculture, 265, 294-304.

Divanach p, Kentouri M, Charalambakis G, Pouget F & Sterioti A (1993). Comparison of growth performance of six Mediterranean fish species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self-feeders. In: *Production, Environment and Quality*. Bordeaux Aquaculture, 285-297. Special publication nº 18, European Aquaculture Society. Ghent.

Echevarría, G., Martínez-Bebía, M., Zamora, S., 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 118, 111-123.

Figueiredo- Garutti ML, Navarro I, Capilla E, Souza RHS, Moraes G, Gutiérrez J, Vicentini-Paulino MLM. 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post- feeding and fasting. *Comp Biochem Physiol* 132A: 467-476.

Figuerola RI, Rodríguez- Sabarís R, Aldegunde M, Soengas JL.2000. Effects of food deprivation on 24h- changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. *J Fish Biol* 57: 631- 646.

Foster GD, Moon TW. 1991. Hypometabolism with fasting in the yellow perch: a study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiol Zool* 64: 259-275.

French, C.J., Mommsen, T.P., Hochachka, P.W., 1981. Amino acid utilization in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Eur. J. Biochem.* 113, 311-317.

Gamperl AK, Vijayan MM, Boutilier RG. 1994. Epinephrine norepinephrine, and cortisol concentrations in cannulated seawater- acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss) following black box confinement and epinephrine injection. J Fish Biol 45:313-324.

Gillis, T.E., Ballantyne, J.S., 1996. The Effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in lake sturgeon. J. Fish Biol. 49, 1306-1316.

Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M., 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol. 21, 210-216.

Hemre, G.I., Lie, O., Sundby, A., 1993. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): metabolic responses to feeding and fasting. Fish Physiol. Biochem. 10, 455-463.

Ince, B.W. & Thorpe, A.(1976). The effects of starvation and force- feeding on the metabolism of the Northern pike, *Esox lucius* L. *Journal of Fish Biology* 8, 79-88.

Inui, Y. and Y. Ohshima: Effect of starvation on metabolism and chemical composition of eels. Bull. Jap. Soc. scient. Fish. 32, 492-501 (1966).

Iwama GK, Afonso LO, Todgham A, Ackerman P, Nakano K, 2004. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish. J Exp Biol. (Pt 1):15-9.

Jørgensen, E.H., Vijayan, M.M., Aluru, N., Maule, A.G., 2002. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose and lactate responses to a handling disturbance in Arctic charr. Comp. Biochem. Physiol. C 132, 235-245.

Kirchner S, Seixas P, Kaushik S, Panserat S. 2005. Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol 140B:333- 340.

Knox, D., M. J. Walto, and C.B. Cowey. 1980. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Marine Biol.* 56: 7-10.

Laíz- Carrión R, 2005. Osmorregulación en dorada *Sparus auratus* L. Control hormonal e implicaciones metabólicas.

Larsen, D.A., Beckman, B.R., Dickhoff, W.W., 2001. The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology (insulin, insulin-like growth factor-I, and thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123, 308-323.

Lauff, R.F., Wood, C.M., 1996. Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during starvation in juvenile trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol.* 165, 542-551.

Lefrançois C, Claireaux G, Mercier C, Aubin J. 2001. Effect of density on the routine metabolic expenditure of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 195:269-277.

Lima, Nelson., Mota, Manuel., 2003 “Biotecnologia Fundamentos e aplicações”.

Love, R.M. 1980. The chemical biology of fishes. Academic Press, New York.

Madrid, J.A., Boujard, T., Sánchez- Vázquez, F.J., 2001. Feeding rhythms. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.). Food intake in fish. Blackwell Science, UK, pp. 189-215.

Mancera, J.M., Vargas-Chacoff, L., García-López, A., Kleszczyńska, A., Kalamarz, H., Martínez-Rodríguez, G., Kulczykowska, E., 2008. High density and food deprivation affect arginine vasotocin, isotocin and melatonin in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 149, 92-97.

Mendez, G. & Wieser, W. (1993). Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environmental Biology of Fishes* 36, 73-81.

Méton I, Caseras A, Fernández F, Baanante I.V., 2004. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol. B* 138, 145-153.

Meyers, S.P., 1994. Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1069- 1076.

Mommsen, T.P and P.J.Walsh. 1992. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes. *Experientia* 48:583-593.

Mommsen, T.P. and E.M. Plisetskaya. 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. *Rev.Aquat.Sci.* 4: 225-259.

Mommsen, T.P., P.J. Walsh, and T.W.Moon. 1985. Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of Atlantic salmon. *Mol. Physiol.* 8: 89-100.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211-268.

Mommsen, T.P. 1986. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. *Can. J. Zool.* 64: 1110-1115.

Montero D, Robaina LE, Socorro J, Vergara JM, Tort L, Izquierdo MS, 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus*

aurata) juveniles held at high stocking density and fed an essentials fatty acid deficient diet. *Fish Physiol Biochem* 24: 63-72.

Moon, T.W and G.D.Foster. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In *Biochemistry and molecular biology of fishes*. P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, editors. Elsevier, Amsterdam. 65-100.

Moon, T.W.& Johnston, I.A. (1980). Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice *Pleuronectes platessa*. *Journal of Comparative Physiology* B36, 31-38.

Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 153-161.

Navarro, I., Blasco, J., Baños, N., Gutiérrez, J., 1997. Effects of fasting and plasma amino acid levels in brown trout. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 303-309.

Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation. In: Hochachaka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4 Elsevier, Amsterdam, pp. 393-434.

Pannevis MC, Houlihan DF, 1992. The energetic cost of protein synthesis in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Physiol [B]*.162(5):393-400.

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*). *Chem-Biol. Interact.* 145, 191-199.

Pereira, C., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1995. *In vitro* hepatocyte metabolism of alanine and glucose and the response to insulin in fed and fasted rainbow trout. *J. Exp. Zool. A* 271, 425-431.

Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 2007. Metabolic responses to short starvation and re-feeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265, 325-335.

Pickering A. D.; Pottinger T. G 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson *General and Comparative Endocrinology*, 76, 310-321.

Pickering, A. D. 1984, Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 53, 252-259.

Pickering, A.D. 1981. *Stress and fish*. Academic Press, London.

Pirhonen, J., Schreck, C.B., Reno, P.W., Ögüt, H., 2003. Effects of fasting on feed intake, growth and mortality of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, during an induced *Aeromonas salmonicida* epizootic. *Aquaculture* 216, 31-38.

Polakof, S., F. J. Arjona, S. Sangiao-Alvarellos, M. P. Martín del Río, J.M. Mancera, and J. L. Soengas. 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Comp. Physiol. B*. 176: 441-452.

Polakof, S., J.M. Míguez, and J. L. Soengas. 2007c. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A: 363-374.

Pottinger, T.G Rand- Weaver, M., Sumpter, J.P., 2003. Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136, 403-417.

Reid SD, Moon TW, Perry SF. 1992. Rainbow trout hepatocyte beta- adrenoceptors, catecholamine responsiveness, and effects of cortisol. *Am J Physiol* 262:R794- R799.

Renaud, J.M & Moon, T.W. (1980). Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice *Pleuronectes platessa*. *Journal of Comparative Physiology B*36, 31-38.

Rotland J, Tort L. 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J Fish Biol* 51: 21-28.

Rotlland J, Arends RJ, Mancera JM, Flik G, Wendelaar Bonga SE, Tort L. 2000. Inhibition of HPI axis responses to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiol Biochem* 23: 13-22.

Rotlland J, Balm PHM, Pérez- Sánchez J, Wendelaar Bonga SE, Tort L. 2001. Pituitary and interregal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen Comp Endocrinol* 121:333- 342.

Rotllant J, Tort L, 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J Fish Biol* 51: 21-28.

Rueda, F.M., Martinez, F.J., Zamora, S., Kentouri, M., Divanach, P., 1998. Effect of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. *Aquacult. Res.* 29, 447-452.

Ruena NM, Carballo EC, Komen J. 2002. Increased stocking density influences the influence the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquacult Res* 33:777-784.

Ruiz-Amil M., Soler-Grau G. and Garrito A.P. (1987). In: Espinosa de los Monteros, J.y Lasarte, U. (Eds.), Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura (PEUGA). Nutrición en acuicultura, Vol. I. Metabolismo glucídico y lipídico en especies acuáticas, pp. 197- 224.

Sánchez-Muros, M.J., García-Rejón, L., García-Salguero, L., de la Higuera, M., Lupiáñez, J.A., 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int. J. Biochem. Cell B.* 30, 55-63.

Sangiao Alvarellos, S., J.M. Guzmán, R. Láiz- Carrión, J.M. Míguez, M.P. Martín Del Río, J. M. Mancera, and J. L. Soengas. 2005a. Interactive effects of the high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool.* 303A:761-775.

Santulli, A., Messina, C.M., D'Amelio, V., 1997. Variations of lipid and apolipoprotein content in lipoproteins during fasting in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 118, 1233-1239.

Schreck CB, 1990. Physiological, behavioral, and performance indicators of stress. *American Fisheries Society Symposium* 8, 29-37.

Scott- Thomas DAF, Ballantyne JS, Leatherland JF. 1992. Interactive effects of high density and triiodothyronine- administration on aspects of the in vivo intermediary metabolism and in vitro hepatic response to catecholamine and pancreatic hormone stimulation in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J Exp Zool* 263: 68- 82.

Sheridan M.A. (1988). Lipids dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilitation. *Comp.Biochem. Physiol.* **90B**: 679-690.

Sheridan MA, Mommsen TP (1991) Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of Coho Salmon, *Oncorhynchus Kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 81: 473-483.

Sheridan, M.A.(1994) Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **197B**: 495-508.

Shimeno, S., Kheyyali, D., Takeda, M., 1990. Metabolic adaptation to prolonged starvation in carp. *Nippon Suisan Gakk.* 56, 35-41.

Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T., Kheyyali, D., 1997. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 151, 371-377.

Soengas, J.L., Strong, E.F., Fuentes, J., Veira, J.A.R., Andrés, M.D., 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 491-511.

Stimpson, Joice H. 1965. Comparative aspects of the control of glycogen utilization in vertebrate liver .

Sundby, A., K. Eliassen, A.K. Blom, and T.Asgard. 1991a. Plasma insulin, glucagon-like peptide and glucose levels in response to feeding, starvation and life long restricted feed ration in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 253-259.

Van den Thillart, G. (1986). Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdner*). Oxidation rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine and glutamate. *J. Comp. Physiol.* **156B**: 511-520.

Van der Boon, J., van den Thillart, G.E.E.J.M., Addink, A.D.F., 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 100, 47-53.

Van der Salm A.L, Martínez M, Flik G, Wendelaar Bonga S.E. 2004. Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 241, 371-386.

Vangliano FA, Quiroga MI, Nieto JM, 2002. Metabolic adaptation to food deprivation and refeeding in fish.

Vargas-Chacoff L, Calvo A, Muñoz JL, Tinoco A.B, Ruiz-Jarabo I, Mancera J.M y Cárdenas S. 2008. Efecto de la salinidad y densidad de cultivo sobre la biometría y el metabolismo en alevines de bocinegro, *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758)

Vijayan M.M., Pereira C., Grau E.G. and Iwama G.K. (1997). Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.* **116C**: 89-95.

Vijayan MM, Ballantyne JS, Leatherland JF. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88: 371- 381.

Vijayan MM, Moon TW. 1994. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can J Zool* 72: 379-386.

Vijayan, M.M., Manic, A.G., Schreck, C.B., Moon, T.W., 1993. Hormonal control of hepatic glycogen metabolism in food-deprived, continuously swimming coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 1676-1682.

Vijayan, M.M., Morgan, J.D., Sakamoto, T., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1996. Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. *J. Exp. Biol.* **199**, 2467-2475.

Voet, Donald e Voet, Judith G., 1995. "Biochemistry".

Walton M.J and Cowey C.B (1982). Aspect of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**:59-79.

Washburn, B.S., Bruss, M.L., Avery, E.H. and Freedland, R.A. (1992). Effects of estrogen on whole animal and tissue glucose use female and male rainbow trout. *Am.J. Physiol.* **263**: R1241-R1247.

Weber J.M and Haman, F. (1996) Pathways for metabolic fuels and oxygen in high performance fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **113**: 33-38.

Wendelaar Bonga S.E (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* **77**: 591-625.

Wilson, R.P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* **124**: 67-80.
www.fishbase.org

www.geocities.com

www.horta.uac.pt

www.icgeb.org

www.ordembilogos.pt