



## Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes

Luís Eugénio Castanheira da Conceição<sup>1</sup>, Cláudia Aragão<sup>1</sup>, Nadège Richard<sup>1</sup>, Sofia Engrola<sup>1</sup>, Paulo Gavaia<sup>1</sup>, Sara Mira<sup>1</sup>, Jorge Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciências do Mar - CCMAR, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139, Faro, Portugal.

**RESUMO** - Os requisitos nutricionais de larvas de peixes são ainda mal compreendidos, o que leva a altas mortalidades e problemas de qualidade no seu cultivo. Este trabalho pretende fazer uma revisão de novas metodologias de investigação, tais como estudos com marcadores, genómica populacional, programação nutricional, genómica e proteómica funcionais, e fornecer ainda alguns exemplos das utilizações presentes e perspectivas futuras em estudos de nutrição de larvas de peixes.

Palavras-chave: estudos com marcadores, genómica, nutrição de larvas de peixes, programação nutricional, proteómica

## Recent advances in nutrition of fish larval

**ABSTRACT** - Major gaps in knowledge on fish larval nutritional requirements still remain, what leads to high mortalities and quality problems in marine larviculture. This paper reviews a range of new tools, such as tracer studies, population genomics, nutritional programming, functional genomics and proteomics, as well as some examples of their present use, and potential future applications in the study of fish larvae nutrition.

Key Words: fish larvae nutrition, genomics, nutritional programming, proteomics, tracer studies

Abreviaturas: AA - aminoácido(s); ADN - ácido desoxirribonucleico; DAPA - dias após primeira alimentação; DAE - dias após a eclosão; DIGE - *difference gel electrophoresis*; HUFA - ácidos gordos altamente insaturados; MAS - selecção assistida por marcadores; PCR - reacção de polimerização em cadeia; QTL(s) - *quantitative trait loci*; SNP - *single nucleotide polymorphism*.

## Introdução

A produção de juvenis de peixes de alta qualidade é um dos factores chaves para o crescimento sustentável da indústria da aquacultura. Ainda que já se produzam grandes quantidades de larvas de muitas espécies de peixes, as taxas de sobrevivência são muitas vezes baixas ou variáveis, existem problemas de qualidade (e.g., deformações no esqueleto, anomalias de pigmentação) e o potencial de crescimento nem sempre é aproveitado ao máximo (e.g., Koumoundouros et al., 1997; Shields, 2001; Cahu et al., 2003). Estes problemas são causados, pelo menos em parte, por deficiências nutricionais, pois mesmo para as espécies melhor estudadas existem ainda muitas lacunas acerca dos requisitos nutricionais das larvas de peixes, em particular dos marinhos (Takeuchi, 2001; Bell et al., 2003; Cahu et al., 2003). O progresso no seu estudo é lento e difícil, devido ao pequeno tamanho das larvas e a dificuldades na aceitação de microdietas inertes.

No entanto, nos últimos anos, vários métodos novos permitiram progressos significativos e abriram boas perspectivas futuras no estudo dos requisitos nutricionais de larvas de peixes. Estes incluem estudos com marcadores, isotópicos ou outros, modelação mecânica, genómica de populações, genómica funcional, proteómica, entre outras.

Este artigo pretende fazer uma revisão destas novas metodologias de investigação e fornecer ainda alguns exemplos das suas utilizações presentes e futuras em estudos de nutrição de larvas de peixes.

### *Estudos com marcadores*

#### *Tube-feeding*

O método *tube-feeding* controlado de nutrientes radiomarcados foi desenvolvido por Rust et al. (1993) e modificado por Rønnestad et al. (2001a), permitindo estimar a fracção evacuada, catabolizada e retida de cada nutriente pelas larvas de peixe. Este método tem sido aplicado para estudar a digestão, absorção e metabolismo de proteínas e

lípidos em larvas de diferentes espécies de peixes. Alguns estudos analisaram a dinâmica de absorção de aminoácidos (AA) livres, péptidos e proteínas hidrolisadas ou intactas pelas larvas de peixes (Rønnestad et al., 2000; Rojas-García & Rønnestad, 2003; Tonheim et al., 2005), demonstrando que estas têm dificuldade em digerir dietas contendo proteínas complexas, como é o caso das dietas contendo farinha de peixe. Outros estudos demonstraram ainda que a absorção dos lípidos a nível intestinal diminui à medida que a sua complexidade aumenta e que a digestibilidade dos ácidos gordos é maior quanto maior for o seu grau de insaturação (Morais et al., 2005a,b; Mollan et al., 2008).

A técnica de “tube-feeding” tem também sido utilizada para o estudo do metabolismo de AA individuais. Assim, foi demonstrado que as larvas de peixe usam preferencialmente os AA dispensáveis como substrato energético, sendo os AA indispensáveis preferencialmente utilizados para crescimento (Rønnestad et al., 2001b; Conceição et al., 2002; Appelbaum & Rønnestad, 2004). Da mesma forma, verificou-se que os AA aromáticos (fenilalanina e tirosina) são preferencialmente retidos em larvas de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) durante o clímax da metamorfose (Pinto et al., 2009).

Esta técnica permite também analisar os efeitos a curto prazo dos suplementos de AA das dietas no metabolismo larvar, assim como verificar se determinados AA estão a limitar a síntese proteica (Aragão et al., 2004; Saavedra et al., 2008a,b). Embora com o recurso a técnica de “tube-feeding” seja possível ultrapassar diversos constrangimentos inerentes ao estudo da digestão e metabolismo de nutrientes em larvas de peixe, deve considerar que o stress imposto às larvas ao utilizar esta técnica pode alterar as suas taxas de digestão, absorção e utilização (Conceição et al., 2007a). No entanto, em espécies resistentes ao stress, como o linguado do Senegal, esta técnica não aparenta afectar a capacidade de ingestão ou de utilização do alimento pelas larvas (Ribeiro et al., 2008). Por outro lado, o recurso a esta técnica pode também conduzir a um valor sobrestimado da retenção de nutrientes, pois usualmente são utilizadas larvas em jejum ou que são alimentadas uma única vez, o que pode conduzir a um aumento da eficiência de absorção (Conceição et al., 2007a; Engrola et al., 2009).

#### Marcação de artemia

A metodologia de incorporação de marcadores isotópicos em presas vivas tem sido utilizada em vários estudos larvares de modo a quantificar a ingestão de alimento, permitindo também uma melhor compreensão do metabolismo proteico e lipídico (Govoni et al., 1982; Conceição et al., 1998; Morais et al., 2006). A metodologia

base implica a incorporação de AA marcados com  $^{14}\text{C}$  na proteína de *Artemia* (Morais et al., 2004a) e se a mesma for conjugada com o método das câmaras metabólicas (Rønnestad et al., 2001a), como descrito na secção anterior, é possível determinar a ingestão de alimento e como o nutriente marcado é digerido, retido e catabolizado pela larva. A utilização desta metodologia em diferentes fases larvares de peixes permite uma melhor compreensão da capacidade digestiva da larva, assim como relacioná-la com o metabolismo de nutrientes. Sendo assim, Morais et al. (2004b) e Engrola et al. (2009) observaram que as larvas de linguado do Senegal possuem uma elevada absorção/digestibilidade da proteína de *Artemia* (57-83% do total de *Artemia* ingerida), entre os 8 e 35 DAE. Isto indica que o linguado tem uma elevada capacidade para digerir presas vivas desde o início do desenvolvimento larvar. Em larvas de arenque (*Clupea harengus*) com 31 DAPA, a absorção/digestibilidade da proteína de *Artemia* foi de 60%, da qual 39% foi catabolizada e 20% retida pelas larvas (Morais et al., 2004a).

Ingredientes protéicos, como a farinha de peixe, utilizados nas dietas para larvas de peixes poderão ser muito complexos para o sistema digestivo imaturo destas (Rønnestad & Conceição, 2005; Conceição et al., 2007a), causando assim uma reduzida digestibilidade proteica. Como a digestibilidade e a retenção proteica são processos chave para a definição de um crescimento larvar óptimo, assim como para a taxa de sobrevivência, Engrola et al. (*in press*) avaliaram os efeitos de dois níveis distintos de substituição de *Artemia* por dietas inertes em larvas de linguado do Senegal, determinando a digestibilidade e retenção da proteína de *Artemia* com a utilização da metodologia de incorporação de nutrientes marcados com isótopos. O regime alimentar com uma baixa substituição (20% do total de *Artemia* por dieta inerte) não afectou a utilização proteica larvar. Porém, as larvas submetidas ao regime com uma elevada substituição (58% do total de *Artemia* por dieta inerte) sofreram uma redução na absorção/digestibilidade e na eficiência de retenção da proteína de *Artemia* entre os 6 e 15 DAE (Engrola et al., *in press*). Em relação à utilização lipídica larvar, Mai et al. (*in press*) observaram que as larvas de linguado do Senegal quando submetidas a um regime alimentar com substituição de *Artemia* por dieta inerte gerem com maior cuidado a relação crescimento e digestibilidade lipídica, porém sem por em causa a utilização metabólica dos lípidos. A retenção lipídica na fase larvar anterior à metamorfose foi maior nas larvas do regime alimentar com elevada substituição de *Artemia* por dieta inerte, valores de 50%, enquanto quase duplicou durante o clímax da metamorfose, atingindo valores de 80%. Os

resultados sugerem que o crescimento larvar é afectado durante o clímax da metamorfose, porém as larvas conseguem compensar a redução da digestibilidade proteica aumentando a eficiência de retenção dos lípidos.

A modelação mecanística tem sido usada para integrar os conhecimentos existentes e melhor compreender os resultados obtidos em estudos com marcadores (Conceição et al., 2007b). Enquanto os estudos com marcadores isotópicos fazem medições pontuais em certo(s) ponto(s) do desenvolvimento, a modelação mecanística permite integrar a análise cinética da distribuição do marcador isotópico entre os diferentes compartimentos (*pools*). Simulações com um modelo baseado nos resultados de Morais et al. (2004b), em que larvas de linguado foram alimentadas com uma refeição de artémia marcada com  $^{14}\text{C}$ -AA, sugerem que a digestão e processamento metabólico da proteína contida na artémia se efectua essencialmente nas primeiras três horas após a alimentação (Conceição & Rønnestad, 2004) e que, de forma a otimizar o potencial de crescimento de larvas de linguado, estas devem ser alimentadas com uma elevada frequência.

Em conclusão, a combinação de marcadores isotópicos com diferentes ingredientes e tipos de alimentos poderá ser utilizada para uma melhor compreensão da plasticidade metabólica larvar e ser relacionada com a performance de crescimento. A obtenção de um conhecimento profundo de como as larvas digerem os diferentes nutrientes (proteína e lípidos) e seguidamente como os vários AA e ácidos gordos são transformados em proteínas ou catabolizados para energia, poderá ser crucial para o desenvolvimento de dietas inertes adequadas para larvas de peixe.

#### *Biodisponibilidade*

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos métodos de forma a determinar os requisitos qualitativos de AA nas larvas de peixes, tendo em conta as diferenças na biodisponibilidade de cada AA (e.g., Conceição et al., 2003a; Saavedra et al., 2007). As biodisponibilidades dos diversos AA podem ser diferentes entre elas, devido a uma absorção e/ou um catabolismo selectivo. Estes métodos recentemente desenvolvidos permitem determinar a biodisponibilidade relativa individual de vários AA nas larvas de peixe, ou seja, quantificam a eficiência de absorção e a taxa de catabolismo de cada AA quando comparado com outro AA (Conceição et al., 2003b). O princípio básico destes métodos consiste em alimentar as larvas com uma dieta marcada com isótopos estáveis ou radioactivos e posteriormente analisar o enriquecimento isotópico relativo de cada AA individualmente, quer na dieta quer na larva.

Após se ter estimado as biodisponibilidades relativas individuais de cada AA, estes resultados podem ser aplicados ao perfil de AA indispensáveis das larvas e assim obtém-se uma estimativa do perfil de AA ideal da dieta. Esta metodologia fornece-nos uma estimativa mais precisa dos requisitos qualitativos de AA das larvas de peixes, do que aquela que é obtida utilizando apenas os perfis de AA indispensáveis das larvas como indicador.

Exemplos da aplicação deste método podem já ser encontrados na literatura. Por exemplo, Conceição et al. (2003a) utilizaram este método para determinar a biodisponibilidade relativa de cada AA nas larvas de dourada (*Sparus aurata*). Aplicando as estimativas assim obtidas ao perfil de AA indispensáveis de larvas de dourada, Aragão Teixeira (2004) demonstrou que a treonina era um AA limitante na dieta, enquanto a lisina não o era, contrariamente ao sugerido quando não se aplicam os resultados da biodisponibilidade. Da mesma forma, Saavedra et al. (2007) estimaram a biodisponibilidade relativa dos AA nas larvas de sargo-bicudo (*Diplodus puntazzo*) e demonstraram que, quando se tem em consideração estes dados, em certas fases de desenvolvimento das larvas o conteúdo de lisina, metionina e treonina na dieta é deficitário, enquanto o de leucina se encontra em excesso, contrariamente ao que era aparente não utilizando os dados de biodisponibilidade. Embora esta técnica forneça uma indicação mais precisa sobre os requisitos qualitativos de AA das larvas de peixes, convém sempre ter em consideração que a biodisponibilidade relativa de cada AA é específica para cada espécie e que provavelmente apresenta diferenças ao longo da ontogénese dos peixes (Conceição et al., 2007a).

#### *Turnover de proteínas*

A utilização de AA da dieta, após a sua absorção a nível intestinal, depende da quantidade que é usada para a produção de energia, mas também da intensidade do *turnover* de proteínas. As proteínas dos tecidos estão em permanente renovação, através dos processos de síntese e degradação (ou *turnover*) de proteínas. O crescimento, ou a deposição de proteínas, depende do resultado líquido destes dois processos de sinal contrário ou seja, de um aumento da síntese proteica e/ou de uma diminuição do *turnover* de proteínas (Wiesner & Zak, 1991).

Foi já demonstrado que as larvas de peixe por crescerem rapidamente tendem a ser mais eficientes na deposição de proteínas comparadas com larvas de crescimento mais lento (Conceição et al., 2008). Isto explica-se pelo facto de larvas com maior taxa de crescimento terem necessariamente uma

taxa de síntese proteica maior, porém a taxa de *turnover* de proteínas não acompanha a tendência, ao contrário do que acontece em peixes juvenis e adultos (Houlihan et al., 1994). Esta peculiaridade das larvas de peixes resulta provavelmente da vantagem selectiva de um maior tamanho, que por sua vez se traduz numa forte vantagem competitiva de larvas de crescimento rápido (logo mais eficientes na utilização da proteína) durante a selecção natural (Kjørboe, 1989; Conceição et al., 1997).

Está também demonstrado que um *turnover* de proteínas elevado pode ter vantagens importantes em termos de uma adaptação mais rápida a alterações ambientais e a outras condições de stress (Kjørboe et al., 1987; Hawkins 1991). Os mexilhões (*Mytilus edulis*) ao apresentarem taxas de *turnover* de proteínas mais elevadas têm uma adaptação mais rápida a um choque de temperatura (Hawkins et al., 1987). As larvas de pregado (*Scophthalmus maximus*) ao serem alimentadas com rotíferos enriquecidos com um imunoestimulante apresentaram uma taxa de *turnover* de proteína três vezes superior ao de um grupo controlo (Conceição et al., 2002), o que pode significar uma maior resistência a eventuais patógenos. No entanto, e uma vez que o *turnover* de proteínas tem um elevado custo energético (Houlihan, 1991), qualquer aumento no *turnover* tende a provocar uma diminuição no crescimento. Assim, as larvas de peixes nos seus diferentes estádios de desenvolvimento poderão também ter de fazer uma escolha, ou encontrar um compromisso, entre um crescimento rápido e/ou uma maior capacidade de resposta a condições de stress e de doença (Conceição et al., 2002).

#### Seleção de dieta

Atualmente, a maioria dos regimes alimentares para larvas de peixes marinhos é estruturada de modo a incorporar presas vivas e dietas inertes, pois as últimas são mais fáceis de utilizar e apresentam uma composição estável durante todo o período de cultivo, enquanto as presas vivas variam a sua composição conforme as condições de cultivo ou enriquecimento utilizado. Conjuntamente, a incorporação de marcadores isotópicos nas pequenas partículas das dietas para larvas, de modo a ser possível determinar a escolha de dietas (ingestão de alimento) e consequente utilização metabólica, é extremamente difícil, além de que devido às reduzidas dimensões das partículas a lixiviação de nutrientes é muito elevada (López-Alvarado et al., 1994; Yúfera et al., 2002; Kvåle et al., 2006; Nordgreen et al., 2007). Por conseguinte, para que seja possível determinar que dieta (presa viva ou dieta inerte) uma larva prefere e como os seus nutrientes são utilizados é necessário desenvolver

novas metodologias que sejam adaptadas a fases larvares de peixes.

Geralmente, a determinação de ingestão de alimento em larvas é realizada através da contagem directa das presas (Haylor, 1993; MacKenzie et al., 1999) ou partículas de dietas inertes (Fernández-Díaz et al., 1994; Yúfera et al., 1995). Esta metodologia é extremamente morosa e por vezes incorrecta. Portanto, foi proposto que a metodologia de marcadores isotópicos poderia ser utilizada para a determinação do efeito dos regimes alimentares em larvas de peixe (revisto por Conceição et al., 2007a). A utilização de isótopos estáveis (e.g.,  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ) ou de radioisótopos (e.g.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  ou  $^{35}\text{S}$ ) para a determinação da ingestão de alimento e metabolismo de nutrientes em larvas foi um avanço na melhoria das técnicas, pois estas são mais simples de utilizar e possuem níveis elevados de detecção (Boehlert & Yoklavich, 1984; Rust, 1995; Kolkovski et al., 1997; Conceição et al., 2001; Kvåle et al., 2006; Gamboa-Delgado et al., 2008; Jomori et al., 2008; Engrola et al., 2009). Sendo assim, foi observado em pós-larvas de linguado do Senegal de 16-17 DAE alimentadas com substituição de *Artemia* por dieta inerte, que estas ingerem 11% de alimento em relação ao peso corporal, com uma digestibilidade de 57% (Engrola et al., 2009) e que deste alimento, 62% é utilizado para crescimento (Gamboa-Delgado et al., 2008). Em larvas de dourada, utilizando uma metodologia de marcação isotópica dupla (dieta inerte marcada com  $^{14}\text{C}$  e *Artemia* marcada com  $^3\text{H}$ ), foi possível observar que existe um aumento de ingestão da dieta inerte por parte da larva quando esta se encontra na presença de *Artemia* (Kolkovski et al., 1997). Contudo, a metodologia de incorporação de radiomarcadores possui algumas limitações. A determinação da ingestão de alimento é realizada em volumes pequenos o que é bastante diferente da situação normal de cultivo larvar e produz lixo radioactivo. Por outro lado, os métodos para determinação do consumo de alimento através de marcadores estáveis podem ser utilizados nas situações normais de cultivo, porém tornam-se mais dispendiosos a nível económico.

Os marcadores inertes (e.g., óxido de ítrio, colestano e óxido de crómio) são muito usados em estudos de utilização de nutrientes em juvenis e peixes adultos (Austreng et al., 2000; Carter et al., 2003), porém devido às limitações tecnológicas na fabricação de dietas inertes para larvas, normalmente tal metodologia não é aplicada em fases larvares. No último ano, com a melhoria de tecnologia de fabrico e determinação analítica, os marcadores inertes começaram a ser utilizados em estudos de metabolismo com larvas (Cook et al., 2008). Consequentemente, Johnson et al.

(2009) após conseguirem incorporar na dieta inerte óxido de ítrio, determinaram que larvas de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) com 58 DAE têm um consumo de alimento de dieta inerte e *Artemia* de 0.57-0.79% e 0.67-0.84%, respectivamente. O método ainda possui algumas limitações, nomeadamente é muito dependente da espécie pois é necessário recolher as fezes das larvas.

Em conclusão, vários métodos podem ser utilizados para a determinação do alimento que as larvas preferem ingerir, porém nenhum dos aqui apresentados consegue ser ao mesmo tempo simples e fácil de aplicar por rotina.

#### *Genómica populacional*

Quando se pretende avaliar a performance de um indivíduo torna-se importante conhecer a sua ascendência, sendo particularmente relevante em condições de aquacultura identificar as famílias e os cruzamentos que produziram descendência com a presença de um determinado fenotípo.

Os marcadores moleculares permitem inferir paternidades e traçar as origens dos indivíduos. Os microssatélites têm sido os marcadores de selecção para este tipo de estudos devido aos elevados níveis de variabilidade que apresentam (Liu & Cordes, 2004). Cerca de 4 a 10 *loci* microssatélites podem ser suficientes para identificar com 95% de confiança o par de progenitores de mais de 90% dos indivíduos de uma amostra (Bekkevold et al., 2002; Brown et al., 2005; Blonk et al., 2009). Contudo, o número de *loci* a usar depende do tamanho da população reprodutora. É no entanto de salientar o facto de os microssatélites apresentarem por vezes elevadas frequências de erros de genotipagem, tais como alelos nulos e *drop out* (Castro et al., 2004, 2006), e que estes erros podem enviesar os resultados. Um programa de selecção de reprodutores pode ser estabelecido com base na escolha de um carácter específico, retendo apenas os indivíduos que apresentem o fenotípo seleccionado para constituir o grupo de reprodutores. No entanto, é aconselhável monitorizar a diversidade genética e os níveis de consanguinidade dos reprodutores seleccionados para evitar cruzamentos entre indivíduos aparentados, de forma a prevenir a erosão genética do stock e as consequências negativas de cruzamentos consanguíneos (Gallardo et al., 2004; Porta et al., 2006). Por isso, os marcadores moleculares podem ser utilizados num programa de rotina para monitorizar a diversidade genética, tal como foi implementado na dourada (Blanco et al., 2007), truta marisca (*Salmo trutta*; Was & Wenne 2002; Gross et al., 2007), salmão do Atlântico (*Salmo salar*; Norris et al., 2000), bacalhau do Atlântico (Pampoulie

et al., 2006) e falso alabote japonês (*Paralichthys olivaceus*; Liu et al., 2005).

Normalmente, os programas de selecção de reprodutores escolhem caracteres que podem ser facilmente identificados individualmente (peso, tamanho, crescimento, etc.), melhorando os programas usando selecção massiva. Porém, os caracteres que são mais difíceis de identificar ou que se manifestem tardiamente, tais como a eficiência alimentar ou o índice de condição, podem ser considerados bons candidatos para efectuar uma selecção assistida por marcadores (MAS; Chistiakov et al., 2006). Como pré-requisito para implementar uma MAS deve existir uma associação entre o marcador genético e os genes que afectam o fenotípo (carácter) de interesse. Localizar essas associações corresponde à pesquisa de QTLs (*Quantitative Trait Loci* - Liu & Cordes, 2004). Vários QTLs já foram identificados em peixes, alguns relacionados com o peso (O'Malley et al., 2003; Reid et al., 2005) ou comprimento (Borrell et al., 2004). Tao & Boulding (2003) estudaram dez genes relacionados com o complexo da hormona de crescimento para encontrar relações com caracteres de crescimento no salvelino ártico (*Salvelinus alpinus*) e um SNP revelou associação com o crescimento.

Os marcadores moleculares são ferramentas de grande utilidade para serem implementadas em programas de reprodução, de forma a identificar e traçar a origem e ancestralidade de larvas de peixe. No entanto, encontrar caracteres de interesse, nomeadamente os relacionados com crescimento e nutrição de peixes, em larvas em particular, que permitam a construção de mapas de QTLs é uma área recente com muito ainda para explorar. A combinação de conhecimento da genómica e os recursos da genética populacional permitirá detectar variabilidade associada a caracteres de interesse, sendo possível num futuro próximo a implementação de MAS em muitas espécies em aquacultura. A aplicação destas metodologias em estádios iniciais de desenvolvimento, tais como larvas, poderá acelerar o processo de programas de selecção e aumentar o seu sucesso trazendo novos conhecimentos para a optimização da nutrição e crescimento em aquacultura.

#### *Genómica funcional*

A quantidade crescente de informação que tem surgido na sequência da clonagem de genes e através dos programas de sequenciação dos genomas de algumas espécies de teleósteos produzidas em aquacultura, permitiu aos investigadores e aquacultores terem uma melhor perspectiva sobre a forma como os factores nutricionais influenciam a expressão e regulação a nível genético. A partir da obtenção

da sequência completa do genoma do peixe zebra (*Danio rerio*) foi possível desenvolver novas ferramentas moleculares para a investigação, tais como *microarrays*, que tornaram possível testar os efeitos de uma determinada condição experimental sobre a expressão genética de uma espécie ou estágio de desenvolvimento e, juntamente com estratégias quantitativas como o PCR em tempo real, permitem ter uma resposta integrada sobre as alterações que ocorrem num determinado grupo de genes seleccionados. Um *microarray* de 16000 sequências de ADN complementar de salmão do Atlântico desenvolvido pelo consórcio GRASP (von Schalburg et al., 2005) e um novo *microarray* recentemente desenvolvido para a dourada que contém 20000 oligonucleótidos, (Ferraresso et al., 2008) permitirão aos aquacultores pesquisar as alterações na expressão de genes, que ocorrem durante o desenvolvimento e alimentação larvar ou em indivíduos submetidos a experiências nutricionais. A clonagem molecular e a quantificação da actividade de enzimas digestivas de peixes, como a pepsina gástrica (Darias et al., 2005), as enzimas pancreáticas tripsina (Male et al., 2004) e amilase (Douglas et al., 2000; Darias et al., 2006) ou as enzimas intestinais leucina-alanina peptidase, aminopeptidase ou fosfatase alcalina (Cahu et al., 1999; Zouiten et al., 2008), tornaram possível compreender melhor os mecanismos e alterações moleculares que ocorrem a nível digestivo durante o desenvolvimento larvar. A técnica de PCR quantitativo em tempo real é actualmente o método mais exacto de quantificação dos níveis de expressão genética (Fernandes et al., 2008), permitindo obter resultados mais fiáveis e rápidos que as técnicas convencionais e elimina o uso de sondas radioactivas normalmente utilizadas em hibridação do tipo “Northern”. Esta técnica tem ainda a vantagem de reduzir a quantidade de material biológico usado para análise, o que é particularmente útil quando se trabalha com amostras larvares. Pela combinação da quantificação de expressão por PCR em tempo real com hibridação *in situ* para a localização e identificação dos tipos celulares responsáveis pela expressão de genes, numa determinada altura ou condição experimental, torna-se possível ter uma resposta integrada sobre as fases de desenvolvimento e a forma como uma espécie pode metabolizar os componentes de uma formulação nutricional na sua dieta. Assim sendo, quando um nutriente é testado na dieta é possível estudar a expressão e a presença das enzimas responsáveis pela sua digestão, tornando-se então possível determinar qual a dieta mais adequada para cada fase de desenvolvimento. Uma alteração a nível da expressão

das enzimas digestivas foi recentemente observada em larvas de taíinha-liça (*Chelon labrosus*) quando a sua dieta muda de carnívora para herbívora (Zouiten et al., 2008), sugerindo que a actividade das enzimas digestivas está geneticamente programada para responder às alterações ontogénicas na dieta.

#### *Proteómica funcional*

O estudo da expressão do proteoma de um organismo, o resultado final da expressão dos seus genes, permite compreender os efeitos estruturais e funcionais causados por factores ambientais, incluindo a nutrição. A electroforese bidimensional, que combina a separação das proteínas de acordo com o seu ponto isoeléctrico bem como pelo seu peso molecular (López, 2007), seguida da identificação das proteínas por espectrometria de massa (Cañas et al., 2006) é a metodologia mais frequentemente utilizada para estudos de proteómica funcional. A proteómica pode ser vista como uma técnica complementar à genómica funcional, uma vez que permite o estudo, sem hipóteses prévias, da expressão do conjunto de proteínas presentes num tecido, incluindo eventuais modificações pós-tradução (e.g., glicosilação, fosforilação).

A utilização da proteómica na investigação com peixes é recente, ainda que já existam alguns estudos na área da nutrição. Estes trabalhos permitiram já identificar múltiplas alterações metabólicas em resposta a factores nutricionais, tais como a variação no conteúdo energético ou a inclusão de fontes de proteína vegetal nas dietas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; Martin et al., 2003; Vilhelmsson et al., 2004; Kolditz et al., 2008). A aplicação de técnicas de proteómica em larvas de peixes é difícil, devido ao seu reduzido tamanho e da dificuldade associada em dissecar os diferentes tecidos. Desta forma, os poucos trabalhos existentes focam essencialmente na variação do proteoma durante a ontogenia (Focant et al., 2003; Link et al., 2006; Sveinsdóttir et al., 2008).

Há no entanto já resultados preliminares sobre efeitos de nutrientes, como a vitamina K (Richard et al., 2008) e hidrolisados proteicos (Richard et al., dados não publicados), no metabolismo de larvas de peixes marinhos. Avanços tecnológicos recentes, nomeadamente a técnica de DIGE que permite uma maior sensibilidade e menor tamanho de amostra (Marouga et al., 2005; Link et al., 2006), em conjunto com novas técnicas de microdissecção, prometem para um futuro próximo avanços significativos na compreensão dos efeitos nutricionais no metabolismo de larvas de peixes.

### Programação nutricional

Estudos científicos recentes com animais terrestres e humanos reforçam a ideia que eventos pré-natais e neonatais (tais como a nutrição e a vacinação materna ou factores ambientais), se exercidos em estádios específicos do desenvolvimento, podem afectar de forma significativa o potencial de crescimento e a resistência a doenças dos indivíduos adultos (Lucas, 1998; Waterland & Garza, 1999; Metcalfe & Monaghan, 2001).

O conhecimento sobre o potencial da programação nutricional em peixes é escasso. No salmão do Atlântico, Macqueen et al. (2008) observaram que variações na temperatura da água durante a embriogénese condicionam o fenótipo miogénico (número de fibras musculares e diâmetro) em indivíduos adultos. Um estudo recente de Guerden et al. (2007) demonstrou que um estímulo hiper-glucídico exercido na primeira alimentação das larvas de truta arco-íris permitiu um aumento da actividade de algumas enzimas associadas à digestão dos glúcidos em peixes juvenis, sugerindo uma alteração fisiológica persistente. Do mesmo modo, observou-se que larvas de robalo-legítimo (*Dicentrarchus labrax*), quando alimentadas com dietas deficientes em HUFA, demonstraram um aumento da expressão da  $\Delta 6$ -desaturase no estádio juvenil (Vagner et al., 2007). O carácter definitivo e os mecanismos que controlam tais alterações são actualmente desconhecidos.

Após a desova e até ao início da alimentação exógena, o saco vitelino é a única fonte de nutrientes disponíveis para o desenvolvimento embrionário dos peixes. Esta situação deve-se ao fato de as membranas estruturais dos ovos e embriões de peixes apresentarem uma elevada impermeabilidade. A informação disponível sobre a composição bioquímica das reservas do saco vitelino e sobre os padrões de depleção dos diversos substratos nutricionais durante o desenvolvimento embrionário é abundante (Kamler, 2008). No entanto, caso o início da alimentação exógena não se processe da forma mais adequada, as larvas de peixes marinhos podem estar sujeitas à privação de alguns nutrientes essenciais. Uma eventual deficiência nutricional é particularmente importante nestas fases precoces do desenvolvimento, que se caracterizam por elevadas taxas de crescimento e de síntese protéica. Pode-se especular se esta ocorrência afecta de forma permanente o potencial de crescimento e a modulação de vias metabólicas nos peixes.

A validação do conceito da programação nutricional em peixes pode permitir avanços importantes na área da nutrição de larvas de peixes. Ao beneficiar das novas

abordagens da nutrigenómica, a investigação futura deve contribuir para melhor compreensão e identificação dos estímulos nutricionais que permitam programar os processos biológicos e metabólicos que ocorrem durante as fases precoces do desenvolvimento dos peixes (e.g., retenção proteica, miogénese de fibras musculares, metabolismo ósseo). As aplicações práticas podem ser vastas. Por exemplo, a identificação de um estímulo nutricional que melhore a utilização metabólica de glúcidos por parte dos peixes, pode abrir novas perspectivas na utilização de ingredientes de origem vegetal nos alimentos para a aquicultura. Em termos gerais, a programação nutricional ao nível dos reprodutores e/ou larvas, conjuntamente com práticas adequadas de alimentação e de cultivo podem ser ferramentas importantes na optimização de uma produção em larga escala de juvenis de elevada qualidade.

### Conclusões

O conhecimento das bases biológicas e nutricionais para o desenvolvimento de melhores dietas e regimes alimentares para larvas de peixes melhorou muito nos últimos anos, através do uso de técnicas utilizando marcadores isotópicos e de genómica funcional. No entanto, a compreensão da fisiologia da nutrição, bem como dos requisitos nutricionais, das larvas de peixes é ainda muito limitada. Espera-se que num futuro próximo as metodologias aqui discutidas tenham um papel fulcral para a construção de uma base sólida de conhecimentos que permita optimizar as dietas e regimes alimentares para larvas de peixes de diferentes espécies.

### Literatura Citada

- APPELBAUM, S.; RØNNESTAD, I. Absorption, assimilation and catabolism of individual free amino acids by larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, v.230, p.313-322, 2004.
- ARAGÃO TEIXEIRA, C. **Towards the assessment of amino acid requirements in seabream and sole larvae**. 2004. 141f. PhD (Thesis) - Universidade do Algarve, Faro, 2004.
- ARAGÃO, C.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; MARTINS, D. et al. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, v.233, p.293-304, 2004.
- AUSTRENG, E.; STOREBAKKEN, T.; THOMASSEN, M.S. et al. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. **Aquaculture**, v.188, p.65-78, 2000.
- BEKKEVOLD, D.; HANSEN, M.; LOESCHCKE, V. Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*, L.). **Molecular Ecology**, v.11, p.91-102, 2002.
- BELL, J.G.; MCEVOY, L.A.; ESTEVEZ, A. et al. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. **Aquaculture**, v.227, p.211-220, 2003.

- BLANCO, G.; BORRELL, Y.J.; BERNARDO, D. The use of microsatellites for optimizing broodstock in a hatchery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture**, v.272, p.246, 2007.
- BLONK, R.J.W.; KOMEN, J.; KAMSTRA, A. et al. Levels of inbreeding in group mating captive broodstock populations of common sole, (*Solea solea*), inferred from parental relatedness and contribution. **Aquaculture**, v.289, p.26-31, 2009.
- BOEHLERT, G.W.; YOKLAVICH, M.M. Carbon assimilation as a function of ingestion rate in larval pacific herring, *Clupea harengus pallasi* Valenciennes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.79, p.251-262, 1984.
- BORRELL, Y.J.; ALVAREZ, J.; VAZQUEZ, E. et al. Applying microsatellites to the management of farmed turbot stocks (*Scophthalmus maximus* L.) in hatcheries. **Aquaculture**, v.241, p.133-150, 2004.
- BROWN, R.C.; WOOLLIAMS, J.A.; MCANDREW, B.J. Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, v.247, p.219-225, 2005.
- CAHU, C.; ZAMBONINO INFANTE, J.; QUAZUGUEL, P. et al. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. **Aquaculture**, v.171, p.109-119, 1999.
- CAHU, C.; ZAMBONINO INFANTE, J.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v.227, p.245-258, 2003.
- CAÑAS, B.; LÓPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FEMÁNDEZ, A. et al. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v.4, p.295-320, 2006.
- CARTER, C.G.; LEWIS, T.E.; NICHOLS, P.D. Comparison of cholestane and yttrium oxide as digestibility markers for lipid components in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets. **Aquaculture**, v.225, p.341-351, 2003.
- CASTRO, J.; BOUZA, C.; PRESA, P. et al. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. **Aquaculture**, v.242, p.119-135, 2004.
- CASTRO, J.; PINO, A.; HERMIDA, M.A. microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. **Aquaculture**, v.261, p.1194-1203, 2006.
- CHISTIYAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v.255, p.1-29, 2006.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; HOULIHAN, D.; VERRETH, J. Fast growth, protein turnover and costs of protein metabolism in yolk-sac larvae of the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.16, p.291-302, 1997.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; DERSJANT-LI, Y.; VERRETH, J.A.J. Cost of growth in larval and juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to growth rate, feed intake and oxygen consumption. **Aquaculture**, v.161, p.95-106, 1998.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; SKJERMO, J.; SKJÅK-BRØK, G. et al. Effect of an immunostimulating alginate on protein turnover of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.24, p.207-212, 2001.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; RØNNESTAD, I.; TONHEIM, S.K. Metabolic budgets for lysine and glutamate in unfed herring (*Clupea harengus*) larvae. **Aquaculture**, v.206, p.305-312, 2002.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; GRASDALEN, H.; DINIS, M.T. A new method to estimate the relative bioavailability of individual amino acids in fish larvae using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.134, p.103-109, 2003a.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; GRASDALEN, H.; RØNNESTAD, I. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. **Aquaculture**, v.227, p.221-232, 2003b.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; RØNNESTAD, I. Utilisation of dietary amino acids in fish larvae: towards an explanatory model. In: ADAMS, S.; OLAFSEN, J.A. (Eds.). **Aquaculture Europe '04 – Biotechnologies for Quality Inference**, European Aquaculture Society, Special Publication. Oostende: 2004. v.34, p.237-238.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; MORAIS, S.; RØNNESTAD, I. Tracers in fish larvae nutrition: a review of methods and applications. **Aquaculture**, v.267, p.62-75, 2007a.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; MORAIS, S.; ARAGÃO, C. Fluxos de nutrientes em larvas de peixes: aplicação de técnicas com marcadores isotópicos e de modelação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.11-20, 2007b.
- CONCEIÇÃO, L.E.C.; MORAIS, S.J.; DINIS, M.T. et al. Tracer studies in fish larvae. In: CYRINO, J.E.P.; BUREAU, D.; KAPOOR, B.G. (Eds.) **Feeding and digestive functions in fishes**. Enfield: Science Publishers, 2008. p.349-392.
- COOK, M.A.; JOHNSON, R.B.; NICKLASON, P. et al. Marking live feeds with inert metal oxides for fish larvae feeding and nutrition studies. **Aquaculture Research**, v.39, p.347-353, 2008.
- DARIAS, M.J.; MURRAY, H.M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. et al. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). **Aquaculture**, v.248, p.245-252, 2005.
- DARIAS, M.J.; MURRAY, H.M.; GALLANT, J.W. et al. Characterization of a partial alpha-amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): expression during larval development. **Comparative Biochemistry Physiology Part B**, v.143, p.209-218, 2006.
- DOUGLAS, S.E.; MANDLA, S.; GALLANT, J.W. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. **Aquaculture**, v.190, p.247-260, 2000.
- ENGROLA, S.; MAI, M.; DINIS, M.T. et al. Co-feeding of inert diet from mouth opening does not impair protein utilization by Senegalese sole larvae. **Aquaculture**, v.287, p.185-190, 2009.
- ENGROLA, S.; DINIS, M.T.; CONCEIÇÃO, L.E.C. Senegalese sole larvae growth and protein utilization may be depressed when co-fed with inert diet depending on level of *Artemia* replacement. **Aquaculture Nutrition**, in press.
- FERNANDES, J.M.O.; MOMMENS, M.; HAGEN, Ø. et al. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.150, p.23-32, 2008.
- FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live feed. **Marine Biology**, v.118, p.323-328, 1994.
- FERRARESSO, S.; VITULO, N.; MININNI, A.N. et al. Development and validation of a gene expression oligo microarray for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **BMC Genomics**, v.9, p.580, 2008.
- FOCANT, B.; VANDEWALLE, P.; HURIAUX, F. Expression of myofibrillar proteins and parvalbumin isoforms during the development of a flatfish, the common sole *Solea solea*: comparison with the turbot *Scophthalmus maximus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.135, p.493-502, 2003.
- GALLARDO, J.A.; GARCIA, X.; LHORENTE, J.P. et al. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. **Aquaculture**, v.234, p.111-122, 2004.
- GAMBOA-DELGADO, J.; CAÑAVATE, J.P.; ZEROLO, R. et al. Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese

- sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, v.280, p.190-197, 2008.
- GEURDEN, I.; ARAMENDI, M.; ZAMBONINO-INFANTE, J. et al. Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.292, p.2275-2283, 2007.
- GOVONI, J.J.; PETERS, D.S.; MERRINER, J.V. Carbon assimilation during larval development of the marine teleost *Leiostomus xanthurus* Lacépède. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.64, p.287-299, 1982.
- GROSS, R.; LULLA, P.; PAAVER, T. Genetic variability and differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains in Northern and Eastern Europe. **Aquaculture**, v.272, p.S139-S146, 2007.
- HAWKINS, A.J.S. Protein turnover: a functional appraisal. **Functional Ecology**, v.5, p.222-233, 1991.
- HAWKINS, A.J.S.; WILSON, I.A.; BAYNE, B.L. Thermal responses reflect protein turnover in *Mytilus edulis* L. **Functional Ecology**, v.1, p.339-351, 1987.
- HAYLOR, G.S. Controlled hatchery production of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822): an estimate of maximum daily feed intake of *C. gariepinus* larvae. **Aquaculture and Fisheries Management**, v.24, p.473-482, 1993.
- HOULIHAN, D.F. Protein turnover in ectotherms and implications for energetics. In: GILLES, R. (Ed.) **Advances in comparative and environmental biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. v.7. p.1-43.
- HOULIHAN, D.F.; COSTELLO, M.J.; SECOMBES, C.J. et al. Effects of sewage sludge exposure on growth, feeding and protein synthesis of dab *Limanda limanda* L. **Marine Environment Research**, v.37, p.331-353, 1994.
- JOHNSON, R.B.; COOK, M.A.; NICKLASON, P.M. et al. Determination of apparent protein digestibility of live *Artemia* and a microparticulate diet in 8-week-old Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. **Aquaculture**, v.288, p.290-298, 2009.
- JOMORI, R.K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D.J. et al. Stable carbon ( $^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}$ ) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, v.39, p.370-381, 2008.
- KAMLER, E. Resource allocation in yolk-feeding fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.18, p.143-200, 2008.
- KIØRBOE, T. Growth in fish larvae: are they particularly efficient? **Rapports et Proces-Verbaux des Reunions du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer**, v.191, p.383-389, 1989.
- KIØRBOE, T.; MUNK, P.; RICHARDSON, K. Respiration and growth of larval herring *Clupea harengus*: relation between specific dynamic action and growth efficiency. **Marine Ecology Progress Series**, v.40, p.1-10, 1987.
- KOLDITZ, C.-I.; PABOEUF, P.; BORTHAIRE, M. et al. Changes induced by dietary energy intake and divergent selection for muscle fat content in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), assessed by transcriptome and proteome analysis of the liver. **BMC Genomics**, v.9, p.506, 2008.
- KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, v.155, p.193-205, 1997.
- KOUMOUNDOUROS, G.; GAGLIARDI, F.; DIVANACH, P. et al. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. **Aquaculture**, v.149, p.215-226, 1997.
- KVÅLE, A.; YÚFERA, M.; NYGÅRD, E. et al. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. **Aquaculture**, v.251, p.402-415, 2006.
- LINK, V.; CARVALHO, L.; CASTANON, I. et al. Identification of regulators of germ layer morphogenesis using proteomics in zebrafish. **Journal of Cell Science**, v.119, p.2073-2083, 2006.
- LIU, Z.J. CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v.238, p.1-37, 2004.
- LIU, Y.; CHEN, S.; LI, B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers. **Aquaculture**, v.243, p.103-111, 2005.
- LÓPEZ, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography B**, v.849, p.190-202, 2007.
- LÓPEZ-ALVARADO, J.; LANGDON, C.J.; TESHIMA, S.I. et al. Effects of coating and encapsulation of crystalline amino acids on leaching in larval feeds. **Aquaculture**, v.122, p.335-346, 1994.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **Journal of Nutrition**, v.458, p.401S-406S, 1998.
- MACKENZIE, B.R.; UBERSCHÄR, B.; BASFORD, D. et al. Diel variability of feeding activity in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae in the East Shetland area, North sea. **Marine Biology**, v.135, p.361-368, 1999.
- MACQUEEN, D.J.; ROBB, D.H.F.; OLSEN, T. et al. Temperature until the 'eyed stage' of embryogenesis programmes the growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon. **Biology Letters**, v.4, p.294-298, 2008.
- MAI, M.G.; ENGROLA, S.; MORAIS, S. et al. Co-feeding of live feed and inert diet from first-feeding affects *Artemia* lipid digestibility and retention in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquaculture** (in press).
- MALE, R.; LORENS, J.B.; SMALÅS, A.O. et al. Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. **European Journal of Biochemistry**, v.232, p.677-685, 2004.
- MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.382, p.669-678, 2005.
- MARTIN, S.A.M.; VILHELMSSON, O.; MEDALE, F. et al. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1651, p.17-29, 2003.
- METCALFE, N.B.; MONAGHAN, P. Compensation for a bad start: grow now, pay later? **Trends in Ecology Evolution**, v.16, p.254-260, 2001.
- MOLLAN, T.A.; TONHEIM, S.K.; HAMRE, K. Pre-hydrolysis improves absorption of neutral lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae. **Aquaculture**, v.275, p.217-224, 2008.
- MORAIS, S.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; DINIS, M.T. et al. A method for radiolabeling *Artemia* with applications in studies of food intake, digestibility, protein and amino acid metabolism in larval fish. **Aquaculture**, v.231, p.489-487, 2004a.
- MORAIS, S.; LACUISSE, M.; CONCEIÇÃO, L.E.C. et al. Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. **Marine Biology**, v.145, p.243-250, 2004b.
- MORAIS, S.; KOVEN, W.; RØNNESTAD, I. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. **Aquaculture**, v.246, p.347-357, 2005a.
- MORAIS, S.; KOVEN, W.; RØNNESTAD, I. et al. Dietary protein:lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a teleost larva. **British Journal of Nutrition**, v.93, p.813-820, 2005b.

- MORAIS, S.; TORTEN, M.; NIXON, O. et al. Food intake and absorption are affected by dietary lipid level and lipid source in seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.331, p.51-63, 2006.
- NORDGREEN, A.; HAMRE, K.; LANGDON, C. Development of lipid microbeads for delivery of lipid and water-soluble materials to *Artemia*. **Aquaculture**, v.273, p.614-623, 2007.
- NORRIS, A.T.; BRADLEY, D.G.; CUNNINGHAM, E.P. Parentage and relatedness determination in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. **Aquaculture**, v.182, p.73-83, 2000.
- O'MALLEY, K.G.; SAKAMOTO, T.; DANZMANN, R.G. et al. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: Testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes. **Journal of Heredity**, v.94, p.273-284, 2003.
- PAMPOULIE, C.; JORUNSDOTTIR, T.D.; STEINARSSON, A. et al. Genetic comparison of experimental farmed strains and wild Icelandic populations of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture**, v.261, p.556-564, 2006.
- PINTO, W.; FIGUEIRA, L.; DINIS, M.T. et al. How does fish metamorphosis affect aromatic amino acid metabolism? **Amino Acids**, v.36, p.177-183, 2009.
- PORTA, J.; PORTA, J.M.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, G. et al. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. **Aquaculture**, v.251, p.46-55, 2006.
- REID, D.P.; SZANTO, A.; GLEBE, B. et al. QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Heredity**, v.94, p.166-172, 2005.
- RIBEIRO, L.; FERREIRA, V.; HUBERT, F. et al. Does a higher CCK release promote a better feed utilisation by fish post-larvae? In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING, 13., 2008, Florianópolis. **Abstracts...** Florianópolis, 2008. p.312.
- RICHARD, N.; GAVAIA, P.J.; CORDEIRO, O. et al. Dietary vitamin K supplementation and expression of proteins involved in skeleton development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH NUTRITION AND FEEDING, 13., 2008, Florianópolis. **Abstracts...** Florianópolis, 2008. p.165.
- ROJAS-GARCÍA, C.R.; RØNNESTAD, I. Assimilation of dietary free amino acids, peptides and protein in post-larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Marine Biology**, v.142, p.801-808, 2003.
- RØNNESTAD, I.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; ARAGÃO, C. et al. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Journal of Nutrition**, v.130, p.2809-2812, 2000.
- RØNNESTAD, I.; ROJAS-GARCÍA, C.R.; TONHEIM, S.K. et al. *In vivo* studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. **Aquaculture**, v.201, p.161-175, 2001a.
- RØNNESTAD, I.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; ARAGÃO, C. et al. Assimilation and catabolism of dispensable and indispensable free amino acids in post-larval Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.130, p.461-466, 2001b.
- RØNNESTAD, I.; CONCEIÇÃO, L.E.C. Aspects of protein and amino acids digestion and utilization by marine fish larvae. In: STARCK, J.M.; WANG T. (Eds.) **Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates**. Enfield: Science Publishers, 2005. p.389-416.
- RUST, M.B. **Quantitative aspects of nutrient assimilation in six species of fish larvae**. 1995. 150f. PhD (Thesis) - University of Washington, Washington, 1995.
- RUST, M.; HARDY, R.W.; STICKNEY, R.R. A new method for force-feeding larval fish. **Aquaculture**, v.116, p.341-352, 1993.
- SAAVEDRA, M.; BELTRAN, M.; POUSSÃO-FERREIRA, P. et al. Evaluation of bioavailability of individual amino acids in *Diplodus puntazzo* larvae: Towards the ideal dietary amino acid profile. **Aquaculture**, v.263, p.192-198, 2007.
- SAAVEDRA, M.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; POUSSÃO-FERREIRA, P. et al. Metabolism of tryptophan, methionine and arginine in *Diplodus sargus* larvae fed rotifers: effect of amino acid supplementation. **Amino Acids**, v.35, p.59-64, 2008a.
- SAAVEDRA, M.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; HELLAND, S. et al. Effect of lysine and tyrosine supplementation in the amino acid metabolism of *Diplodus sargus* larvae fed rotifers. **Aquaculture**, v.284, p.180-184, 2008b.
- SHIELDS, R.J. Larviculture of marine finfish in Europe. **Aquaculture**, v.200, p.55-88, 2001.
- SVEINSDÓTTIR, H.; VILHELMSSON, O.; GUDMUNDSDÓTTIR, Á. Proteome analysis of abundant proteins in two age groups of early Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D**, v.3, p.243-250, 2008.
- TAKEUCHI, T. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. **Aquaculture**, v.200, p.203-222, 2001.
- TAO, W.J.; BOULDING, E.G. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Heredity**, v.91, p.60-69, 2003.
- TONHEIM, S.K.; ESPE, M.; HAMRE, K. et al. Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.321, p.19-34, 2005.
- VAGNER, M.; ZAMBONINO INFANTE, J.L.; ROBIN, J.H. et al. Is it possible to influence European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile metabolism by a nutritional conditioning during larval stage? **Aquaculture**, v.267, p.165-174, 2007.
- VILHELMSSON, O.T.; MARTIN, S.A.M.; MEDALE, F. et al. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition**, v.92, p.71-80, 2004.
- Von SCHALBURG, K.R.; RISE, M.L.; COOPER, G.A. et al. Fish and chips: various methodologies demonstrate utility of a 16,006-gene salmonid microarray. **BMC Genomics**, v.6, p.126, 2005.
- WAS, A.; WENNE, R. Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. **Aquaculture**, v.204, p.493-506, 2002.
- WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.179-97, 1999.
- WIESNER, R.J.; ZAK, R. Quantitative approaches for studying gene expression. **American Journal of Physiology**, v.260, p.L179-L188, 1991.
- YÚFERA, M.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E. Feeding rates of gilthead seabream (*Sparus aurata*), larvae on microcapsules. **Aquaculture**, v.134, p.257-268, 1995.
- YÚFERA, M.; KOLKOVSKI, S.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. et al. Free amino acid leaching from a protein-walled microencapsulated diet for fish larvae. **Aquaculture**, v.214, p.273-287, 2002.
- ZOUITEN, D.; KHEMIS, I.B.; BESBES, R. et al. Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in "mesocosms". **Aquaculture**, v.279, p.166-172, 2008.