



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ONTOGENIA DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DO TAMBAQUI, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818): SUBSÍDIOS PARA AQUICULTURA.

KATHERINE LÓPEZ VÁSQUEZ

Manaus – Amazonas
2009



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**ONTOGENIA DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DO TAMBAQUI, *Collossoma
macropomum* (CUVIER, 1818): SUBSÍDIOS PARA AQUICULTURA.**

KATHERINE LÓPEZ VÁSQUEZ

Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.

Tese apresentada ao programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia do Convênio UFAM-INPA, como parte dos requisitos para obtenção de título de doutor em Biotecnologia, Área de concentração, Agroflorestal.

**Manaus – Amazonas
2009**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor(a).

Vásquez, Katherine López

V999o ONTOGENIA DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DO TAMBAQUI,
COLOSSOMA MACROPOMUM (CUVIER, 1818): SUBSÍDIOS
PARA AQUICULTURA/ Katherine López Vásquez. 2009

145 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Adalberto Luis Val

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas.

1. Colossoma macropomum. 2. tambaqui. 3. enzimas digestivas. 4. ontogenia. I. Val, Adalberto Luis II. Universidade Federal do Amazonas III. Título.

**DEDICATÓRIA ESPECIAL
(In Memoriam)**

Ao meu amado filho Gabriel

*Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós."*

("Antoine de Saint-Exupery").

Conversando com Deus

- Meu Deus,
tenho meu lado torto
à espera de que o endireites,
meus vícios antigos
que de mim não desgrudam,
uma cegueira que me faz tropeçar...
Ah! Sim, e uma surdez milenar.
Não foi loucura tua teres me escolhido?

-De que duvidas? Do meu juízo?

-Não, exatamente, nem pensar!
É que, às vezes, me sinto tão perdida
Que tenho medo de fraquejar.

-Mas dei-te um filho! Já não te basta?

-Este é o problema: não sou capaz!

-É para isso que ele veio:
Pra te ajudar.
Vai ser por ele que te acordarás,
que aprenderás a ensinar,
que pensarás nas tuas escolhas,
correndo o risco de errar
pelas tuas certezas,
e até nas dúvidas investirás.
Ele é o lado reto que te endireita,
o vício bom que te mantém,
os olhos límpidos que te perdoam,
o eco da minha voz.
Não serás tu que o sustentarás,
será ele a te estimular,
a te fazer crescer
Por mais que te escondas,
ele estará contigo,
vestindo tua pele,
chamando por ti,
te sacudindo,
sempre investindo,
sem desistir.
Então...
ainda achas que eu errei?

(Maria Salete Interciso)

Aos meus pequenos Sophia, Jasmin e Leonardo

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, fonte de tudo, por acompanhar-me nesta caminhada;

Ao Cristhian, pelo amor e companheirismo incondicionais, além da força e encorajamento constantes que me ajudaram a dar mais este passo.

À minha família: meus pais, minhas irmãs e irmãos postigos e meus sobrinhos, pelo carinho, incentivo e apoio nas horas de dificuldade, obrigada por estarem sempre presentes mesmo a quase 5000 Km de distância;

Ao meu orientador Dr. Adalberto Luis Val, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, mas, sobretudo, pela amizade, orientação, auxílio, atenção, e ensinamentos durante a realização dos trabalhos, minha gratidão e todo meu respeito;

À Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val, pelo carinho e amizade, além dos ensinamentos e conselhos de mãe durante todos estes anos.

À MSc. Nazaré Paula da Silva, pela amizade, paciência e tolerância e sempre disposição na resolução dos problemas neste tempo de convivência;

À amiga Karen Yuri Suguiyama da Silva pela inestimável ajuda nas determinações bioquímicas. Sem a sua ajuda a concretização deste trabalho teria sido bem mais complicada;

Aos amigos Ramon Baptista e Marcos Lima, pela amizade e pelas inúmeras discussões esclarecedoras sobre a expressão gênica por PCR em tempo real;

Ao Dr. Sérgio Nozawa, pelo desenho dos oligos iniciadores e orientação na quantificação da expressão gênica;

Ao Dr. Carlos Edwar de Freitas, pela ajuda nas análises estatísticas;

À MSc. Frida Casanova, pela assistência técnica no seqüenciamento das amostras;

Ao MSc. Alexandre Honzaryck, pela doação dos exemplares de tambaqui (ovos e larvas) que fizeram parte das experiências preliminares deste trabalho;

À Dona Sonia, pelos inúmeros cafezinhos e momentos de verdadeira descontração na copa do laboratório, mas, sobretudo pelas vezes que, sem reclamar ou até reclamando, teve que limpar minha sujeira;

Às amigas do coração, Alzira, Christiane e Luciana por todos os momentos que compartilhamos, pela amizade incondicional, carinho, brigas, desentendimentos e especialmente por me suportar, sem reclamar, nos meus muitos momentos de

mau humor. Não há palavras para expressar meu carinho por vocês. Qualquer coisa seria pouca;

A todos os amigos do LEEM, de forma especial a Maria Angélica, Nivia, Sandra, Vivian, Viviane, Rafael, Thiago, Carol, Raquel, Daiani, Ana Helena, Manuela, Gisele, Rubens e Ronildo. Foi muito bom estar com vocês todos esses anos; amigos como vocês fazem me sentir menos longe de casa;

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por possibilitar a realização deste curso;

Aos professores, amigos e colegas do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelos ensinamentos, companheirismo e troca de experiências que em muito contribuiu para a minha formação;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por possibilitar a realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do projeto: “Peixes da Amazônia. Biomarcadores para a qualidade ambiental em cenários envolvendo aspectos sociais e econômicos”;

Ao INCT ADAPTA, com suporte financeiro do CNPq e da FAPEAM, pelo apoio na fase final do desenvolvimento do trabalho;

À Secretaria de Estado da Produção Agropecuária, Pesca e desenvolvimento Rural Integrado – SEPROR, por permitir a realização deste trabalho nas instalações do Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aqüicultura - CTTPA/Balbina;

Aos funcionários do CTTPA/Balbina, especialmente ao Engenheiro de Pesca Mario Baracho, pela valiosa ajuda na realização do trabalho, desde a montagem das incubadoras, seleção dos reprodutores, reprodução induzida e coleta do material biológico;

E, finalmente, um agradecimento sincero a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A espécie <i>Colossoma macropomum</i>	4
2.2 Mecanismos digestivos.....	5
2.3. Ontogenia das enzimas digestivas	13
3. OBJETIVOS	19
4. HIPÓTESES.....	20
CAPITULO I: Atividade das principais enzimas digestivas do tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1818) durante os primeiros estágios do desenvolvimento.	21
5. INTRODUÇÃO	21
6. MATERIAL E MÉTODOS	23
6.1. Material biológico.....	23
6.2. Preparação do extrato enzimático	27
6. 3. Determinação da proteína solúvel	27
6.4. Determinação das atividades enzimáticas.....	27
6.4.1. Enzimas Pancreáticas.....	27
6.4.1.1. Tripsina (E.C. 3.4.21.4).....	27
6.4.1.2. Quimiotripsina (E.C. 3.4.21.1).....	28
6.4.1.3. Carboxipeptidase A (E.C. 3.4.17.1)	28
6.4.1.4. Carboxipeptidase B (E.C.3.4.17.2)	29
6.4.1.5. Amilase (E.C. 3.2.1.1).....	29
6.4.1.6 Lipase (não específica, E.C. 3.1.1.).....	30
6.4.2. Enzimas Intestinais	30
6.4.2.1 Maltase (E.C. 3.2.1.20).....	30
6.4.2.2. Fosfatase Alcalina (E.C. 3.1.3.1)	31
6.4.2.3. Leucina aminopeptidase (E.C.3.4.11.1).....	31
6.4.3. Enzimas gástricas	32
6.4.3.1. Pepsina (E.C. 3.4.23.1)	32
6.5. Análise dos parâmetros físico-químicos da água	33

6.6. Amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$)	33
6. 7. Determinação do Nitrito (NO_2)	33
6.8. Análise de dados	34
7. RESULTADOS	35
7.1. Variáveis físico-químicas da água	35
7.2. Enzimas pancreáticas.....	36
7.3. Enzimas intestinais	45
7.4. Enzima gástrica	50
8. DISCUSSÃO	52
8.1. Variáveis Físico-químicas da água	52
8.2. Desenvolvimento ontogenético das enzimas digestivas	53
8.3. Enzimas pancreáticas.....	55
8.4. Enzimas Intestinais	62
8.5. Enzima gástrica	64
9. CONCLUSÕES	68
CAPITULO II: Expressão gênica do tripsinogênio e pepsinogênio durante os primeiros estágios do desenvolvimento de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> (CUVIER, 1818).	71
1. INTRODUÇÃO	71
1.1. Expressão gênica das enzimas digestivas	73
1.2. A técnica de PCR em tempo real.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	78
2.1. Material biológico.....	78
2.2. Desenho dos oligonucleotídeos	78
2.3. Extração de RNA total	79
2.4. Tratamento com DNase I	80
2.5. Síntese de DNA complementar	80
2.6. Amplificação por PCR.....	81

2.7. Purificação dos fragmentos provenientes da reação de PCR.....	82
2.8. Sequenciamento dos produtos amplificados por PCR.....	82
2.9. Análise das sequências	83
2.10. Desenho dos oligonucleotídeos para qRT-PCR	84
2.11. Confirmação de especificidade dos oligonucleotídeos	87
2.12. Reação de qRT-PCR	88
2.13. Eficiência de amplificação.....	88
2.14. Quantificação relativa da expressão gênica	89
2.15. Análise Estatística.....	90
3. RESULTADOS	91
3.1. Extração de RNA Total	91
3.2. Confirmação de especificidade dos oligonucleotídeos	92
3.2. Eficiência de amplificação.....	93
3.3. Quantificação relativa da expressão gênica	95
4. DISCUSSÃO	103
5. CONCLUSÕES	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fêmeas adultas de tambaqui, acondicionadas em tanques de reprodução (A) e extrusão do macho e fertilização dos ovos de tambaqui (B). ...	24
Figura 2. Incubadoras cônicas de 120 L, com sistema de circulação de água (A). Laboratório de apoio do Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aqüicultura – CTTPA (B).....	24
Figura 3. Coleta de juvenis de tambaqui com 45 dias, utilizando rede de pesca (A) e juvenis de tambaqui com 90 dias depois da despesca (B).....	25
Figura 4. Ontogenia da atividade da tripsina em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	37
Figura 5. Ontogenia da atividade da quimiotripsina em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	38
Figura 6. Ontogenia da atividade da carboxipeptidase A em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	39
Figura 7. Ontogenia da atividade da carboxipeptidase B em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	41
Figura 8. Ontogenia da atividade da amilase em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	43
Figura 9. Ontogenia da atividade da lipase em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	44
Figura 10. Ontogenia da atividade da maltase em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	46
Figura 11. Ontogenia da atividade da fosfatase alcalina em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	48
Figura 12. Ontogenia da atividade da leucino aminopeptidase em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	49
Figura 13. Ontogenia da atividade da pepsina em tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	51
Figura 14. <i>Plots</i> de amplificação onde o ΔR_n é plotado contra o número de ciclos.	76
Figura 15. Gel de agarose 1% com EtBr (m/v) em TBE 1X mostrando os produtos de PCR utilizando os oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências do	

Banco de dados (A) e utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências dos produtos em A (B).	87
Figura 16. Amostras de RNA (A) e cDNA (B) extraído de ovos, larvas e juvenis de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> após eletroforese em gel de agarose 1%/EtBr em TAE 1X.	91
Figura 17. Curva de desnaturação para o gene precursor da tripsina (A) e pepsina (B).	92
Figura 18. Análise da especificidade dos produtos de qRT-PCR em tempo real na fase platô. Eletroforese em gel de agarose 1 %/ EtBr em TAE 1X. Precursor de tripsina (A); Precursor de pepsina (B) e gene constitutivo 18S (C).	94
Figura 19. Curva padrão do tripsinogênio (em intestino de tambaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos.	97
Figura 20. Curva padrão do 18S (em intestinos de tambaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos.	98
Figura 21. Curva padrão do pepsinogênio (em estômagos de tambaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos.	99
Figura 22. Curva padrão do 18S (em estômagos de tambaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos.	100
Figura 23. Razão da expressão de tripsinogênio entre larvas de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> pouco antes da eclosão e larvas e juvenis entre 12HAE e 90DAE, normalizado para um gene de referência (18S).	101
Figura 24. Razão da expressão de pepsinogênio entre larvas de tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i> pouco antes da eclosão e larvas e juvenis entre 12HAE e 90DAE, normalizado para um gene de referencia (18S).	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da ração comercial utilizada na alimentação dos exemplares juvenis de <i>C. macropomum</i> com 16, 30, 45 e 90 DAE.	26
Tabela 2. Valores dos parâmetros físico químicos da água medidos durante o período experimental.....	35
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.	78
Tabela 4. Seqüência parcial de nucleotídeos de tambaqui (A) tripsina (número de acesso bankit1241270) e pepsina (número de acesso bankit1241282) e 18S (número de acesso bankit1241334).	84
Tabela 5. Comparação das seqüências nucleotídicas de tripsinogênio e pepsinogênio de <i>C. macropomum</i> com seqüências de peixes publicadas.	85
Tabela 6. Seqüência dos oligonucleotídeos para o PCR quantitativo.....	86
Tabela 7. Valores obtidos a partir da análise de regressão linear, para cálculo da eficiência de amplificação (E), onde S: Coeficiente angular da reta; R^2 : coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,95$	95

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Ala	Alanina
BSA	Soro Albumina Bovina
BTEE	Benzoil tirosina etil ester
cDNA	DNA complementar, obtido a partir do RNA por meio de transcrição reversa
Ct	Número de ciclos
CTTPA	Laboratório de Apoio do Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aqüicultura
DAE	Dias após eclosão
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido Etilenodiamino tetra-acético
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
HAE	Horas após eclosão
HLA	Hippuril-L-arginina
HPA	Hippuril-L-fenil alanina
Ileu	Iso-leucina
Kg	Quilogramas
Km	Quilômetros
L	Litro
M	Molar
Met	Metionina
mg	Miligramas
mg/L	Miligramas por litro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
N	Normalidade
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro – Equivale a $1,0 \times 10^{-9}$ metros ou um milionésimo de milímetro
NH ₄ ⁺	Amônia ionizada
NH ₃	Amônia
NO ₂	Nitrito
pb	Pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
qRT-PCR	Real Time PCR
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris-Borato EDTA

TCA	Ácido tricloroacético
Thr	Treonina
T _m	Temperatura de dissociação
Tris	Tris (Hydroxymetil) aminometano
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
RT-PCR	Transcrição reversa -PCR
U	Unidade
U/g	Unidade por grama
U/mg	Unidade por miligrama
μl	Microlitros
UmL ⁻¹	Unidade por mililitro
μmol	Micromol
μS	Microsiemens (Condutividade elétrica)
Val	Valina

RESUMO

Um dos principais entraves no desenvolvimento de tecnologias para o cultivo sistematizado de peixes nativos na Amazônia é a falta de conhecimento sobre as exigências nutricionais dessas espécies. As rações comerciais para peixes que dominam o mercado mundial são resultados de pesquisas sobre hábito de espécies exóticas. Por isso, o estabelecimento das necessidades nutricionais de peixes nativos e dos aspectos que subsidiem a formulação de dietas adaptadas a sua fisiologia, constituem passos importantes que possibilitam um aumento de produtividade e conseqüente desenvolvimento da aqüicultura na região. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo bioquímico e de expressão gênica das principais enzimas digestivas do tambaqui, *Colossoma macropomum*, em diferentes fases do desenvolvimento inicial. Para tanto foram quantificadas as atividades das enzimas pancreáticas tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase A e B, amilase e lipase; das enzimas intestinais maltose, fosfatase alcalina e leucina aminopeptidase; e da enzima gástrica pepsina. Os resultados demonstraram que o comportamento das principais enzimas digestivas indica que o tambaqui possui um desenvolvimento da função digestiva equilibrada e precoce, onde as enzimas pancreáticas tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase A e B e amilase apresentaram um aumento gradual em suas atividades durante o desenvolvimento desta espécie. A digestão intestinal é ativa em estágio que precede a eclosão da larva tornando-se mais importante a partir da abertura da boca e início da alimentação exógena. Já a atividade da pepsina em juvenis de tambaqui foi menor quando comparada aos primeiros estágios, o que sugere a modulação desta enzima pelo tipo de alimento. As diferenças de expressão gênica do tripsinogênio e do pepsinogênio entre os estágios de desenvolvimento do tambaqui foi quantificada pela análise de qRT-PCR e demonstraram a habilidade desta espécie de expressar os genes das principais enzimas proteolíticas durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário e larval, indicando o grau de funcionamento do trato gastrointestinal livre de interferências inerentes aos ensaios bioquímicos. Entretanto, é necessário que novos estudos sejam delineados, tanto no nível molecular quanto bioquímico pra compreender os processos regulatórios que determinam esta habilidade.

ABSTRACT

One of the principal fetter in the development of technologies for the systematized cultivation of native fish in the Amazonian is the knowledge lack on the demands nutricionais of those species. The commercial rations for fish that dominate the world market are resulted of researches on habit of exotic species, this way, the establishment of the needs nutricionais of native fish and of the aspects that subsidize the formulation of adapted diets your physiology, they constitute important steps that make possible a productivity increase and consequent development of the aqüicultura in the area. This work had as objective accomplishes a biochemical study and of expression gênica of the main digestive enzymes of the tambaqui, *Colossoma macropomum*, in different phases of the initial development. For so much the activities of the enzymes pancreáticas tripsina were quantified, quimiotripsina, carboxipeptidase A and B, amilase and lipase; of the enzymes intestinal maltose, alkaline fosfatase and leucina aminopeptidase; and of the enzyme gastric pepsina. The results demonstrated that the behavior of the main digestive enzymes indicates that the tambaqui possesses a development of the balanced and precocious digestive function, where the enzymes pancreáticas tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase A and B and amilase presented a gradual increase in your activities during the development of this species. The intestinal digestion is active in apprenticeship that you/they precede the appearance of the larva becoming more important starting from the opening of the mouth and beginning of the feeding exógena. Already the activity of the pepsina in juvenile of tambaqui was smaller when compared to the first apprenticeships, what suggests the modulation of this enzyme for the food type. The differences of expression gênica of the tripsinogênio and pepsinogênio among the apprenticeships of development of the tambaqui was quantified by the qRT-PCR analysis and they demonstrated the ability of this species to express the genes of the main enzymes proteolíticas during the first phases of the embryonic and larval development, indicating the operation degree of the treatment gastrointestinal free from inherent interferences to the biochemical rehearsals. However it is necessary that new studies they are delineated, so much in the level molecular as biochemical to understand the processes regulatórios that you/they determine this ability.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A bacia Amazônica é o maior sistema fluvial do mundo. Sua grande diversidade de habitats é ampliada pela permanente oscilação do nível dos rios (Sioli, 1984; Junk, 1984; Junk *et al.*, 1984; Val & Almeida-Val, 1995; Almeida-Val *et al.*, 1999). Desde a formação geológica da bacia esta heterogeneidade de ambientes tem sido cenário da história evolutiva de um grande número de espécies de peixes perfeitamente adaptadas, em vários níveis da organização biológica, às condições naturais deste ambiente (Almeida-Val *et al.*, 1993; Val, 1993; Almeida-Val & Val, 1999). A riqueza ictiológica da Amazônia é significativa e inclui cerca de 1.800 espécies descritas até algumas décadas passadas. No entanto, mais recentemente, as estimativas de alguns autores apontam para números maiores, algo entre 2.500 a 4.000 espécies de peixes (Val & Honczaryk, 1995).

O peixe é a mais importante fonte de proteína animal da região, sendo a pesca a principal atividade geradora de renda para os caboclos ao longo dos rios (Araújo-Lima & Goulding, 1997). O aumento explosivo da população de Manaus e de outras cidades amazônicas nas duas últimas décadas e o conseqüente aumento da demanda por proteínas resultou numa pressão maior sobre os estoques naturais de recursos aquáticos, reduzindo as capturas das espécies de peixes de maior importância comercial (Falabella, 1994; Val & Honczaryk, 1995) e induzindo preocupação com a sistematização da produção de peixes.

A Amazônia possui o potencial para se tornar um competitivo fornecedor de peixes de águas interiores provenientes de piscicultura. Muitos fatores contribuem para que isso se torne realidade: riqueza de recursos hídricos e

pesqueiros, clima tropical, mão de obra barata, mercado consumidor crescente, etc. Contudo, no Amazonas, a aquicultura só começou a despertar interesse na década de 80, quando foram executadas as primeiras ações dentro do Programa de Desenvolvimento da Aquicultura (Rolim, 1995). A partir de então, o interesse pela atividade ampliou-se e hoje não é só vista como vital para suprir a demanda crescente por proteína de origem animal, mas, também, para a preservação do meio ambiente, à medida que diminui a pressão exploratória sobre os estoques naturais de algumas poucas espécies por meio de programas de repovoamento em áreas super-exploradas.

Um dos principais entraves no desenvolvimento de pacotes tecnológicos no cultivo sistematizado das espécies nativas de importância comercial e que apresentam potencial para piscicultura é a falta de conhecimentos sobre suas exigências nutricionais. Conseqüentemente, as dietas disponíveis no mercado para a maioria dessas espécies não são balanceadas. Desta forma, a inadequada relação entre as concentrações dos nutrientes na dieta pode conduzir à diminuição na taxa de crescimento e conversão alimentar, além de favorecer maior acúmulo de gordura corporal o que elevaria os custos de produção (Lovell, 1989).

O uso de dieta artificial tem participação significativa nos custos da criação dos organismos aquáticos. Segundo Pereira-Filho (1995), estes custos representam de 60 a 80 % de todos os gastos necessários para se produzir o peixe até a idade de abate. Assim, é fundamental intensificar as pesquisas relativas à fisiologia digestiva de peixes, dentre elas as que se direcionam para o estudo das enzimas digestivas, estrutura e função do aparelho digestório e as

exigências nutricionais nas diversas etapas do ciclo de vida desses organismos. Essas ações ajudariam a minimizar os custos desnecessários ao contribuírem com informações essenciais para a composição do tipo de alimento a ser fornecido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Colossoma macropomum*

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe de piracema nativo das bacias do Solimões, Amazonas e Orinoco e está entre as espécies mais importantes e com alto valor comercial desembarcadas no mercado de Manaus (Batista, 1998). *Colossoma macropomum* é adaptado ao complexo ciclo de condições ambientais que ocorre na bacia amazônica, sendo capaz de responder fisiológica e morfológicamente a estas condições (Val, 1993). Em ambiente natural pode atingir cerca de 1 metro de comprimento e 30 Kg de peso (Goulding & Carvalho, 1982; Saint-Paul, 1984; Falabella, 1994; Vinatea, 1995; Araújo-Lima & Goulding, 1997), resiste a temperaturas entre 27 e 35°C (Saint-Paul, 1986) e suporta níveis baixos de oxigênio (Saint-Paul, 1984; Val, 1993; Almeida-Val *et al.*, 1993; Almeida-Val & Val, 1995), podendo alcançar a maturação gonadal aos 55 cm de comprimento com 4 ou 5 anos de idade (Bayley & Petrere, 1989). Embora, tenham sido relatados casos de maturidade sexual em cativeiro entre 2 a 4 anos para os machos e 3 a 4 anos para as fêmeas, quando sua reprodução pode ser induzida facilmente (Chabalin, 1993; Honczaryk, 1995).

Da mesma forma que todos os peixes da Amazônia, o tambaqui, desenvolveu uma estreita relação com seu ambiente ao longo do processo evolutivo dependendo dele em todos os sentidos biológicos. Contudo, é na alimentação que reside uma interdependência vital. O seu hábito alimentar (onívoro, com tendência a herbívoro, filtrador e frugívoro) muda conforme cresce. A dieta dos adultos é bem ampla e predominantemente herbívora (frutas e sementes), além de insetos, caramujos, entre outros. Quando larva alimenta-se de microinvertebrados (cladóceros, copépodes e rotíferos). Já os juvenis incrementam a sua dieta com algas filamentosas, arroz silvestre e insetos. Esta capacidade de aproveitar vários tipos de alimento disponíveis no ambiente tem lhe permitido se adaptar muito bem aos sistemas de cultivo.

Segundo Freeman (1995), o tambaqui é o melhor candidato para aquicultura na Amazônia. De fato, no início da década de 1980, o tambaqui já estava sendo criado em cativeiro no sudeste Brasileiro, na Colômbia, na Venezuela e no Peru, onde a espécie ocorre naturalmente. Outros países como os Estados Unidos, a Tailândia e o Panamá importaram o tambaqui para realizar experiências em tanques e viveiros (Araújo-Lima & Goulding, 1997). Segundo o IBAMA (2000), o tambaqui é responsável por 73,5% do pescado cultivado no estado do Amazonas, por 30% na região Norte e por 11,5% na produção nacional.

2.2 Mecanismos digestivos

A digestão é o processo pelo qual o alimento é transformado em compostos mais simples para serem absorvidos pelas células intestinais. As

proteínas são hidrolisadas em aminoácidos livres ou cadeias peptídicas curtas; os carboidratos são hidrolisados em açúcares simples e as gorduras em ácidos graxos e glicerol. Estes processos são facilitados pela ocorrência das enzimas digestivas que atuam ao longo do trato gastrointestinal (Jobing, 1994).

O alimento utilizado pelos peixes nos seus habitats naturais é muito diverso, da mesma forma seus hábitos alimentares. Assim eles apresentam diversas adaptações do sistema digestório conforme a especialização requerida para ingerir, digerir e absorver esses diferentes tipos de alimento (Hepher, 1993; Baldisserotto, 2009).

Muitas destas adaptações parecem ser reflexos de uma plasticidade fenotípica ao invés de serem de natureza genética, e desenvolvida como consequência, ao invés de pré-requisito, para uma especialização ao tipo de dieta (Buddington *et al.*, 1997; Mittelbach *et al.*, 1999). A plasticidade fenotípica que possibilita um indivíduo modificar seu comportamento alimentar e regular suas funções digestivas em relação à mudança na viabilidade de presas ou composição da dieta, tem implicações ecológicas. Aquelas espécies capazes de fazer tais modificações estão aptas a explorar uma extensa variação de recursos alimentares (Carter *et al.*, 2001). O tambaqui, por exemplo, possui um sistema desenvolvido de rastros branquiais e dentes molariformes fortes, combinação anatômica única que lhe permite se alimentar do zooplâncton dos lagos de várzea e dos inúmeros frutos e sementes produzidos nas florestas inundáveis (Araújo-Lima & Goulding, 1997).

Os processos digestivos são bem conhecidos nos vertebrados, incluindo os peixes, e se iniciam na boca onde o tamanho do alimento é reduzido

mecanicamente expondo assim uma maior área de superfície à digestão química (Evans, 1998). Na boca e faringe dos peixes é secretado um muco que atua como lubrificante para facilitar a passagem do alimento. Esse muco não apresenta qualquer atividade digestiva (Steffens, 1987; Hephher, 1993; Baldisserotto, 2009).

Já no esôfago de algumas espécies tem sido reportado algum tipo de secreção enzimática (Nagase, 1964; Kawai & Ikeda, 1972; Steffens, 1987; Baldisserotto, 2009). No entanto, a contribuição do esôfago com o processo total de digestão não é significativa devido à rápida passagem do alimento através desse órgão.

A digestão química dos nutrientes ocorre no trato gastrointestinal e é realizada pelas enzimas do estômago, pâncreas exócrino e intestino. As diferentes enzimas encontradas no trato digestório são complementares e o processo enzimático leva à total digestão dos componentes da dieta em nutrientes a qual segue sua absorção e transporte pelos enterócitos (células intestinais).

A digestão das proteínas envolve a ação de muitas e diferentes enzimas, cada qual com sua ação específica nas diferentes partes da cadeia polipeptídica (Gauthier *et al.*, 1982). Hsu & Wu (1979) apontam que pepsina, tripsina e quimiotripsina são as três enzimas proteolíticas mais importantes do trato gastrointestinal de peixes e que o produto de reação destas enzimas, os oligopeptídeos, podem ser digeridos a aminoácidos por várias outras endo e exopeptidases.

No estômago, a mucosa gástrica dos peixes secreta ácido clorídrico, pepsinogênio e muco. O poder digestivo do suco gástrico depende tanto da

quantidade de pepsina presente, como do pH do meio. Assim, o primeiro passo na digestão química é a digestão inespecífica do alimento pelo ácido clorídrico, que é secretado pelas células parietais. Esta secreção é influenciada pela combinação de estímulos olfatórios e visuais e pela distensão das paredes do estômago com a chegada do alimento (Wallace, 1991).

A pepsina é produzida pelas células principais ou zimogênicas do estômago na forma do precursor inativo (pepsinogênio), que em meio ácido (pH 1-4) se converte na sua forma ativa, a pepsina. Esta enzima é uma endopeptidase que cliva as ligações peptídicas das proteínas pelo lado aminoterminal dos resíduos de aminoácidos cíclicos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano), rompendo as longas cadeias polipeptídicas em peptídeos menores. É capaz de hidrolisar várias proteínas com exceção de mucinas, queratinas ou peptídeos de baixo peso molecular (Fange & Grove, 1979). Nos peixes sem estômago a digestão do alimento é realizada no intestino e as proteínas são degradadas pelas enzimas pancreáticas (Hepher, 1993).

O pâncreas exócrino sintetiza e secreta no lúmen intestinal um grande número de enzimas endopeptidases (tripsina e quimiotripsina), exopeptidases (carboxipeptidase A e B), glicosidases (amilase) e lipases que trabalham em pH alcalino e são responsáveis pela digestão na luz intestinal. A forma como estas secreções pancreáticas chegam ao lúmen intestinal ainda é controversa. Em vertebrados superiores, cujo pâncreas é um órgão compacto, isso acontece por meio de dois dutos colédocos (Slack, 1995), enquanto nos teleósteos, por apresentarem um tecido pancreático difuso, geralmente localizado ao longo da veia porta, não está evidente se apenas um ducto colédoco ou um sistema de

múltiplos ductos, ou ainda se ambos os sistemas estão presentes (Einarsson & Davies, 1997).

As proteases digestivas do pâncreas de peixes são produzidas nas células acinares, sob a forma de zimogênios, e são secretadas no lúmen do intestino. Neste local se encontra a enteroquinase (enteropeptidase), uma protease do intestino delgado, que catalisa a quebra de uma ligação peptídica específica no tripsinogênio, transformando-o em tripsina ativa. A partir de então, as moléculas de enteroquinase junto com as de tripsina promovem um efeito cascata, que é responsável pela ativação de novos tripsinogênios e outros zimogênios como quimiotripsinogênio, procarboxipeptidase e proelastase (Kolodziejaska & Sikorski, 1996).

Tripsina e quimiotripsina pertencem à família das serino-proteases pancreáticas, uma família caracterizada por possuir um sítio catalítico, composto por uma tríade de aminoácidos (histidina, ácido aspártico e serina) (Stryer 1988), que é altamente conservado num amplo espectro de organismos, desde bactérias até mamíferos. Entretanto, a especificidade do substrato difere significativamente: a tripsina apresenta especificidade para hidrolisar peptídeos em que a função carbamil é substituída por lisina e arginina. Por outro lado, a quimiotripsina não é específica somente para hidrolisar peptídeos nos quais a função carbamil é substituída por resíduos de aminoácidos aromáticos, como tirosina, triptofano e fenilalanina, mas também para hidrolisar amidas e ésteres destes aminoácidos aromáticos (Rick, 1965). Assim, a quimiotripsina apresenta um espectro para atividade proteolítica muito maior quando comparada à tripsina.

As carboxipeptidases A e B são enzimas muito similares nos detalhes gerais do mecanismo catalítico: ambas requerem que o grupo carboxílico do resíduo carboxi-terminal seja livre. Entretanto, possuem especificidades bem diferentes: a carboxipeptidase B hidrolisa ligações peptídicas contendo arginina e lisina carboxi-terminais, enquanto a carboxipeptidase A requer que os resíduos carboxi-terminais não sejam arginina, lisina ou prolina (Whitaker, 1994). A carboxipeptidase A remove rapidamente os aminoácidos aromáticos carboxi-terminais Tyr, Phe e Trp e os aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos como Leu, Ileu, Met, Thr, Gln, His, Ala e Val (Amber, 1972).

A digestão dos carboidratos é afetada e estimulada pelo suco estomacal ácido (Moriarty, 1973). No entanto, o fator mais importante na hidrólise dos carboidratos são as carboidrases. Estas enzimas apresentam especial interesse no caso dos peixes, pois nem todas as espécies digerem os carboidratos com a mesma eficiência (Hepher, 1993). Dentre as carboidrases, a mais importante é a amilase, pois representa o estágio inicial da digestão bioquímica de carboidratos, como o amido e o glicogênio. No trato digestivo dos peixes sua ação resulta em produtos como dextrina e maltose. A α -amilase atua sobre o enlace 1,4- α glicosídico, convertendo o amido em uma mescla de glicose e maltose, enquanto que a β -amilase atua sobre a parte não reduzida da molécula de amido e forma maltose. Tem-se encontrado amilase na maioria de peixes onívoros, como os ciprinídeos e herbívoros como a tilápia (Moriarty, 1973). A atividade da maltase completa a digestão produzindo monossacarídeos para serem absorvidos pelo organismo. Segner *et al.* (1989), ao trabalhar com larvas de *Coregonus lavaretus* L., encontraram pequenas atividades de maltase na borda ciliada dos enterócitos.

Seixas Filho *et al.* (1999) reportaram amilase no quimo de três espécies de peixes tropicais de água doce, os onívoros piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piau (*Leporinus friderici*) e o carnívoro *Pseudoplatystoma coruscans*.

Dentre a ampla gama de enzimas que catalisam a hidrólise de diversos ésteres, se encontram as lipases (fosfolipase, lisofosfolipase) e as esterases (colesterol esterase e amidase). As lipases catalisam a hidrólise de triglicérides de ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as esterases atuam sobre ésteres simples de ácidos de baixo peso molecular. Barnad (1973) acredita que a lipase pancreática é a principal enzima envolvida na digestão de triglicérides de origem animal e vegetal em todos os vertebrados. Fange & Grove (1979) sugerem que o pâncreas seja a principal fonte de lipase em peixes. A principal lipase encontrada em peixes parece ser uma lipase não específica e dependente dos sais biliares (Gjellesvik, 1992), cuja secreção estaria induzida pela alimentação (Hoehne-Rietan, 2001). Alguns autores acreditam que não é possível distinguir claramente entre atividades de esterase e lipase (Izquierdo & Henderson, 1998), sendo este o motivo para medir indistintamente uma delas usando diferentes metodologias. Em estudos com extratos de órgãos digestivos de muitos peixes, tem-se encontrado, na maioria deles, esterase e lipase em todo o tubo digestivo, incluindo estômago, cecos pilóricos e intestino (Sastry, 1974; Goel, 1975; Ray, 1988; Gjellesvik *et al.*, 1989; Das & Tripathi, 1991; Oozeki & Bailey, 1995). Borlongan (1990) ao trabalhar com *Chanos chanos*, encontrou maior atividade de lipase na porção anterior do intestino, pâncreas e cecos pilóricos. Já Portella *et al.* (2002) encontraram essas atividades no pâncreas, fígado e porção final do intestino de *Platystoma*

fasciatum. Atividade de lipase, em menores proporções tem sido reportada por Koven *et al.* (1997) no estômago de *Scophthalmus maximus*.

Segundo Ugolev (1973), além da digestão extracelular que se realiza no quimo do intestino, existe uma digestão celular. As células intestinais, também chamadas de enterócitos, apresentam dois tipos de enzimas: as enzimas citosólicas, principalmente peptidases como Leucina-alanina peptidase, encontradas no citoplasma celular e as enzimas da borda em escova da membrana, as quais são ligadas à membrana celular e estão relacionadas com as etapas intermediária e final do processo digestivo, sendo consideradas por alguns autores como as etapas imediatamente anteriores à absorção (Kuz`mina, 1977).

Diferentes tipos de enzima de membrana podem ser encontrados. Entre elas estão as peptidases, como a aminopeptidase que hidrolisa peptídeos até aminoácidos no final do processo digestivo das proteínas (Ugolev & De Laey, 1973) e a fosfatase alcalina que também se encontra nas membranas celulares, principalmente onde ocorre o transporte ativo (absorção de amino ácidos) (Lojda *et al.*, 1979). Acredita-se que estas enzimas são importantes nos processos de absorção de nutrientes (Segner *et al.*, 1995). A fosfatase ácida, por sua vez, é utilizada como indicador de pinocitose de proteínas. Devido ao fato delas terem sido usadas em mamíferos como marcadores de diferenciação de enterócitos (Smith, 1992), seu aumento no intestino de larvas de peixes é associado à presença de enterócitos funcionalmente mais desenvolvidos (Zambonino Infante & Cahu, 2001).

Da mesma forma, acredita-se que a relação existente entre a fosfatase alcalina e algumas aminopeptidases citosólicas pode ser usada como indicador

do desenvolvimento relativo da digestão extracelular nas larvas de peixes (Cahu & Zambonino-Infante, 1995). Estas últimas são principalmente ativas nos primeiros estágios, quando as macromoléculas de proteína são absorvidas e digeridas dentro das células, enquanto que as outras são mais ativas quando a digestão extracelular é mais importante.

Devido à importância que as enzimas digestivas possuem na utilização de nutrientes energéticos (carboidratos e lipídios) e estruturais (proteínas), se faz necessário o estudo das suas atividades, bem como a relação destas com os diversos ciclos que interferem no processo de crescimento (ontogenia).

De acordo com Sedgwick (1979), para se ter um eficiente regime alimentar em aquicultura, ajustes contínuos no que se refere à ração, horários e frequência de alimentação são necessários para compensar a mudança de requerimentos durante o desenvolvimento ontogenético. Para isto, estudos sobre a capacidade digestiva dos peixes são necessários para a formulação de dietas apropriadas, já que a seleção dos ingredientes poderia se basear na digestibilidade dos seus componentes, a qual dependeria da presença de enzimas digestivas específicas.

2.3. Ontogenia das enzimas digestivas

Os peixes, da mesma forma que todos os vertebrados, mudam morfológica e fisiologicamente durante sua vida. Segundo Lagler *et al.* (1984), são três os períodos de desenvolvimento de um peixe:

- i. Período embrionário inicial, que vai desde a fertilização até a aquisição dos sistemas orgânicos generalizados;

- ii. Período embrionário transicional ou larval, que vai desde o momento da transformação dos órgãos para formar os sistemas orgânicos generalizados até que sua forma lembra a do adulto, e
- iii. Período pós-embrionário, que compreende a fase juvenil, adulto e velhice.

O sistema digestivo e suas enzimas não fogem a estas mudanças. As atividades enzimáticas parecem ser afetadas principalmente pelo progressivo aparecimento de órgãos digestórios e pela resposta a mudanças nos hábitos de vida e alimentícios, requerimentos nutricionais, programação genética e indução pelo substrato, o que finalmente resulta em padrões de atividade enzimática que apresentam importantes flutuações com o tempo (Moyano *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1999).

Dabrowski (1984) e Person-Le Ruyet (1989) resumiram as mudanças importantes no trato digestivo durante a ontogenia das larvas de peixes. No momento da eclosão, o trato digestivo é um estreito tubo fechado e histologicamente não diferenciado. Esta característica permanece constante até a abertura da boca e a subsequente absorção total do saco vitelínico, quando começa a segmentação em esôfago, faringe e intestino. O período larval acaba com o desenvolvimento do estômago, glândulas gástricas e cecos pilóricos. O fígado e pâncreas estão formados no momento da eclosão e são funcionais no estágio de primeira alimentação, embora nesta etapa o sistema digestório não seja completamente funcional.

O desenvolvimento do estômago em algumas espécies tem sido determinado a partir do aparecimento de glândulas gástricas, 10 dias após a eclosão em turbot, *S. maximus* (Cousin & Baudin-Laurencin, 1985), 31 dias em

linguado *Paralichthys dentatus* (L.) (Bisbal & Bengtson, 1995), 36 dias em *Pleuronectes ferrugineus* (Storer) (Baglolle *et al.*, 1997) e 80-90 dias em *Hippoglossus hippoglossus* (L.) (Luizi *et al.*, 1999).

Por outro lado, o aparecimento destas glândulas não indica que o estômago seja funcional. O incremento na atividade da pepsina (Ueberschäer, 1993) e do conteúdo de pepsinogênio (Huang *et al.*, 1998) têm sido utilizados como indicadores desta funcionalidade. Douglas *et al.* (1999) observaram altos níveis de atividade de tripsina, expressão de pepsinogênio e a bomba de próton 20 dias após eclosão de larvas de *Pleuronectes americanus*, indicando um avançado nível de desenvolvimento e funcionalidade do estômago neste estágio. Estudos anteriores em larvas de *Morone saxatilis*, mostraram atividades de tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase e amilase quatro dias após eclosão e um dia antes do início da alimentação exógena; entretanto, atividade de pepsina foi encontrada mais tarde, 16 dias após eclosão (Baragi & Lovell, 1986).

A presença de todas as principais enzimas digestivas no momento da abertura da boca tem sido demonstrada em espécies de água doce como *Oreochromis niloticus* L. (Tengjaroenkul *et al.*, 2001) e *Acipenser sturio* L. (Gawlicka *et al.*, 1995), mas, também, em espécies marinhas como *Solea senegalensis* Kaup (Martinez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999) e *Diplodus sargus* (Cara *et al.*, 2003). Murray *et al.* (2000), ao trabalhar com *Pseudopleuronectes americanus*, verificaram que o pâncreas desta espécie expressa ativamente genes de tripsina, amilase e lipase dependente dos sais biliares no momento da abertura da boca, mesmo antes do estômago ser funcional. Estes resultados são similares aos observados em *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000). Por outro

lado, Srivastava *et al.* (2002) ao analisar genes clonados do linguado marinho *Paralichthys olivaceus*, encontraram que mRNA de precursores de tripsina, quimiotripsina, elastase, carboxipeptidase A e B e lipase já eram expressos no pâncreas de larvas no estágio de primeira alimentação.

Kurukawa & Suzuki (1996; 1998) relataram, na mesma espécie, a síntese de aminopeptidase nas células do epitélio intestinal no momento da eclosão e funcionalmente diferenciada entre o segundo e o terceiro dia após eclosão, ou seja, um dia antes do início da alimentação exógena. Em estudos prévios, os mesmos autores demonstraram que o pâncreas começa a sintetizar enzimas digestivas no segundo dia após eclosão, embora sejam secretadas no intestino só a partir do terceiro dia. Eles concluíram que a aquisição das funções digestivas do linguado é um pré-requisito para o início da alimentação exógena.

Já em *Solea solea* (Alliot *et al.*, 1980) e *S. maximus* (Cousin *et al.*, 1987), não foi encontrada atividade de aminopeptidase no momento da eclosão. Gawlicka *et al.* (2000) encontraram atividade de tripsina, fosfatase alcalina, amilase e lipase em quatro estádios de larvas vitelínicas (larvas que ainda possuem saco vitelínico) de *H. hippoglossus*, concluindo que este peixe possui habilidade para digerir e absorver nutrientes exógenos além das próprias reservas.

Atividade de fosfatase alcalina e ácida também tem sido encontrada durante o desenvolvimento larval de diferentes peixes marinhos (Govoni *et al.*, 1986; Moyano & Sarasquete, 1993; Zambonino & Cahu, 1994). Estes autores sugerem que a ausência de pepsina no trato digestivo de peixes teleósteos durante os primeiros estádios de vida é compensada por processos de micro-pinocitose e

digestão intracelular no intestino posterior, processo no qual estariam envolvidas a fosfatase ácida, a catepsina e algumas aminopeptidases.

Atividade de amilase foi reportada durante o desenvolvimento larval de carpas da Índia como *Catla catla*, *Labeo rohita* e *Cirrhinus mrigala* (Kumar & Chakrabarti, 1998) e em peixes marinhos como perca prateada *Bidyanus bidyanus* (Anderson & Lipovsek, 1996). Estas atividades mostraram-se incrementadas com a idade. Entretanto, Péres *et al.* (1998) demonstraram que há níveis maiores de mRNA de amilase em larvas recém eclodidas do que nas larvas mais velhas de *Dicentrarchus labrax* e que o decréscimo coordenado entre a atividade enzimática da amilase e seu nível de mRNA é regulado transcricionalmente. No linguado marinho, *P. americanus*, existem picos de amilase transcrita em aproximadamente 20 dias após eclosão, quando começa a decrescer durante a metamorfose (Douglas *et al.*, 2000). Péres *et al.* (1996) sugerem que este decréscimo na atividade amilolítica durante o desenvolvimento larval seja geneticamente programado. Em *Theragra chalcogramma* a atividade amilolítica foi constante no período de transição da alimentação endógena para exógena e atividades de lipase e tripsina foram baixas durante esse período (Oozeki & Bailey, 1995).

Atividade de lipase tem sido detectada também durante o desenvolvimento larval em diferentes peixes marinhos como *M. saxatilis* (Hirji & Courtney, 1983) e *S. senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999). Oozeki & Bailey (1995) sugeriram a existência de dois tipos de lipases em larvas de *T. chalcogramma*, uma relacionada com a absorção do saco vitelínico (que é rico em fosfolipídios) e a

outra, cuja atividade se desenvolve posteriormente e que estaria relacionada com a digestão de lipídios exógenos.

Atividades das enzimas digestivas, durante o desenvolvimento em larvas e juvenis de teleósteos, crustáceos e moluscos com potencial para aquicultura têm sido particularmente estudadas durante as últimas duas décadas (Baglolle *et al.*, 1998; Kolkowski *et al.*, 1993; Oozeki & Bailey, 1995; Cara *et al.*, 2003; López-López, 2003; Lazo *et al.*, 2000; Ribeiro & Jones, 2000; Lemos *et al.*, 1999, 2002; Picos-García *et al.*, 2000; Donald *et al.*, 2003). Chakrabarti *et al.*, (1995), pesquisaram as enzimas digestivas de 11 espécies de peixes de água doce, demonstrando que a maioria das enzimas digestivas está presente independentemente do hábito alimentar.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o estudo bioquímico e de expressão gênica das principais enzimas digestivas do tambaqui, *Colossoma macropomum*, em diferentes fases do desenvolvimento inicial, especificamente:

1. Determinar o momento em que o pâncreas se torna funcional por meio da medição de atividade das enzimas: tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase A e B; amilase e lipase;
2. Determinar o momento em que a função digestiva no epitélio intestinal é ativa por meio da medição de atividade das enzimas citósolicas e da borda em escova: maltase, leucino aminopeptidase e fosfatase alcalina;
3. Determinar o momento no qual o estômago apresenta atividade digestiva por meio da medição de atividade da pepsina;
4. Verificar a importância da atividade digestiva pancreática, intestinal e gástrica durante as primeiras fases do desenvolvimento;
5. Determinar se as principais enzimas responsáveis pela digestão de proteínas, pepsina e tripsina são reguladas transcricionalmente durante as primeiras fases do desenvolvimento.

4. HIPÓTESES

H0₁ – A atividade das principais enzimas digestivas do tabaqui é iniciada no mesmo momento e não variam durante as primeiras fases do desenvolvimento desta espécie.

H0₂ – As enzimas digestivas pepsina e tripsina são reguladas transcricionalmente durante as primeiras fases do desenvolvimento do tabaqui.

CAPITULO I: Atividade das principais enzimas digestivas do tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) durante os primeiros estágios do desenvolvimento.

5. INTRODUÇÃO

Os principais itens alimentares disponíveis na natureza e que fazem parte da dieta do tambaqui são frutas, sementes e outros alimentos como zooplâncton, insetos e algas. A disponibilidade desses itens varia de acordo com as flutuações no nível da água.

Devido ao seu hábito alimentar, o tambaqui tem seu metabolismo ajustado, para digerir alimentos tanto de origem animal como vegetal (Nuñez & Salaya, 1984). Contudo, a maquinaria enzimática envolvida com a digestão de tão variada dieta tem sido muito pouco estudada até o presente momento. Mesmo não dispondo desse tipo de informação, o desenvolvimento de técnicas de reprodução e cultivo desta espécie tem sido amplamente buscado e requer informações complementares que possam auxiliar no aumento do rendimento quando de sua criação.

Em ambientes de cultivo, a vasta oferta de diferentes tipos de nutrientes encontrados pelo tambaqui na natureza não se repete. No entanto, o balanço energético disponível em condições naturais deveria ser copiado ao máximo durante a preparação das rações. Desta maneira poder-se-ia sanar as carências nutricionais do peixe (Castagnolli, 1992).

As rações comerciais que dominam o mercado mundial são resultados de pesquisas sobre as necessidades nutricionais de espécies exóticas. O estabelecimento das necessidades nutricionais para nossas espécies e sua associação à tecnologia de fabricação e conservação do alimento constituem os passos mais importantes para possibilitar um aumento de produtividade com o consequente desenvolvimento da aquicultura na região.

Para prever o potencial do tambaqui em hidrolisar carboidratos, lipídeos, proteínas, fibras e outros componentes, considerando as mudanças de hábito alimentar que apresenta durante sua vida, se faz necessária a identificação das suas diferentes enzimas digestivas, as mudanças das mesmas durante o desenvolvimento ontogenético, seu modo de ação e efeito que exercem os fatores externos, tais como fontes e níveis de nutrientes, temperatura, fotoperíodo, etc.

Conhecimentos sobre estes aspectos subsidiariam a formulação de dietas adaptadas à fisiologia desta espécie, bem como um adequado manejo alimentar durante seu cultivo. Por outro lado, o conhecimento detalhado da fisiologia digestiva no desenvolvimento do tambaqui é fundamental já que o nível da atividade de algumas das enzimas pode ser utilizado como indicador do estado nutricional. Adicionalmente, esta informação pode ajudar a determinar o momento ótimo para a primeira alimentação, bem como as potencialidades e limitações do uso de alimentos artificiais.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Material biológico

O material biológico foi constituído por ovos, larvas e juvenis de tambaqui, provenientes de desovas induzidas. As coletas foram realizadas no Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aqüicultura – CTTPA, município de Balbina, localizado a 170 km da cidade de Manaus.

O material biológico nos primeiros estágios de desenvolvimento foi originado a partir de três diferentes grupos de reprodutores. Cada grupo de reprodutores foi constituído por três fêmeas e quatro machos, que após o período de aclimação, tiveram a reprodução induzida pelo método descrito por Woynarovich (1986) (Figura 1). Após a fertilização, os ovos foram incubados em oito incubadoras cônicas de 120 L a uma densidade de 2,6 g/L e com fluxo constante de água (Figura 2). A água para abastecimento das incubadoras era diretamente captada a um metro da superfície do lago de Balbina, sendo distribuída por gravidade. Pela manhã e à noite as telas de proteção das incubadoras eram lavadas, retirando-se os detritos.

Para a coleta do material biológico no primeiro estágio de desenvolvimento foram consideradas, apenas, as incubadoras que apresentaram uma taxa de fecundação de 70 % e para os outros estágios foi considerada uma taxa de eclosão de 70 a 80 %. As coletas de ovos e larvas de tambaqui foram realizadas pouco antes da eclosão (embriões movimentando-se na cápsula ovular), uma hora após eclosão (indivíduos recém eclodidos) e a cada doze horas até 120 horas após eclosão (indivíduos com o saco vitelínico totalmente absorvido).

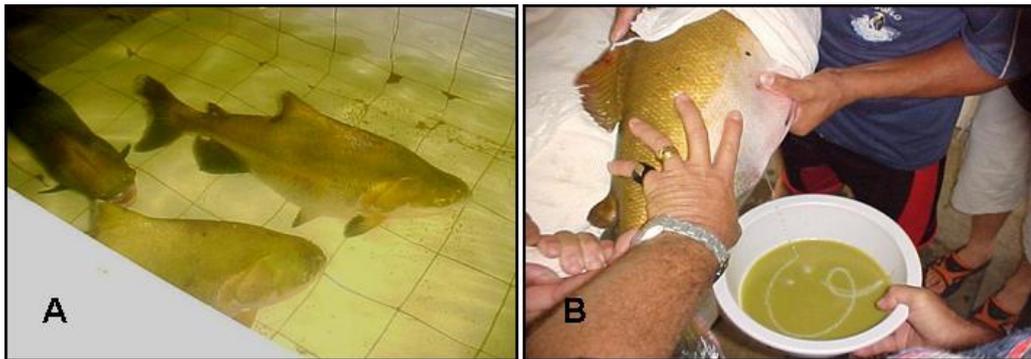


Figura 1. Fêmeas adultas de tambaqui, acondicionadas em tanques de reprodução (A). Extrusão do macho e fertilização dos ovos de tambaqui (B).

Para cada estágio embrionário e larval foi amostrado um grupo de indivíduos (~3 g) por triplicata e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise das enzimas digestivas. Após a abertura da boca e início da alimentação exógena até 120 horas após eclosão (HAE), as larvas de tambaqui foram alimentadas com organismos do ambiente natural.



Figura 2. Incubadoras cônicas de 120 L, com sistema de circulação de água (A). Laboratório de apoio do Centro de Tecnologia, Treinamento e Produção em Aquicultura – CTTA (B).

Juvenis de tambaqui, com 16, 30, 45 e 90 dias foram coletados de tanques escavados (Figura 3). Estes animais foram alimentados com ração balanceada para peixes tipo inicial 34, da marca Peixe Plus, que tem sua composição descrita na tabela 1. O manejo alimentar foi realizado da seguinte forma: juvenis com 16 dias após eclosão (DAE) foram alimentados 6 vezes ao dia a cada duas horas, com a primeira alimentação as 6:00 horas e a última as 16:00 horas; juvenis com 30 e 45 DAE foram alimentados três vezes ao dia a cada 6 horas, com a primeira alimentação as 8:00 horas e a última as 16:00 horas. Já os juvenis com 90 dias foram alimentados duas vezes, as 8:00 e as 16:00 horas. Logo após a coleta, os peixes tiveram seus tratos digestório extraídos e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior análise das enzimas digestivas. O horário das coletas foi pré-estabelecido e foi sempre o mesmo para esses estágios, devido às variações nos níveis basais de atividade das enzimas digestivas, ao longo do dia (López-Vásquez, 2001).

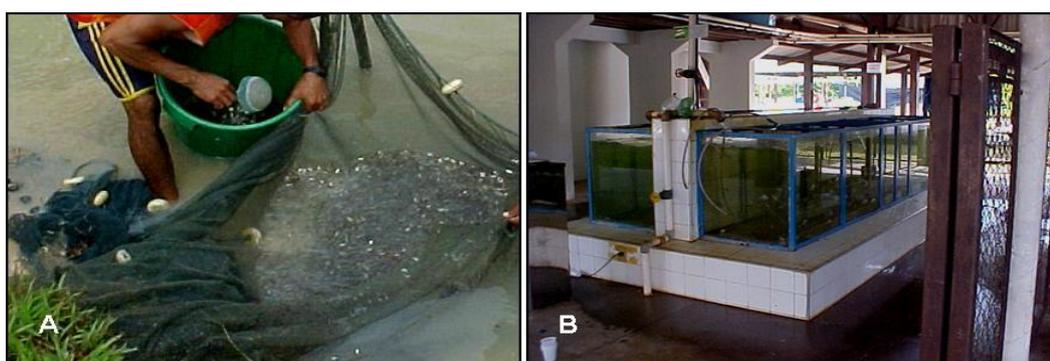


Figura 3. Coleta de juvenis de tambaqui com 45 dias, utilizando rede de pesca (A). Juvenis de tambaqui com 90 dias depois da despesca (B).

Tabela 1. Composição da ração comercial utilizada na alimentação dos exemplares juvenis de *C. macropomum* com 16, 30, 45 e 90 DAE.

Nível de garantia (%)	
Umidade (máxima)	12,00
Proteína Bruta (PB) (mínimo)	34
Estrato Etéreo (mínimo)	3,50
Matéria Fibrosa (máximo)	6,00
Material Mineral (máximo)	12,00
Cálcio (máximo)	3,50
Fósforo total (P)	1,80
Composição Básica	Eventuais substitutos
Milho	Farinha de pupunha, farelo de arroz
Farelo de trigo	raspa de mandioca, farinha de peixe
Farinha de trigo	farinha de sangue, farinha de pena
Farelo de soja	farinha de vísceras de ave, óleo vegetal
Glúten de milho (protenose)	sorgo, quirera de arroz, calcário
Farinha de carne e osso	gordura animal, fosfato bicalcico, aveia
Concentrado vitamínico e mineral (Premix) ¹	

¹ Composição por Kg da dieta: 1,5 mg Ácido fólico; 30 mg Ácido pantotênico; 0,3 mg Biotina; 0,15 mg Cobalto; 12 mg Cobre; 82,5 mg Ferro; 0,6 mg Iodo e 22,5 mg Manganês.

6.2. Preparação do extrato enzimático

Os ovos e larvas coletados até 120 horas após eclosão foram utilizados inteiros devido ao seu menor tamanho. Os juvenis de 16 dias foram individualmente dissecados, desprezando-se cauda, cabeça e musculatura dorsal. No caso dos exemplares de 30 dias foram utilizados os tratos digestório (intestino, cecos e estômago). Já nos indivíduos de 45 e 90 dias foi possível coletar separadamente intestino e estômago. Todas as amostras após lavagem com solução salina, foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos com tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 e centrifugados a 20.800 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado nas determinações enzimáticas.

6. 3. Determinação da proteína solúvel

A quantidade de proteína solúvel nos extratos enzimáticos foi determinada segundo o método de Lowry (1951), baseado na comparação da intensidade de cor obtida a partir da reação do reagente fenólico, Folin-Ciocalteu com os resíduos de tirosil da proteína desconhecida e dos valores de cor derivada da curva padrão de uma proteína conhecida. A leitura das absorbâncias foi feita em 660 nm. Foi utilizado soro de albumina bovina (BSA), como proteína padrão.

6.4. Determinação das atividades enzimáticas

6.4.1. Enzimas Pancreáticas

6.4.1.1. Tripsina (E.C. 3.4.21.4)

A atividade da tripsina foi determinada segundo Erlanger *et al.* (1961). Os complexos enzimáticos (125 µl) foram induzidos pela adição de 15 µl de

enteroquinase (4 U mL^{-1}) em 40 mM de tampão succinato pH 5,6 e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. A reação teve início pela adição de 1 mM BAPNA (N- α -benzoi-L-arginine *p*-nitroanilide hydrochloridae) em 0,05 M de tampão Tris-HCl pH 7,5 com 0,02 M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e incubados a 37 °C por 10 minutos. Após este período a reação foi interrompida pela adição de 700 μl de Acido acético glacial 30 %. A leitura das absorbâncias foi realizada em 410 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μmol de *p*-nitroanilide por minuto a 37 °C.

6.4.1.2. Quimiotripsina (E.C. 3.4.21.1)

A atividade da quimiotripsina foi determinada pela hidrólise do substrato sintético 630 μl de 0,056 M de BTEE (Benzoi tirosina etil ester), dissolvido em 2,5 % metanol (volume final) e 0,1 M de tampão Tris-HCl pH 7,8 com 0,025 M de CaCl_2 , segundo a metodologia descrita por Applebaum *et al.* (2001). Os extratos enzimáticos (70 μl) foram incubados a 25 °C e o incremento das absorbâncias foi registrado a cada 30 segundos durante 6 minutos a 256 nm.

6.4.1.3. Carboxipeptidase A (E.C. 3.4.17.1)

A atividade da carboxipeptidase A foi determinada usando 1 mM de Hippuril-L-Fenil Alanina (HPA) em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5, contendo 500 mM de NaCl como substrato, segundo a metodologia descrita por Worthington (1993). O substrato (1 ml) foi misturado com 50 μl do extrato enzimático em 10 % de LiCl. O incremento da absorbância a 254 nm foi registrado a 25 °C durante 10 minutos.

6.4.1.4. Carboxipeptidase B (E.C.3.4.17.2)

A atividade da carboxipeptidase B foi determinada usando 1 mM de Hipuril-L-Arginina (HLA) como substrato, em 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5, contendo 100 mM NaCl, de acordo com a metodologia descrita por Worthington (1993). O substrato (1 ml) foi misturado com 50 µl do extrato enzimático e o incremento da absorbância a 254 nm foi registrado a 25 °C durante 10 minutos.

6.4.1.5. Amilase (E.C. 3.2.1.1)

A atividade da amilase foi determinada pela hidrólise do substrato amido. Os produtos da hidrólise do amido (açúcares redutores) foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (1955), usando glicose 1 % como padrão. O sistema de incubação da enzima continha 50µl de tampão citrato/fosfato 0,8 M pH 7,0; 10 µl de NaCl 0,1 M e uma alíquota do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de 50 µl de amido 1% e posterior incubação a 37 °C por 30 minutos, sendo interrompida pela adição de 20 µl de NaOH 1 M e 200 µl da solução Somogyi-Nelson A (0,2 M Na₂HPO₄; 0,1 M C₄H₄KNaO₆; 0,1 M NaOH; 0,03 M CuSO₄ e 1,27 M Na₂SO₄ dissolvidos em água deionizada), em seguida a mistura foi fervida por 10 minutos. Após o esfriamento foram adicionados à mistura 200 µl da solução Somogyi-Nelson B (0,04 M H₂₄Mo₇N₆O₂₄; 0,5 M H₂S e 0,02 M Na₂HAsO₄ dissolvidos em água deionizada), 980 µl de água deionizada e finalmente centrifugada a 6000 g por 5 minutos. A leitura das absorbâncias foi feita em 650nm. Paralelamente, para descontar os produtos resultantes da hidrólise do amido e glicogênio endógenos e da hidrólise não enzimática do substrato amido, foi incubado um sistema controle nas mesmas condições, sem

adição do substrato. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μmol de açúcar redutor por minuto a 37 °C.

6.4.1.6 Lipase (não específica, E.C. 3.1.1.)

A atividade da lipase foi estimada segundo a metodologia descrita por Lijima *et al.* (1998) utilizando p-nitrofenol miristato como substrato. O sistema de incubação continha: 100 μl de tampão Tris-HCl 0,25 mM (pH 9), 250 μl de 5 mM de tampão taurocolato sódico e 30 μl de 0,25 mM 2-metoxi-etanol. A reação foi iniciada com a adição de 50 μl de 0,01 M p-nitrofenol miristato e posteriormente incubada a 37 °C durante 30 minutos, sendo interrompida pela adição de 500 μl de acetona:n-heptano na proporção 5:2. O extrato foi centrifugado a 6080 g por 5 minutos a 4 °C e o incremento da absorbância registrada em 405 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 μmol de nitrofenol por minuto a 37 °C.

6.4.2. Enzimas Intestinais

6.4.2.1 Maltase (E.C. 3.2.1.20)

A atividade da maltase foi determinada pela hidrólise do substrato maltose. O sistema de incubação continha 25 μl de tampão citrato/fosfato 0,1 M pH 6,0 e 25 μl do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de 50 μl de maltose 1% e posterior incubação a 37 °C durante 30 minutos, sendo interrompida e desproteïnizada pela adição de 100 μl de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 N e 100 μl de ZnSO_4 5 %. Os tubos foram então centrifugados a 6000 g por 5 minutos e o

produto da reação (glicose) foi determinado pelo método da glicose-oxidase (Dahlquist, 1961). A leitura das absorvâncias foi registrada em 515 nm.

Paralelamente, foi feito um sistema controle semelhante ao sistema de incubação da reação, excetuando-se a adição do substrato. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de glicose por minuto a 37 °C.

6.4.2.2. Fosfatase Alcalina (E.C. 3.1.3.1)

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada pela hidrólise do substrato *p*-nitrofenil fosfato de acordo com Walter & Schütt (1974). Os extratos enzimáticos (50 μl) foram incubados com 250 μl 3 mM de *p*-nitrofenil fosfato dissolvido em 10 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0 e 700 μl de tampão Tris-HCl 1,5 mM pH 8,0 a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 μl de uma solução de fosfato de potássio 1 M. A leitura das absorvâncias foi registrada a 410 nm.

6.4.2.3. Leucina aminopeptidase (E.C.3.4.11.1)

A atividade da leucina aminopeptidase foi determinada pelo método de Maroux *et al.* (1973) usando 900 μl de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 7,0 com 0,025 M de MgCl_2 e 1,6 mM de L -leucina *p*-nitroanilide como substrato. Os homogenados (100 μl) foram incubados a 25°C. O incremento das absorvâncias foi registrado a cada 30 segundos durante 6 minutos em 405 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de *p*-nitroanilide por minuto a 25 °C.

6.4.3. Enzimas gástricas

6.4.3.1. Pepsina (E.C. 3.4.23.1)

A atividade da pepsina foi quantificada pelo método de Worthington (1993) utilizando como substrato hemoglobina eritrocitária bovina em 1 N de tampão HCl pH 2,0. Uma alíquota do extrato enzimático (25 µl) foi incubada com 475 µl de hemoglobina 2 % a 37 °C por 30 minutos com agitação constante. A reação foi interrompida pela adição de 500 µl de ácido tricloroacético a 5 %. Os tubos foram centrifugados a 4200 g por 6 minutos a 4 °C e a leitura das absorbâncias feita a 280 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de TCA- solúvel por minuto a 37 °C.

A atividade das proteases alcalinas foi determinada pela hidrólise do substrato azocaseína segundo o método de García-Carreño (1992). O sistema de incubação continha tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e uma alíquota do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de azocaseína 1,5 % e posterior incubação a 25 °C durante 30 minutos, sendo interrompida pela adição de ácido tricloroacético 20 %, finalmente o sistema foi centrifugado a 12500 g durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a leitura das absorbâncias a 366 nm.

As atividades enzimáticas específicas foram expressas em unidades de enzima (U)/mg de proteína. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de produto em um minuto em temperatura de incubação.

6.5. Análise dos parâmetros físico-químicos da água

O controle dos parâmetros de qualidade da água, tais como temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade foi feito com auxílio de um termo-oxigenômetro YSI modelo 93. O pH da água foi medido com ajuda de pHmetro Micronal B374. As medidas foram realizadas em triplicata para cada incubadora e tanque.

6.6. Amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$)

Os níveis da amônia foram avaliados por ensaio colorimétrico, segundo Verdouw et al. (1978). O método consiste na reação da amônia com salicilato de sódio e hipoclorito de sódio, na presença de nitroprussiato de sódio como catalisador, para produzir a coloração azul do indofenol, que apresenta absorvância específica a 650 nm. O pico do desenvolvimento da cor ocorre 90 minutos após iniciada a reação de incubação. Os resultados foram obtidos pela equação da curva de calibração e finalmente expressos em mg/l de NH_3 .

6. 7. Determinação do Nitrito (NO_2)

Os níveis de nitrito foram determinados colorimetricamente como descrito por Boyd (1979), ajustado para amostras de 1,0 ml. O método consiste na reação do nitrito com uma solução de sulfanilamida em ácido clorídrico, que ao reagir com etileno diamino N-(1-aftil) forma um composto de cor rosa que pode ser lido a 543 nm. Os resultados obtidos foram expressos em mg/l de NO_2 .

6.8. Análise de dados

As médias e os respectivos desvios foram calculados para cada grupo de dados de atividade enzimática. A significância estatística das diferenças entre os vários grupos foi estabelecida por meio de ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de Tuckey, com limite de significância $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Variáveis físico-químicas da água

Na Tabela 2 estão descritos os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água nas unidades experimentais durante o desenvolvimento do tabaqui durante o período experimental. A temperatura foi de $29,25 \pm 0,3$ °C, o oxigênio dissolvido médio em $4,61 \pm 0,29$ mg/L; o pH variou entre 4 e 5,5; a condutividade média $11,15 \pm 0,07$ μ S; a amônia média $0,412 \pm 0,069$ mg/L e o nitrito médio $0,0153 \pm 0,032$ mg/L. Os níveis de amônia e nitrito estão dentro dos limites aceitáveis para o cultivo desta espécie.

Tabela 2. Valores dos parâmetros físico químicos da água medidos durante o período experimental.

Estágio	Temperatura (C°)	Oxigênio (mg/L)	pH	Condutividade (μ S)	Amônia (mg/L)	Nitrito (mg/L)
0 HAE	$28,3 \pm 0,12$	$4,0 \pm 0,24$	5	$11,2 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$
1 HAE	$28,5 \pm 0,14$	$4,15 \pm 0,32$	4	$11,0 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$
12 HAE	$29,0 \pm 0,13$	$5,0 \pm 0,15$	5	$11,3 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,00$
24 HAE	$28,3 \pm 0,23$	$4,92 \pm 0,12$	4,5	$11,1 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,35$	$0,01 \pm 0,00$
36 HAE	$29,1 \pm 0,32$	$3,89 \pm 0,36$	5	$11,2 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,36$	$0,02 \pm 0,00$
48 HAE	$28,5 \pm 0,14$	$4,24 \pm 0,05$	4,5	$11,5 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,4$	$0,005 \pm 0,00$
60 HAE	$29,3 \pm 0,13$	$3,88 \pm 0,09$	5	$11,6 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,10$	$0,01 \pm 0,00$
72 HAE	$28,5 \pm 0,04$	$3,74 \pm 0,48$	4,5	$10,5 \pm 0,3$	$0,19 \pm 0,03$	$0,006 \pm 0,00$
84 HAE	$29,2 \pm 0,02$	$4,42 \pm 0,03$	5,0	$11,3 \pm 0,056$	$0,98 \pm 0,53$	$0,033 \pm 0,00$
96 HAE	$28,1 \pm 0,25$	$3,75 \pm 0,54$	5,0	$11,2 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,48$	$0,01 \pm 0,00$
108 HAE	$28,3 \pm 0,01$	$4,46 \pm 0,01$	5,0	$11,1 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,05$	$0,006 \pm 0,00$
120 HAE	$28,2 \pm 0,02$	$3,81 \pm 0,33$	4,0	$10,9 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,09$	$0,005 \pm 0,00$
16 DAE	$31,4 \pm 0,01$	$8,64 \pm 0,68$	5,5	$10,5 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
30 DAE	$31 \pm 0,46$	$4,90 \pm 0,07$	5	$11,6 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,00$
45 DAE	$31,3 \pm 0,51$	$5,2 \pm 0,3$	5,5	$11,2 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
90 DAE	$31 \pm 0,32$	$4,8 \pm 0,09$	5,5	$11,2 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,02$	$0,009 \pm 0,00$

Os valores representam as médias \pm SEM de todas as unidades experimentais em cada estágio de desenvolvimento. As medidas foram realizadas em triplicata (n=3).

7.2. Enzimas pancreáticas

A atividade total de tripsina foi detectada no início do desenvolvimento, em larvas recém eclodidas, com valor mínimo de $0,06 \pm 0,01$ U/g de tecido em larvas com 1 HAE até o valor máximo de $17,09 \pm 0,44$ U/g de tecido em juvenis com 45 DAE ($p < 0,05$) (Figura 4). Juvenis com 90 DAE apresentaram uma diminuição de aproximadamente 50% na atividade total da tripsina ($8,33 \pm 1,14$ U/g de tecido) quando comparadas aos juvenis com 45 DAE ($p < 0,05$). Larvas com 84 HAE também apresentaram uma diminuição da atividade total, fato que coincide com o início da alimentação exógena. As atividades totais de tripsina entre 84 HAE e 16 DAE mantiveram-se constantes. Já a atividade específica registrou seu valor mínimo em larvas com 24 HAE ($0,02 \pm 0,00$ U/mg de proteína) e aumento significativo até 108 HAE ($0,61 \pm 0,09$ U/mg de proteína) quando houve depleção de atividade até 16 DAE ($p < 0,05$). Em seguida, foi registrado novo aumento até a atividade alcançar o valor máximo em larvas com 45 DAE ($1,87 \pm 0,04$ U/mg de proteína) e seguida de nova depleção em juvenis com 90 DAE ($0,62 \pm 0,08$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$).

No momento da eclosão não foi detectada atividade de quimiotripsina, apenas baixas atividades foram registradas em larvas com 36 HAE ($1,27 \pm 0,29$ U/g de tecido) que permaneceram relativamente constantes até 60 HAE. Valor similar foi encontrado em larvas com 16 DAE ($1,79 \pm 0,06$ U/g de tecido) (Figura 5). No início da alimentação exógena com 72 HAE ocorreu um pico de atividade total ($9,93 \pm 1,96$ U/g de tecido) seguido de depleção que se manteve relativamente constante entre 84 HAE ($3,55 \pm 0,72$ U/g de tecido) e 108 HAE ($3,04 \pm 0,01$ U/g de

tecido) ($p < 0,05$). Larvas com 120 HAE apresentaram novo pico de atividade total ($9,39 \pm 2,51$ U/g de tecido) ($p < 0,05$) diminuindo em juvenis com 16 HAE e finalmente aumentando até o valor máximo em juvenis com 30 DAE ($22,65 \pm 0,01$ U/g de tecido).

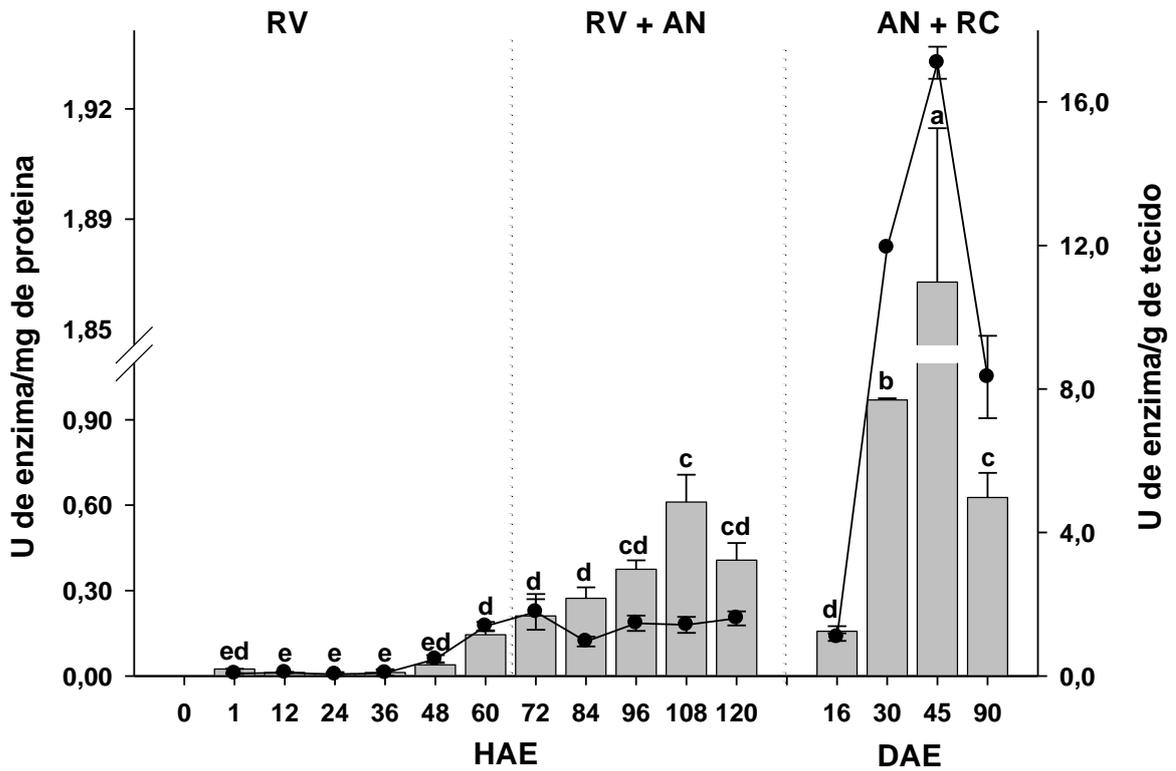


Figura 4. Ontogenia da atividade da tripsina em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM ($n=3$). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

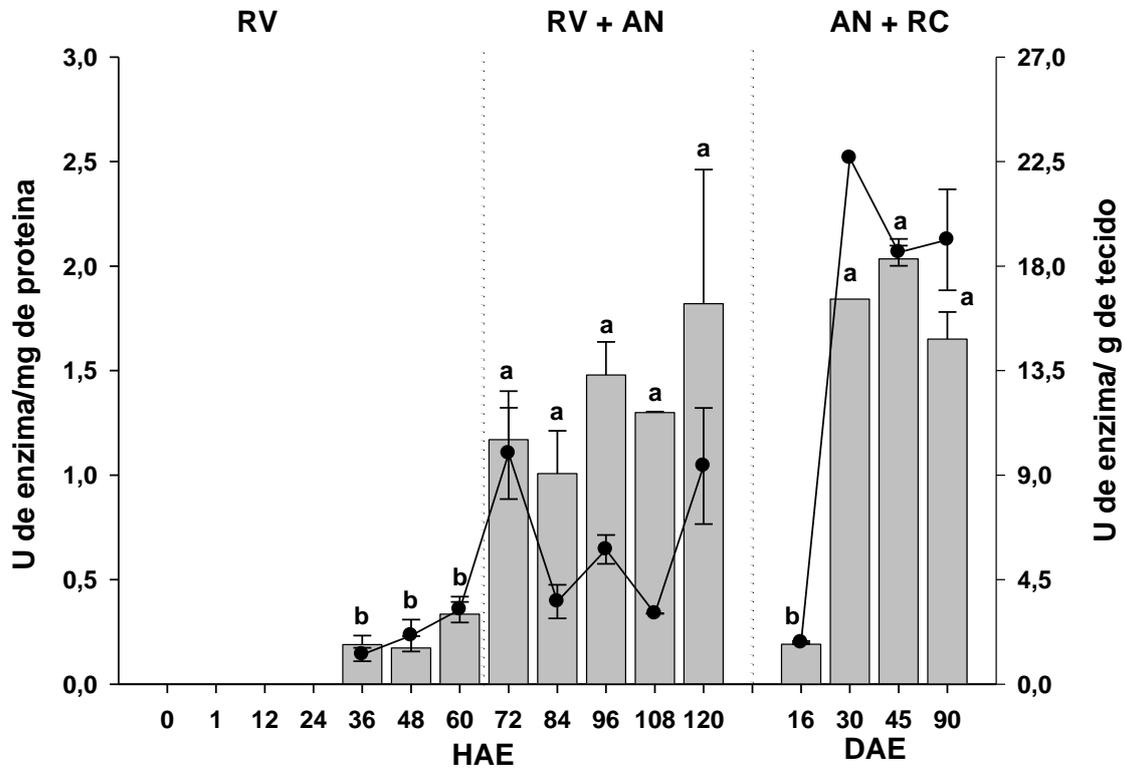


Figura 5. Ontogenia da atividade da quimi tripsina em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

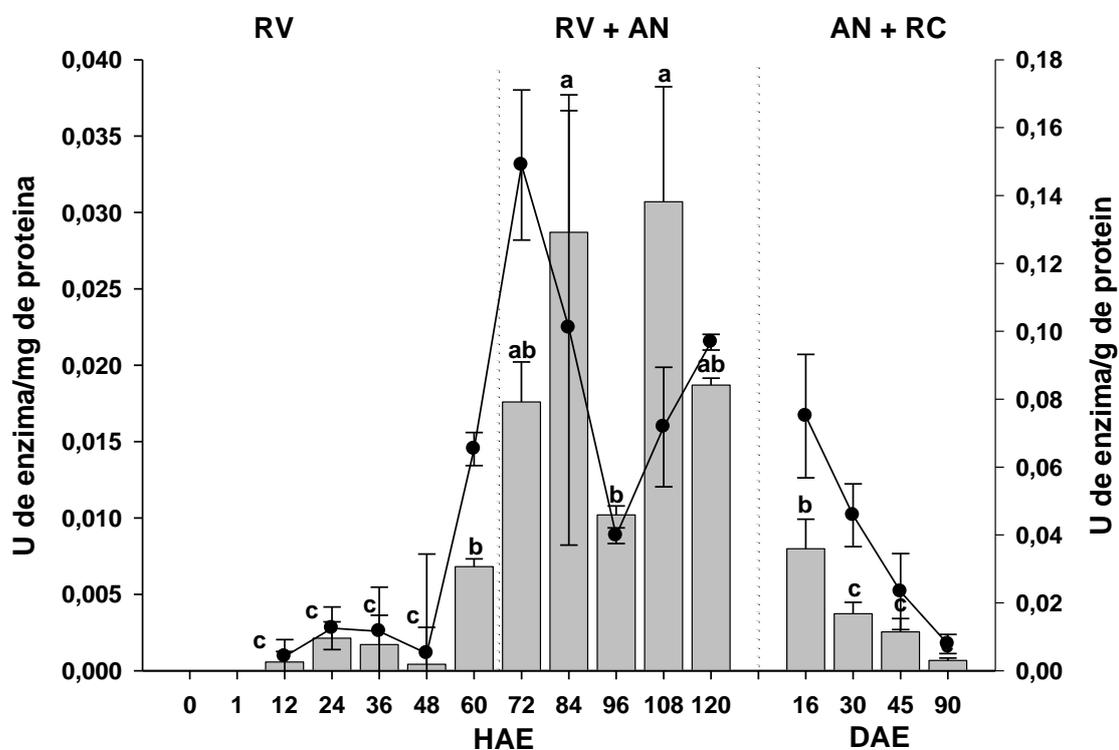


Figura 6. Ontogenia da atividade da carboxipeptidase A em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A atividade específica da quimiotripsina apresentou padrão similar ao da atividade total com valores baixos nos primeiros estágios de desenvolvimento entre 36 HAE ($0,18 \pm 0,04$ U/mg de proteína) e 60 HAE ($0,17 \pm 0,05$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$), mostrando aumento significativo em larvas com 72 HAE ($1,17 \pm 0,23$ U/mg de proteína) e permanecendo constante até juvenis com 120 HAE ($1,82 \pm 1,34$ U/mg de proteína), quando ocorre uma depleção significativa em juvenis com 16 DAE ($0,19 \pm 0,06$ U/mg de proteína) e finalmente incremento de atividade até o valor máximo em juvenis com 45 DAE ($2,034 \pm 0,06$ U/mg de proteína).

No momento da eclosão não foram detectadas atividades de carboxipeptidase A e B. Estas foram detectadas apenas nos estágios de 12 e 36 HAE, respectivamente (Figura 6 e 7). A atividade total da carboxipeptidase A apresentou dois picos de atividade: em larvas com 72 HAE ($0,149 \pm 0,022$ U/g de tecido) e 120 HAE ($0,0968 \pm 0,0023$ U/g de tecido) ($p < 0,05$). As menores atividades foram registradas nos estágios iniciais entre 12 e 48 HAE e 90 DAE ($p < 0,05$). A atividade específica mostrou o mesmo padrão com maiores atividades em larvas com 84 HAE ($0,0287 \pm 0,01$ U/mg de proteína) e 108 HAE ($0,030 \pm 0,007$ U/mg de proteína) e menores atividades nos estágios iniciais entre 12 e 48 HAE e 90 DAE ($p < 0,05$).

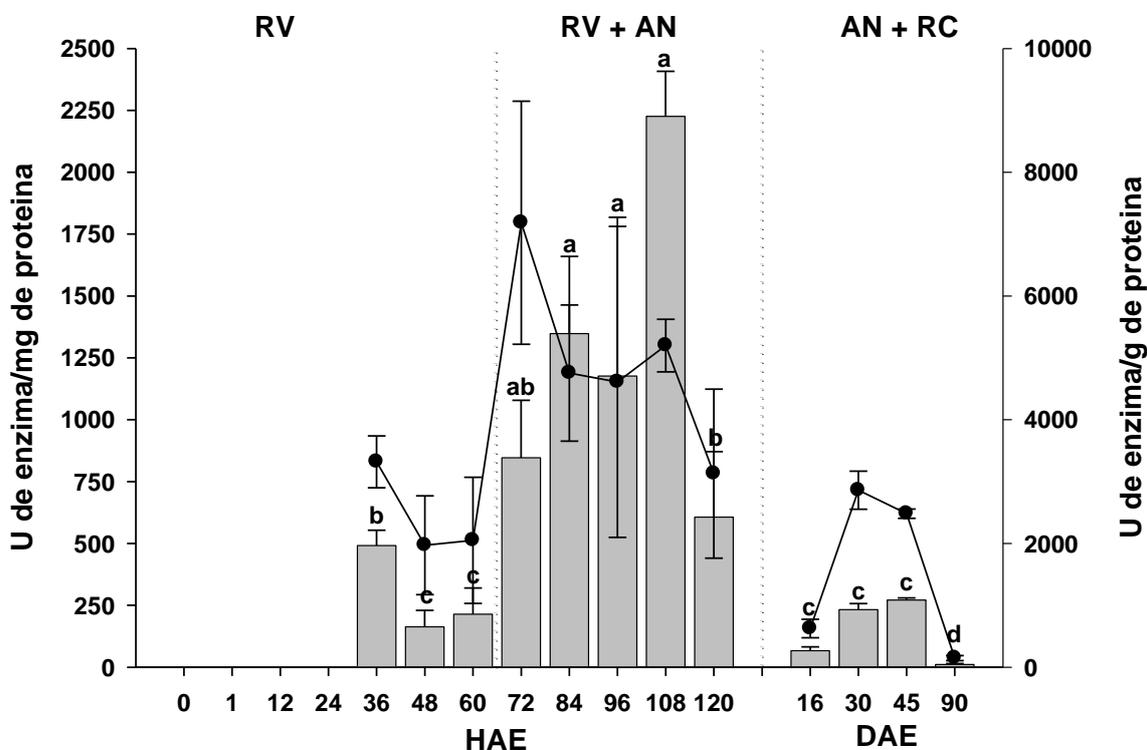


Figura 7. Ontogenia da atividade da carboxipeptidase B em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tanto a atividade total quanto a específica apresentaram uma depleção significativa em larvas com 96 HAE ($0,039 \pm 0,002$ U/g de tecido e $0,0102 \pm 0,0005$ U/mg de proteína, respectivamente).

A atividade total e específica da carboxipeptidase B apresentou diminuição significativa em larvas entre 36 ($3319,44 \pm 419,97$ U/g de tecido e $491,61 \pm 62,19$ U/mg de proteína, respectivamente) e 60 HAE ($2050,92 \pm 1019,87$ U/g de tecido e $213,87 \pm 106,35$ U/mg de proteína, respectivamente), quando incrementa até seu máximo valor, em larvas com 72 HAE ($7185,18 \pm 1964,61$ U/g de tecido) no caso da atividade total e 108 HAE ($2225,70 \pm 182,33$ U/mg de proteína) no caso da atividade específica. Em seguida, pode-se observar uma diminuição na atividade da enzima em juvenis com 16 DAE ($625,0 \pm 148,50$ U/g de tecido e $66,55 \pm 15,81$ U/mg de proteína) com novo aumento em juvenis com 30 ($2861,11 \pm 307,54$ U/g de tecido e $232,54 \pm 24,99$ U/mg de proteína) e 45 DAE ($2481,48 \pm 74,07$ U/g de tecido e $271,46 \pm 8,10$ U/mg de proteína). Os juvenis com 90 DAE apresentaram as menores atividades ($146,99 \pm 40,50$ U/g de tecido e $11,067 \pm 3,05$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$).

A atividade total da amilase foi detectada em larvas 1HAE ($0,03 \pm 0,005$ U/g de tecido) aumentando progressivamente até alcançar a máxima atividade em juvenis com 90 DAE ($0,43 \pm 0,001$ U/g de tecido) ($p < 0,05$). A atividade específica apresentou o mesmo padrão com valores de $0,018 \pm 0,00$ U/mg de proteína em larvas com 1 HAE e aumento progressivo até a máxima atividade em juvenis com 90 DAE ($2,73 \pm 0,013$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$). Juvenis de 30 e 45 DAE

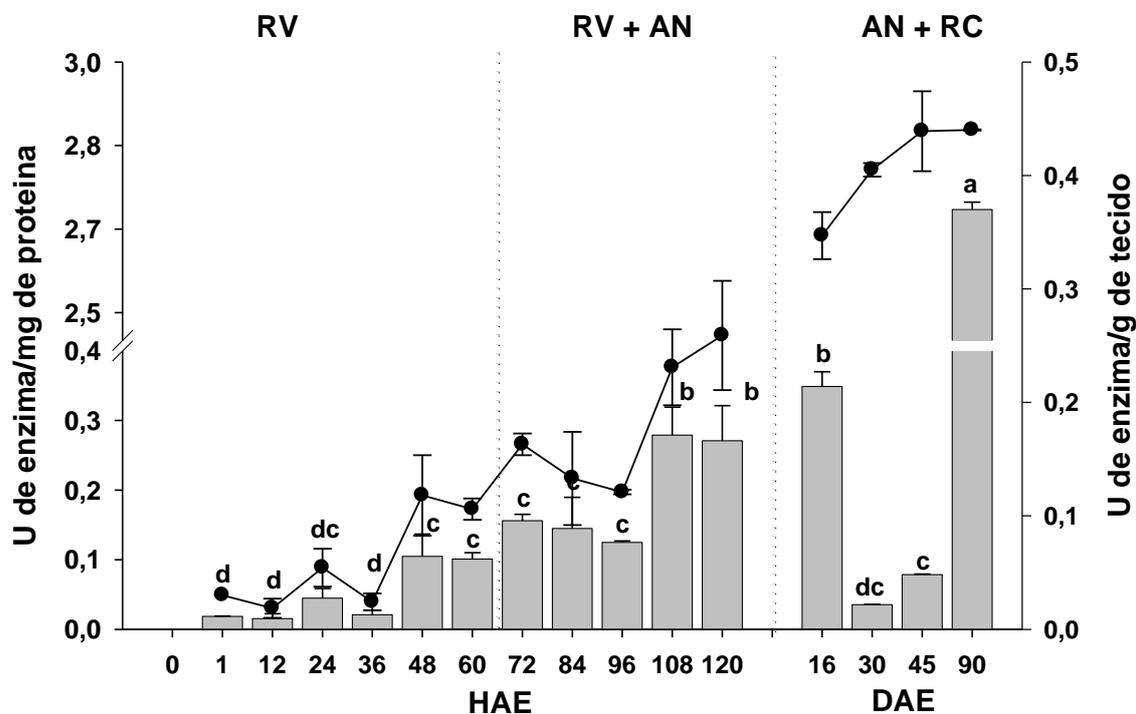


Figura 8. Ontogenia da atividade da amilase em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

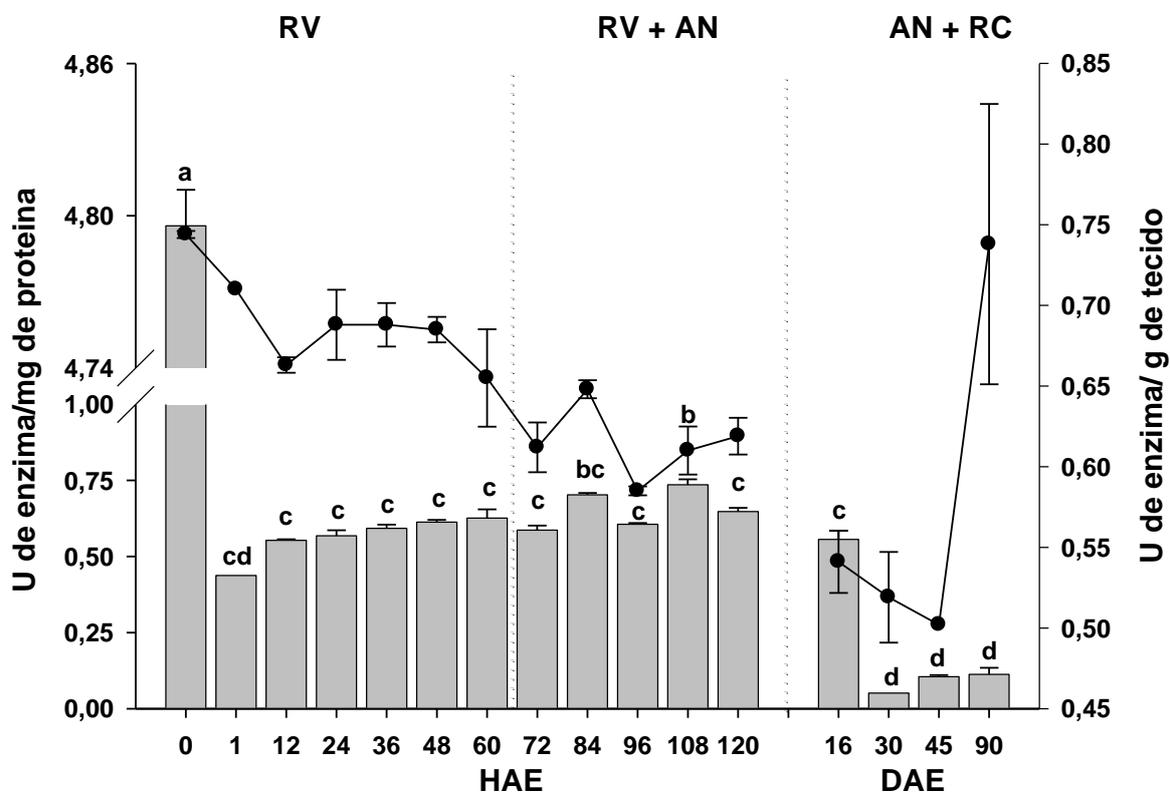


Figura 9. Ontogenia da atividade da lipase em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

apresentaram uma diminuição significativa da atividade específica ($0,035\pm 0,001$ e $0,078\pm 0,001$ U/mg de proteína, respectivamente) (Figura 8).

A enzima lipase foi registrada com valores máximos de atividade total e específica em larvas ainda movimentando-se na cápsula ovular ($0,74\pm 0,002$ U/g de tecido e $4,79\pm 0,01$ U/mg de proteína). Durante o desenvolvimento a atividade total apresentou diminuição gradativa até juvenis com 45 DAE ($0,50\pm 0,001$ U/g de tecido) ($p<0,05$). Já juvenis com 90 DAE apresentaram aumento significativo com $0,738\pm 0,08$ U/g de tecido.

A atividade específica apresentou um padrão diferente, diminuindo significativamente em larvas com 1 HAE ($0,438\pm 0,001$ U/mg de proteína) e mantendo se relativamente constante durante o desenvolvimento até juvenis com 16 DAE ($0,546\pm 0,019$ U/mg de proteína), mostrando em seguida uma queda de atividade até valores mínimos em larvas com 30, 45 e 90 DAE ($0,105\pm 0,005$; $0,005\pm 0,000$; $0,12\pm 0,014$ U/mg de proteína, respectivamente) ($p<0,05$) (Figura 9).

7.3. Enzimas intestinais

As enzimas intestinais foram encontradas nos primeiros estágios de desenvolvimento, em embriões ainda movimentando-se na cápsula ovular. A atividade total da maltase manteve-se relativamente constante no momento da eclosão ($0,037\pm 0,002$ U/g de tecido) até em juvenis com 16 DAE ($0,095\pm 0,0152$ U/g de tecido), quando apresentou aumento significativo em juvenis com 90 DAE ($23,016\pm 0,001$ U/g de tecido) (Figura 10). A atividade específica manteve-se

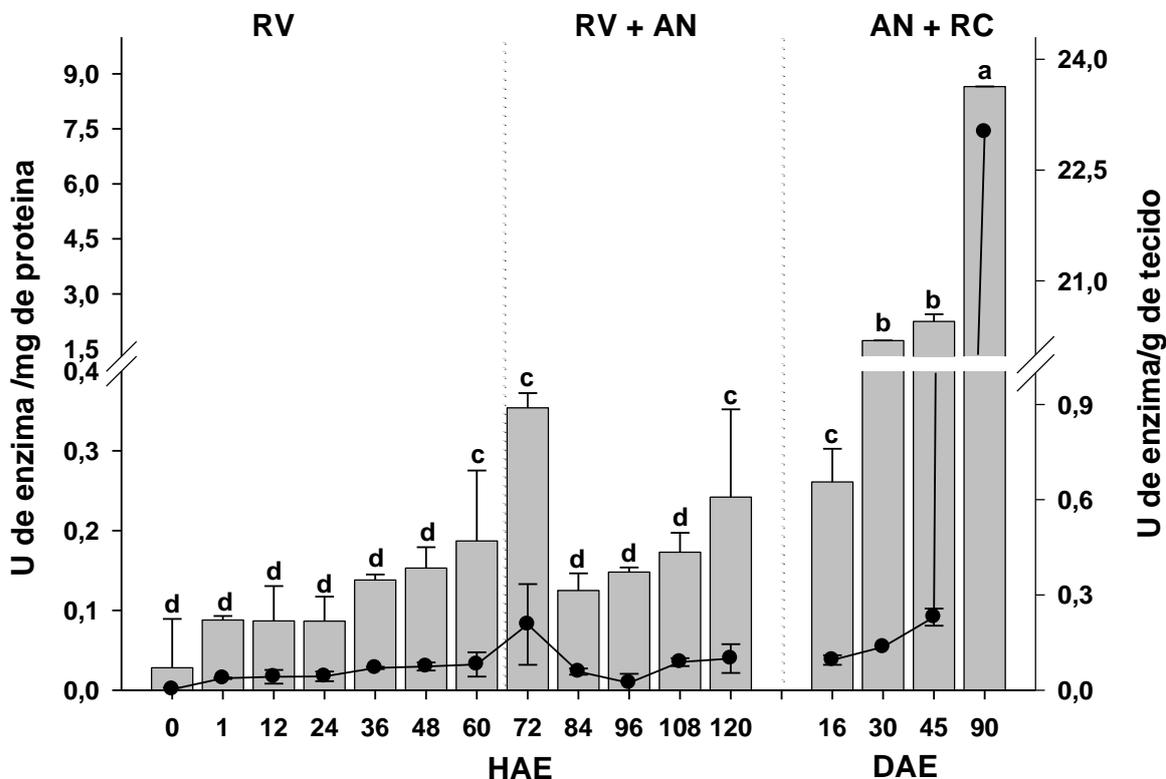


Figura 10. Ontogenia da atividade da maltase em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

constante no momento da eclosão ($0,281 \pm 0,061$ U/mg de proteína) até em larvas 48 HAE ($0,153 \pm 0,026$ U/mg de proteína), quando apresentou um incremento de atividade em larvas com 72 HAE ($0,354 \pm 0,018$ U/mg de proteína) seguida de uma diminuição significativa no estágio de 84 HAE ($0,125 \pm 0,021$ U/mg de proteína) A partir daí houve aumento gradativo até alcançar a máxima atividade em juvenis com 90 DAE ($8,65 \pm 0,005$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$).

A atividade total da fosfatase alcalina aumenta gradativamente desde o momento da eclosão ($0,045 \pm 0,008$ U/g de tecido) até o estágio de 108 HAE ($0,793 \pm 0,112$ U/g de tecido) quando ocorre um decréscimo na atividade em larvas com 120 HAE ($0,477 \pm 0,012$ U/g de tecido) e novo aumento até alcançar a máxima atividade em juvenis com 90 DAE ($1,39 \pm 0,081$ U/g de tecido) ($p < 0,05$) (Figura 11).

Já a atividade específica mostra valores relativamente constantes desde o momento da eclosão ($0,0516 \pm 0,009$ U/mg de proteína) até o momento da alimentação exógena (72 HAE) quando aumenta significativamente em larvas com 84 HAE ($0,834 \pm 0,053$ U/mg de proteína) alcançando máxima atividade naquelas com 108 HAE ($0,339 \pm 0,047$ U/mg de proteína) diminuindo em seguida e mantendo-se relativamente constante até nos juvenis com 90 DAE ($0,109 \pm 0,004$ U/mg de proteína).

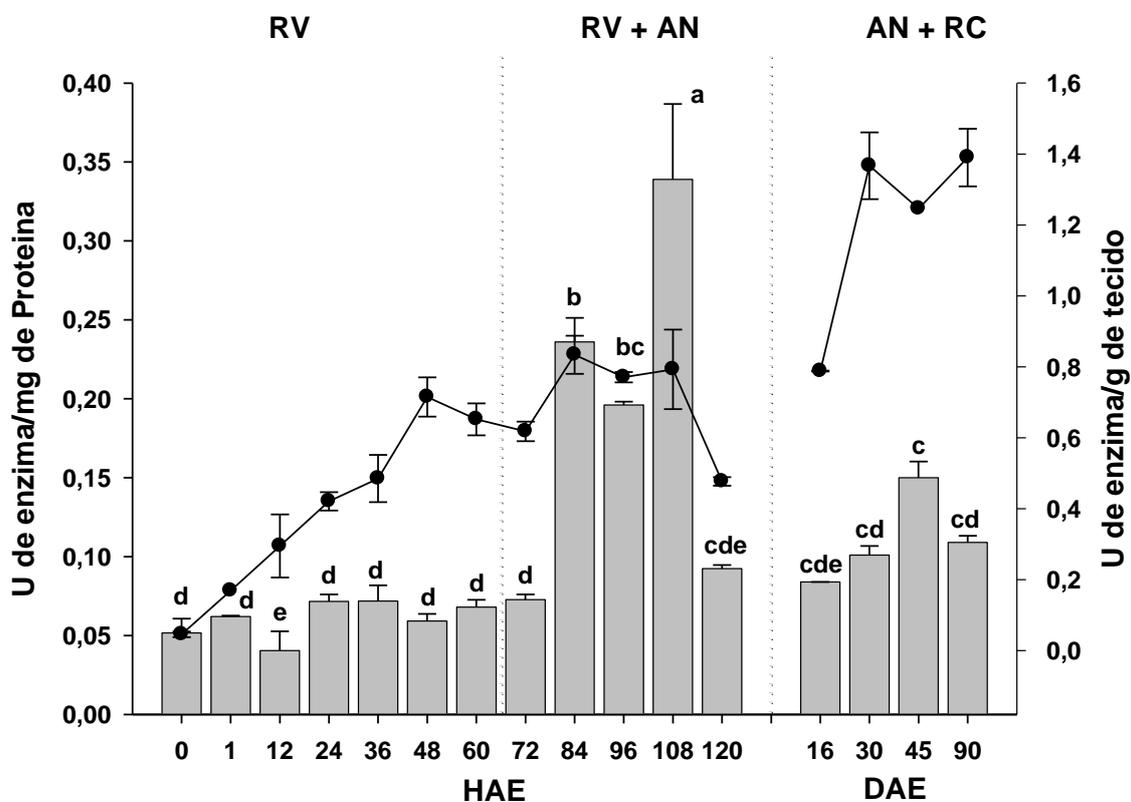


Figura 11. Ontogenia da atividade da fosfatase alcalina em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

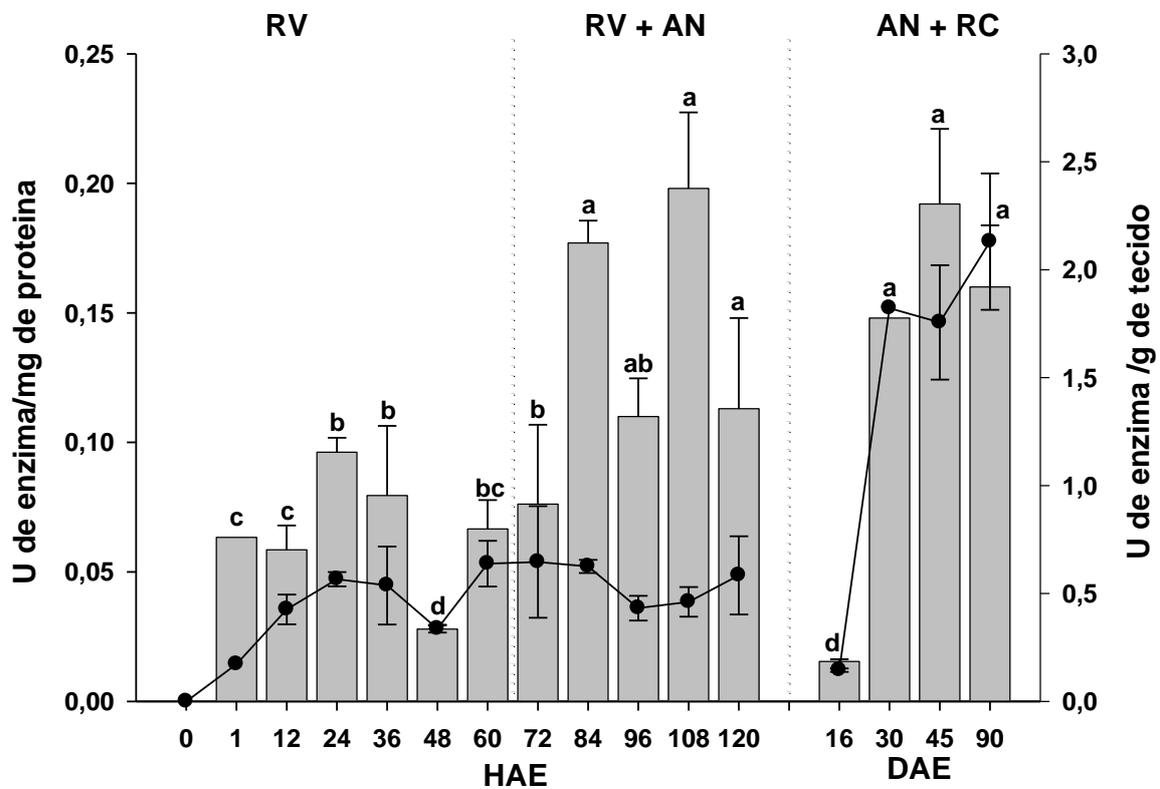


Figura 12. Ontogenia da atividade da leucino aminopeptidase em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

A atividade total da Leucino aminopeptidase mostrou aumento nos valores a partir da eclosão ($0,041 \pm 0,031$ U/g de tecido) até larvas com 24 HAE ($0,566 \pm 0,032$ U/g de tecido) mantendo-se constante até o estágio de 120 HAE ($0,584 \pm 0,181$ U/g de tecido) quando sofre um decréscimo significativo em juvenis com 16 DAE ($0,145 \pm 0,008$ U/g de tecido), sendo que em seguida há um aumento significativo de atividade até o valor máximo de $2,13 \pm 0,316$ U/g de tecido) em juvenis com 90 DAE. A atividade específica neste caso oscilou, com registro da maior atividade em larvas com 108 HAE ($0,198 \pm 0,029$ U/mg de proteína) e a mínima atividade em juvenis com 16 DAE ($0,0154 \pm 0,0001$ U/mg de proteína) (Figura 12)

7.4. Enzima gástrica

Atividade de pepsina foi detectada em larvas de 1 HAE ($0,965 \pm 0,01$ U/g de tecido e $0,595 \pm 0,01$ U/mg de proteína). A atividade total manteve-se constante até juvenis com 16 DAE ($1,248 \pm 0,046$ U/g de tecido) aumentando significativamente até alcançar a máxima atividade em juvenis com 30 DAE ($5,212 \pm 0,01$ U/g de tecido) e, finalmente, mostrando um decréscimo em juvenis com 45 DAE ($2,454 \pm 0,21$ U/g de tecido) ($p < 0,05$). A atividade específica mostrou aumento gradativo até alcançar a máxima atividade em larvas 108 HAE ($2,431 \pm 0,108$ U/mg de proteína) diminuindo, em seguida, até o valor mínimo aos 90 DAE ($0,422 \pm 0,003$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$) (Figura 13).

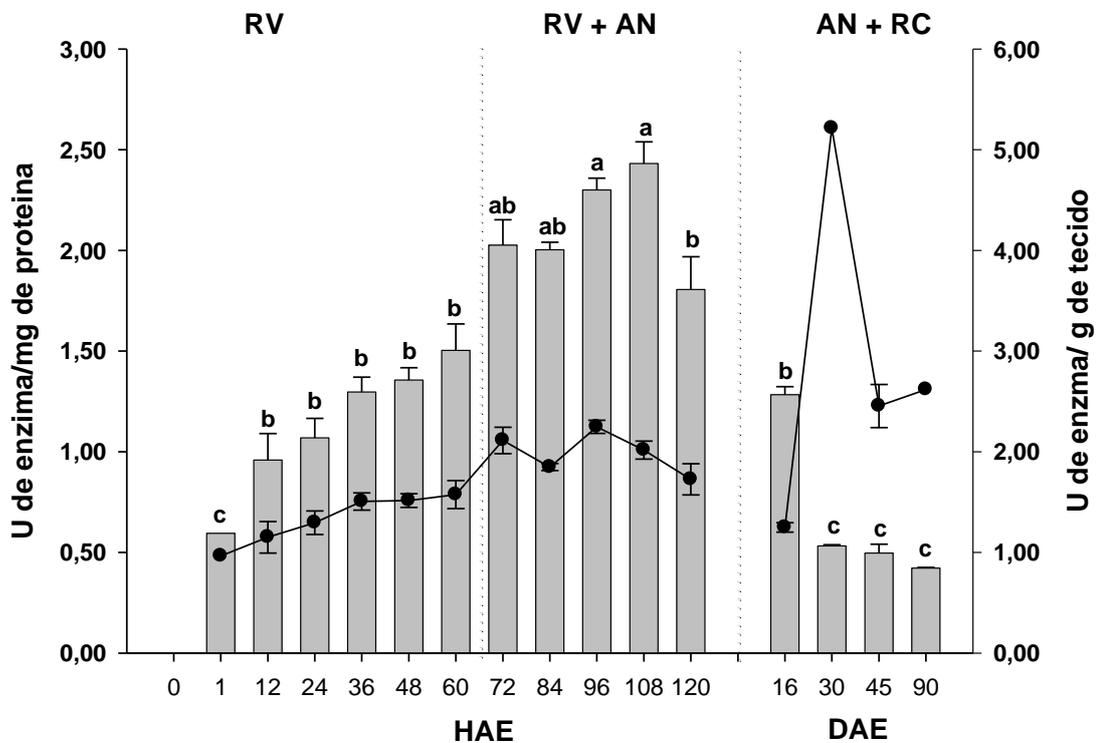


Figura 13. Ontogenia da atividade da pepsina em tambaqui, *Colossoma macropomum*. As barras representam atividade específica e a linha atividade total. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio enzimático foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

8. DISCUSSÃO

8.1. Variáveis Físico-químicas da água

Por ser um peixe rústico, o tambaqui tolera variações na qualidade de água. No ambiente natural, o tambaqui normalmente habita áreas com águas que apresentam diferentes características físico-químicas, como o rio Amazonas e o rio Negro. É um peixe resistente à hipoxia tolerando baixos níveis de oxigênio dissolvido, como 0,5 mg/L (Saint-Paul, 1986). Porém, níveis muito baixos de oxigênio dissolvido na água podem causar estresse ao animal e também provocar a morte por hipoxia. Para cultivos comerciais, a concentração de oxigênio deve ser mantida acima de 4 mg/L (Kubitzka, 2004).

Temperatura e pH também são considerados fatores limitantes para muitos processos biológicos. Peixes tropicais como o tambaqui geralmente encontram conforto térmico em temperaturas variando entre 27 e 30 °C. Nestas temperaturas o consumo de alimento parece atingir o nível máximo, possibilitando alcançar as maiores taxas de crescimento (Kubitzka, 2004). Por ser uma espécie que habita naturalmente rios com pH ácido, o tambaqui é um dos peixes de melhor capacidade de adaptação ao baixo pH da água (Kubitzka, 2004; Araújo-Lima & Goulding, 1997).

O tambaqui também é resistente à ação tóxica da amônia. Concentrações de 0,46 mg/L de amônia não ionizada (estado tóxico da amônia) não comprometem o crescimento da espécie (Ismiño-Orbe *et al.*, 2003). Entretanto, é uma espécie sensível os efeitos do nitrito e exposições prolongadas podem comprometer o desempenho do peixe, principalmente em ambientes com altas temperaturas e flutuações diárias nas concentrações de oxigênio. A DL₅₀ desta

variável para o tabaqui é 1,82 mg/L (Costa *et al.*, 2004). Neste trabalho, os parâmetros físico-químicos monitorados não apresentaram variações significativas, mantendo-se de acordo com os valores recomendados para o cultivo desta espécie (Araújo-Lima & Goulding, 1997).

8.2. Desenvolvimento ontogenético das enzimas digestivas

Segundo Rotta (2003), as larvas podem ser classificadas, quanto ao desenvolvimento do trato digestivo e das enzimas secretadas no intestino, em dois grupos: um com o trato digestivo completo e, outro, com o trato digestivo rudimentar. As espécies que no momento da primeira alimentação possuem tratos digestivos completos (estrutural e funcionalmente diferenciados) possuem problemas menores com a alimentação inicial. Neste grupo estão as larvas de tilápias, bagre-de-canal, truta arco-íris, salmonídeos, carpa comum, entre outras.

Aqueles que possuem sistemas digestivos rudimentares (imaturos ou pouco desenvolvidos na primeira fase de vida) são mais difíceis de alimentar e frequentemente necessitam de alimentos vivos como parte das suas dietas. Neste grupo estão as larvas de pacu, tabaqui, surubins, curimatá, carpas chinesas, entre outras (Rotta, 2003). Por isso, durante o desenvolvimento ontogenético do tabaqui, por exemplo, ocorrem altas taxas de mortalidade, frequentemente relacionadas a práticas alimentares que não satisfazem as suas necessidades nutricionais.

Três eventos têm sido considerados determinantes no amadurecimento das funções digestivas em larvas de peixes: a ativa secreção pancreática constitui o primeiro passo; o segundo refere-se ao aparecimento das enzimas da borda em

escova do intestino e o terceiro, ao desenvolvimento do estômago e início da digestão ácida, embora este último evento seja considerado menos relevante do que os outros dois, pois o pâncreas e o intestino estão ativamente envolvidos na digestão de proteínas (Zambonino & Cahu, 2001; Zambonino-Infante *et al.*, 2007; Gisbert *et al.*, 2009).

A atividade das enzimas envolvidas na digestão de proteínas, lipídios e carboidratos em larvas de tambaqui no momento da eclosão e antes do início da alimentação exógena foi demonstrada neste trabalho. Este resultado é corroborado não somente em outras espécies de peixe de água doce ou estuarinas como a tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus* L. (Tengjaroenkul *et al.*, 2001); o esturjão, *Acipenser sturio* L. (Gawlicka *et al.*, 1995), mas também em espécies marinhas como o sargo, *Diplodus sargus* (Cara *et al.*, 2003); o linguado marinho *Paralichthys californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006) e o corvina de pintas, *Scianops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2007).

De uma forma geral, estas enzimas parecem ser afetadas, principalmente, pelo progressivo aparecimento dos órgãos digestórios e pela resposta à mudança na quantidade e composição do alimento disponível. O típico padrão se apresenta com sucessivos acréscimos e decréscimos de atividade com o tempo. Entretanto, Cara Torres *et al.* (2002) descreveram um padrão caracterizado por um gradual decréscimo da atividade específica das enzimas em larvas de sargo, *D. sargus*, o que pode estar relacionado ao aumento da fração tissular de proteína solúvel em organismos em desenvolvimento.

No caso do tambaqui, a enzima pancreática lipase é a única a apresentar este padrão. As enzimas pancreáticas, tripsina, quimiotripsina e amilase e a

enzima intestinal maltase apresentam um gradual acréscimo. Já as outras enzimas estudadas apresentam importantes flutuações com o tempo.

Neste estudo a quantidade de proteína solúvel dos extratos usados apresentou dois momentos importantes: aumento significativo no momento da eclosão até 12 HAE e no momento do início da alimentação artificial até juvenis com 90 DAE (ANEXO 1). Assim, as flutuações ocorridas na atividade das diferentes enzimas digestivas durante o período entre 1 HAE e 120 HAE poderiam ser devidas às diferenças na produção e secreção destas enzimas, a fim de interagir da melhor maneira frente às novas situações.

8.3. Enzimas pancreáticas

A atividade da tripsina aparece discretamente logo no início do desenvolvimento em larvas de tambaqui com 1 HAE, enquanto a atividade da quimiotripsina aparece somente em larvas com 36 HAE. Este padrão é esperado, pois a tripsina é o ativador comum de todos os zimogênios pancreáticos e, assim, ela converte outras moléculas de tripsinogênio em tripsina e desencadeia uma cascata de atividade proteolítica. Conseqüentemente, espera-se que o aparecimento de atividade de quimiotripsina ocorra em estágios posteriores de desenvolvimento.

O aparecimento tardio da quimiotripsina quando comparada à tripsina tem sido demonstrado em outras espécies de peixes marinhas como o linguado da Califórnia *P. californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006) e a perca européia, *Perca fluviatilis* (Cuvier Péres & Kestemont, 2002) e de água doce como acará-disco, *Symphysodon aequifasciatus* (Chong *et al.*, 2002). Contrariamente, Vega-Orellana

et al. (2006) registraram o aparecimento destas enzimas simultaneamente em larvas de dourado, *Salminus brasiliensis*, 12 HAE (26°C). Atividades de tripsina e quimiotripsina têm sido relatadas em larvas de peixes mesmo antes da abertura da boca e início da alimentação exógena, tal é o caso do robalo europeu, *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante & Cahu, 2001); acará-disco, *S. aequifasciatus* (Chong *et al.*, 2002); sargo, *D. sargus* (Cara Torres *et al.*, 2002) e o corvino de pintas, *S. ocellatus* (Applebaum *et al.*, 2001).

A baixa atividade proteolítica das enzimas tripsina e quimiotripsina nos estágios iniciais do desenvolvimento do tambaqui foi encontrada também por Chakrabarti *et al.* (2006) em larvas do labeo vermelho, *Labeo rohita*; o que seria explicado pelo trato digestório pouco desenvolvido e pelo tipo de alimentação das larvas nesses estágios iniciais. Entretanto, Gisbert *et al.* (2009) encontraram atividades elevadas de tripsina e quimiotripsina no momento da eclosão de larvas de dentón, *Dentex dentex*. Estes autores acreditam que as enzimas estejam envolvidas na embriogênese (clivagem das proteínas da reserva vitelínica) e na eclosão das larvas desta espécie.

Atividades de tripsina e quimiotripsina no tambaqui aumentam gradativamente com o desenvolvimento ontogenético, sendo este acréscimo significativo no início da alimentação exógena e na mudança para alimento inerte (ração comercial). Neste último caso, o aumento de atividade em ambas as enzimas ocorre após um decréscimo significativo das mesmas em juvenis com 16 DAE. Em condições normais a quantidade de tripsina vai aumentando como resposta à demanda de hidrólise protéica; porém, quando os peixes sofrem algum tipo de restrição alimentar, tanto em quantidade quanto em qualidade, a

proporção tripsina/quimiotripsina diminui em função de uma menor produção de tripsina comparada a uma secreção constante de quimiotripsina (Moyano *et al.*, 2005).

Em dentón, *D. dentex*, as atividades de tripsina e quimiotripsina decrescem dramaticamente após eclosão (Gisbert *et al.*, 2009). O decréscimo da atividade proteolítica durante a fase de alimentação endógena também tem sido observado em outras espécies de peixes como bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua* e linguado da Califórnia, *P. californicus* (Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Alvarez-González *et al.*, 2006) e pode estar associado a mudanças no catabolismo das reservas vitelínicas durante este período. Applebaum & Holt (2003) sugerem que atividades de tripsina e quimiotripsina são muito mais dependentes da condição nutricional dos peixes e citam o crescimento na atividade de quimiotripsina com relação à idade em larvas de corvinão de pintas, *S. ocellatus*, apropriadamente alimentadas.

A atividade das carboxipeptidases A e B foi encontrada em larvas de tambaqui com 12 e 36 HAE. Este achado é esperado, pois estas enzimas degradam oligopeptídeos resultantes da ação das principais endopeptidases pancreáticas tripsina e quimiotripsina e a peptidase gástrica pepsina. Além disso, estas exopeptidases apresentam aumento significativo, alcançando inclusive máxima atividade durante o período que compreende a abertura da boca e o início da alimentação exógena, com a passagem de uma dieta com alimento vivo para uma dieta com alimento inerte (ração comercial), quando decresce para os estágios juvenis. Estes resultados sugerem que as enzimas pancreáticas do tipo exopeptidases possuem um papel fundamental no início da alimentação exógena,

não sendo mais tão necessárias nos estágios mais desenvolvidos, onde provavelmente a etapa final da digestão das proteínas será realizada pelas enzimas intestinais.

A atividade da amilase foi precocemente detectada em larvas de tambaqui com apenas 1 HAE. Estes resultados são similares aos encontrados em sargo, *D. sargus* (Cara *et al.*, 2002), pargo rosa, *Pagrus pagrus* (Darias *et al.*, 2006) e dentón, *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) e diferentes de outros trabalhos, onde a enzima pancreática foi detectada coincidindo com a abertura da boca ou pouco tempo depois como em corvinão de pintas, *S. ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000), robalo europeu, *D. labrax* (Zambonino-Infante & Cahu, 2001) e linguado-do-Senegal, *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999). Após a eclosão, a atividade da amilase em larvas de tambaqui aumenta gradativamente até o estágio de juvenis com 16 DAE, quando diminui drasticamente em juvenis com 30 e 45 DAE, aumentando novamente até alcançar a máxima atividade em juvenis com 90 DAE. As mudanças na atividade da amilase durante o desenvolvimento ontogenético podem estar relacionadas ao conteúdo de carboidratos do alimento vivo ou da ração ofertada, de forma que o alto nível de glicogênio dietético nas presas vivas pode estimular a síntese e secreção de amilase (Ma *et al.*, 2005) ao mesmo tempo que os baixos níveis deste nutriente na ração oferecida durante a passagem de uma alimentação viva para uma inerte podem diminuir a atividade desta enzima.

Entretanto, isso não explicaria a diminuição da atividade desta enzima em juvenis de tambaqui com 30 e 45 DAE que foram alimentados com a mesma dieta. Péres *et al.* (1996) mostraram que o declínio de atividade da amilase é

independente da concentração de carboidrato dietético na ração, sugerindo que um decréscimo de atividade pode ser devido a uma programação genética, podendo ser resultado de uma baixa síntese de mRNA de amilase, revelando um controle transcricional da expressão desta enzima. Zambonino-Infante & Cahu (2007) sugerem que esta característica dos peixes de digerir carboidratos com maior eficiência em estágios mais adiantados, poderia ser utilizada para alimentar os peixes maiores com dietas ricas em carboidratos.

A atividade da lipase tem sido detectada durante os primeiros estágios de desenvolvimento em peixes marinhos incluindo o dentón, *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) e peixes de água doce como o labeo vermelho, *L. rohita* (Chakrabarti *et al.*, 2006). Em tambaqui, a maior atividade específica de lipase foi detectada em embriões ainda se movimentando na cápsula ovular (pouco antes da eclosão), diminuindo abruptamente em larvas com 1 HAE e permanecendo relativamente constante até juvenis com 30 DAE, quando diminui drasticamente.

Gisbert *et al.* (2009) detectaram atividade da lipase em dentón, *D. dentex* no momento da eclosão e um aumento progressivo durante o desenvolvimento larval até 12 dias após eclosão, seguido de um decréscimo gradativo até 50 dias após eclosão. Já a atividade relativa da lipase em tambaqui, apresentou uma diminuição gradativa desde o momento da eclosão até juvenis com 45 DAE, fato que pode ser explicado pelo crescimento em tecido corpóreo das larvas durante o desenvolvimento, o que não explicaria o novo aumento significativo da atividade em juvenis com 90 DAE.

Faulk *et al.* (2007) encontraram um padrão diferente de atividade da lipase em larvas do cação de escama *Rachycentron canadum*, aumentando

gradativamente desde o primeiro dia até 22 dias após eclosão quando alcança máxima atividade. Em outras espécies de peixes como o linguado da Califórnia, *P. californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006) e a arabaiana, *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006) não foi detectada atividade total de lipase até abertura da boca e o início da alimentação exógena.

Oozeki & Bailey (1995) sugeriram a existência de dois tipos de lipase em larvas de peixes marinhos (pancreática e não pancreática), uma relacionada à absorção da reserva vitelínica (rica em fosfolipídios) e a segunda cuja atividade estaria relacionada à digestão de lipídios exógenos e apareceria em estágios mais avançados do desenvolvimento. Ainda, uma terceira lipase dependente dos sais biliares foi reportada pelos mesmos autores nos primeiros estágios do desenvolvimento do escamudo do Alasca, *Theragra chalcogramma*. Isto poderia explicar a presença ou ausência de atividade de lipase nos primeiros estágios do desenvolvimento e seu posterior padrão de comportamento.

As diferenças na atividade de lipase podem ser uma consequência da expressão gênica, a qual parece ser regulada pelo tipo (comprimento das cadeias e grau de saturação), mais do que pela quantidade de triglicerídeos na dieta (Morais *et al.*, 2004). Almeida *et al.* (2006), ao alimentar juvenis de tambaqui (112 g aproximadamente) com dietas contendo diferentes níveis de lipídios, observaram que a atividade da lipase gástrica era influenciada pelo lipídio dietético, mas não afetava a atividade de lipase no intestino.

Neste trabalho foi encontrada uma diminuição significativa da atividade de lipase em juvenis com 30, 45 e 90 dias. Sugerimos que este resultado esteja relacionado à composição da ração formulada e à diminuição da frequência de

alimentação. Alguns autores têm evidenciado que após o início da alimentação exógena as mudanças na atividade da lipase durante o desenvolvimento dos peixes são espécie-específicas. Por exemplo, em corvino de pintas, *S. ocellatus*, alimentados com presa viva, a atividade da lipase decresce após a primeira alimentação (Lazo *et al.*, 2007). Em sargo, *D. sargus*, a atividade de lipase foi constante até a metamorfose da larva, aumentando discretamente após a mudança para alimentação artificial (Cara *et al.*, 2003), enquanto em linguado da Califórnia, *P. californicus*, a atividade da lipase aumentou desde o início da alimentação exógena até 15 dias após eclosão, permanecendo constante até a mudança para alimentação com ração. Sabe-se que a razão lipase:protease poderia ser um indicador de mudanças no metabolismo de peixes porque eles utilizam lipídios como principal fonte de energia nos primeiros estágios de desenvolvimento (Sargent *et al.*, 1989) mudando progressivamente para uma dieta rica em proteínas.

O nível de secreção das enzimas pancreáticas (amilase, tripsina, quimiotripsina e lipase) tem sido amplamente utilizado como indicador de maturidade do sistema digestório em larvas de peixes (Ribeiro *et al.*, 2002; Applenbaum & Holt, 2003; Alvarez- González *et al.*, 2006). No caso do tambaqui, o aparecimento da atividade destas enzimas nos primeiros estágios de desenvolvimento indica que o primeiro passo rumo ao amadurecimento completo do sistema digestório deste peixe ocorre no início da ontogênese, mesmo antes da abertura da boca e do início da alimentação exógena.

8.4. Enzimas Intestinais

As enzimas intestinais têm sido utilizadas por alguns autores como indicadores da maturidade da função digestiva no intestino de larvas de peixes marinhos (Kvale *et al.*, 2007). Fosfatase alcalina e maltase (enzimas da borda em escova) foram encontradas em larvas de tambaqui ainda se movimentando na cápsula ovular, enquanto que leucino-aminopeptidase (enzima citosólica) foi detectada 1 HAE. A presença destas enzimas nos primeiros estágios do desenvolvimento, mesmo antes da abertura da boca e do início da alimentação exógena, envolveria processos geneticamente programados que poderiam resultar na absorção dos nutrientes do saco vitelínico (Alvarez-González *et al.*, 2006).

A presença de fosfatase ácida e alcalina em larvas de peixe está relacionada à sua capacidade de digerir e absorver os nutrientes que chegam ao lúmen intestinal. Pérez-Casanova *et al.* (2006) detectaram atividade de fosfatase alcalina em larvas do bacalhau de Portugal, *Melanogrammus aeglefinus*, e bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, no momento da eclosão e antes da abertura da boca e início da alimentação exógena, que acontece com 13 e 24 dias após eclosão, respectivamente. Em ambas as espécies houve um aumento da atividade de fosfatase alcalina em estágios mais adiantados de desenvolvimento. Os autores concluíram que a habilidade destas espécies para absorver nutrientes permanece relativamente constante durante a maior parte dos estágios de desenvolvimento, sendo que o incremento de atividade em larvas mais velhas pode estar relacionado ao incremento na área do intestino disponível para absorção ou maturação dos enterócitos (Ribeiro *et al.*, 1999).

Em tambaqui a atividade da fosfatase alcalina permanece constante entre o período da eclosão, o que precede a abertura da boca (72 HAE), mostrando a máxima atividade entre 84 e 108 HAE. Isso poderia ser indicativo de um elevado processo de absorção de nutrientes no intestino devido ao início da alimentação exógena. Contrariamente, juvenis de tambaqui entre 16 e 90 DAE alimentados com ração comercial apresentaram uma diminuição desta atividade, provavelmente devido à mudança para uma dieta artificial (ração comercial).

Leucino-aminopeptidase tem sido encontrada na borda em escova da membrana dos enterócitos e aumenta abruptamente nas primeiras semanas de vida de algumas espécies de peixes (Zambonio-Infante & Cahu, 2001). Em tambaqui, a atividade da leucino-aminopeptidase foi encontrada em larvas com 1 HAE mostrando um aumento gradativo até juvenis com 16 DAE quando sofre uma queda significativa, aumentando novamente até juvenis com 90 DAE. Este decréscimo de atividade pode estar relacionado a um reajuste na atividade desta enzima por conta do início da alimentação com dieta artificial (ração comercial). Hakim *et al.* (2006), ao trabalhar com tilápia híbrida (*O. mossambicus* X *O. aureus*) alimentada com dietas contendo 30 e 48% de proteína, encontraram que a atividade da leucino-aminopeptidase foi a única que não foi afetada pelo tipo de dieta.

Geralmente, a ausência de atividade da pepsina no trato gastrointestinal de peixes teleósteos durante os primeiros estágios de desenvolvimento é compensada por micro-pinocitose e digestão intracelular das proteínas no intestino posterior (Cara *et al.*, 2003). Neste processo estariam envolvidas fosfatases, catepsina e algumas aminopeptidases. No caso do tambaqui estas

enzimas estariam atuando conjuntamente com atividade de protease ácida, provavelmente devido à grande necessidade de digerir e absorver nutrientes provindos da digestão ácida.

A atividade da maltase mostra um aumento gradativo durante a ontogênese com uma diminuição pouco depois do início da alimentação exógena, indicando provavelmente um ajuste à nova situação, aumentando novamente até máxima atividade em juvenis com 90 DAE. Este padrão de comportamento é esperado já que a maltase participa do processo final da digestão de carboidratos no lúmen intestinal. Entretanto, Gisbert *et al.* (2009) encontraram atividade da maltase apenas 6 DAE em larvas de dentón, *D. dentex*, enquanto que a atividade da amilase foi detectada no momento da eclosão. Ainda, a atividade da maltase nesta espécie não sofreu grandes variações até o final do estudo (50 DAE).

Desta forma o padrão geral de atividade das enzimas intestinais durante a ontogênese de tambaqui não parece ser similar ao descrito para muitas espécies de peixes (Ribeiro *et al.*, 1999; Alvarez-González *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007), no qual o progressivo decréscimo na atividade das enzimas citosólicas é acompanhado com o incremento de atividade das enzimas da borda em escova, característico de um processo final de amadurecimento dos enterócitos das larvas de peixes (Zambonino-Infante & Cahu, 2001).

8.5. Enzima gástrica

A digestão das proteínas é afetada pela diferenciação das glândulas gástricas no estômago e sua subsequente acidificação durante o desenvolvimento larval devido à produção de ácido clorídrico. Este fenômeno tem sido considerado

por muitos autores como o passo final do desenvolvimento larval e aquisição de características digestivas iguais aos juvenis, mesmo não tendo alcançado outras mudanças morfológicas (Gawlicka *et al.*, 2001).

A ausência de um estômago morfológica e funcionalmente diferenciado durante os primeiros dias após eclosão tem sido descrita em diversas espécies de peixes (Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2009), não ocorrendo, conseqüentemente, secreção ácida ou digestão pela pepsina antes do desenvolvimento do estômago nestas espécies. Desta forma, a digestão das proteínas é realizada por serino-proteases como tripsina e quimiotripsina em pH alcalino.

Neste trabalho, foi detectada atividade de pepsina em larvas de tambaqui 1 HAE, aumentando gradativamente até 108 HAE, quando começa a diminuir. Contrariamente, Vega-Orellana *et al.* (2003) encontraram aparecimento tardio da pepsina em larvas de dourado, com notáveis incrementos a partir de 108 HAE (24-26 °C). Apesar de apresentar estômago já no terceiro dia após eclosão, a atividade de pepsina foi notória no final do quarto dia. Observações similares foram relatadas em larvas do bagre-africano, *Clarias gariepinus*, e do acará-disco *S. aequifasciata*, nos quais a atividade de pepsina foi encontrada cerca de cinco a seis dias após a formação do estômago (Verreth *et al.*, 1992; Chong *et al.*, 2002). Estudos realizados por Vieira & Johnston (1996) detectaram que o estômago e o intestino do tambaqui foram evidentes e bem desenvolvidos apenas 156 HAE a 28°C, sendo que com 62 HAE o trato gastrointestinal não era diferenciado mostrando-se como um tubo simples com uma única camada de células epiteliais.

Os resultados desse trabalho mostraram que a atividade de pepsina apresentou diminuição gradativa significativa coincidente com a mudança de alimentação exclusiva com alimento vivo e reserva vitelínica para uma alimentação complementada por dieta artificial (ração comercial). A não responsividade da pepsina em função da variação de proteína da dieta do tambaqui foi reportada por Kohla *et al.* (1992) que não observaram indução da atividade da enzima quando testaram níveis de 30 e 50% de proteína bruta na ração, estudo este corroborado por Corrêa (2002), que observou indução de atividade proteolítica ácida no estômago de tambaqui apenas entre 18 e 28% de proteína bruta, permanecendo constantes até 38%. Este autor salientou ainda que o estímulo indutivo da pepsina ocorre em resposta à entrada de proteína no estômago até uma determinada concentração, a partir da qual não seria mais responsivo aos aumentos nos teores deste nutriente, permanecendo, portanto, constante.

Almeida *et al.* (2006) observaram elevada responsividade de protease inespecífica no estômago de juvenis de tambaqui alimentado com níveis crescentes de proteína na dieta. Entretanto, não foi observado o mesmo padrão para as enzimas proteolíticas alcalinas inespecíficas. Neste estudo, a diminuição da atividade da pepsina pode estar relacionada com a existência de atividade proteolítica desenvolvida no pâncreas e intestino (tripsina, quimiotripsina, fosfatases e aminopeptidases), não sendo mais necessária a contribuição da digestão ácida nestes estágios de desenvolvimento.

Este estudo apresenta os primeiros dados relacionados à função digestiva em larvas e juvenis de tambaqui constituindo-se no primeiro passo para o

conhecimento da fisiologia digestiva desta espécie. As rápidas mudanças nas atividades de larvas e juvenis de *C. macropomum* durante a ontogênese suportam a idéia de mecanismos digestivos de indução e regulação bem estabelecidos refletindo a expressão gênica programada e a produção das diferentes proteínas associadas com estas mudanças durante o desenvolvimento desta espécie. Entretanto, estudos relacionando quantidade e qualidades de nutrientes são necessários para o melhor entendimento das funções digestivas do tambaqui durante sua ontogênese.

9. CONCLUSÕES

1. O comportamento das enzimas digestivas envolvidas na digestão dos carboidratos, lipídeos e proteínas indica que o tambaqui possui um desenvolvimento da função digestiva bem equilibrada e precoce.
2. O tambaqui possui secreção pancreática ativa em estágios que precedem a abertura da boca e início da alimentação exógena (1 HAE).
3. As endopeptidases pancreáticas tripsina e quimiotripsina apareceram em momentos diferentes durante o desenvolvimento do tambaqui evidenciando a indução da segunda pela primeira.
4. Tripsina e quimiotripsina mostraram aumento gradual de atividade durante o desenvolvimento do tambaqui sendo mais evidentes no momento da abertura da boca e início da alimentação exógena.
5. Tripsina e quimiotripsina mostraram uma diminuição nas suas atividades no momento da mudança de alimento natural para ração comercial indicando que estas enzimas podem ser moduladas pelo tipo de alimento.
6. As exopeptidases carboxipeptidase A e B apresentaram aumento gradual, alcançando máxima atividade no início da alimentação exógena sugerindo a importância destas no momento de mudança alimentar, ao mesmo tempo em que seus baixos níveis durante as fases juvenis podem estar relacionados com o tipo de alimento ofertado.
7. A atividade de amilase durante o desenvolvimento ontogenético do tambaqui mostrou aumento gradual alcançando máxima atividade em juvenis com 90 DAE. Entretanto, esta enzima não parece ser a principal responsável pela aquisição de nutrientes energéticos.

8. A lipase tem um papel importante durante o período de ovo do tambaqui sendo sua atividade muito menor nas outras fases de desenvolvimento. Apesar disso, ela parece ser a principal enzima para obtenção de nutrientes energéticos durante as primeiras fases de desenvolvimento.
9. A digestão intestinal em tambaqui é ativa em estágios que precedem a eclosão da larva tornando-se mais importante a partir da abertura da boca e início da alimentação exógena.
10. A atividade da fosfatase alcalina apresenta uma diminuição em juvenis, podendo estar relacionado à mudança para alimento comercial.
11. A atividade de leucino aminopeptidase apresenta dois momentos de diminuição, provavelmente relacionados à mudança do tipo de alimento; o primeiro pouco antes da abertura da boca e início da alimentação exógena e outro na mudança para alimento inerte, sendo esta enzima provavelmente modulada pelo tipo de alimento.
12. A atividade de maltase, que representa o estágio final da degradação de carboidratos é ativa em larvas movimentando-se na cápsula ovular e aumenta com o desenvolvimento até juvenis com 90 DAE, refletindo numa ação sinérgica e complementar com a amilase na busca de um maior aproveitamento do conteúdo energético da dieta.
13. O tambaqui apresenta atividade de protease ácida (pepsina) antes da formação completa do estômago e aumenta gradativamente até pouco depois da abertura da boca e início da alimentação exógena, sugerindo a

importância desta enzima na degradação das proteínas nos primeiros estágios de desenvolvimento.

14. A atividade de pepsina em juvenis foi menor quando comparada aos primeiros estágios, o que sugere a modulação desta enzima pelo tipo de alimento.

CAPITULO II: Expressão gênica do tripsinogênio e pepsinogênio durante os primeiros estágios do desenvolvimento de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818).

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do desenvolvimento embrionário e larval de peixes depende de um balanço adequado de amino ácidos para a síntese de proteínas, renovação das células e desenvolvimento dos órgãos, bem como para a regulação osmótica e flutuação dos embriões. Desta forma, uma efetiva digestão das proteínas é essencial para a manutenção da saúde e sobrevivência dos peixes nos primeiros estágios de desenvolvimento.

A família das serino proteases é uma das maiores famílias de proteases do reino animal. Ela está envolvida em processos que incluem digestão das proteínas da dieta, coagulação do sangue, respostas imunológicas, sinais de transdução, ativação de hormônios, desenvolvimento e processos inflamatórios tanto em procariontes quanto em eucariontes (O'Connell *et al.*, 2006). Dentre os componentes dessa família, o grupo das quimiotripsinas e tripsinas cumpre, principalmente, a função extracelular de digestão do alimento, fibrinólise, e ativação do sistema complemento, embora cumpra, ainda, ocasionalmente, funções intracelulares como a digestão de bactérias em neutrófilos de mamíferos (Whaley & Lemercier, 1993).

A tripsina é a única protease pancreática capaz de se ativar a partir do seu precursor e ativar outras proteases pancreáticas. Desta forma, a tripsina ocupa uma posição chave no controle da atividade das proteases pancreáticas.

A família das proteinases aspárticas, pepsinas, são normalmente secretadas na mucosa gástrica dos animais sob a forma de zimogênios e cumprem importante função digestiva tanto em invertebrados como em vertebrados (Kageyama, 2002). Os zimogênios de pepsina são sintetizados na mucosa gástrica e convertidos à sua forma ativa pepsina em meio ácido do suco gástrico por meio da remoção do terminal amino. Cinco grupos de pepsinogênios (com conformação da estrutura primária e propriedades enzimáticas bem diferentes) têm sido encontrados: A, B e F, progastrina e proquimosina, sendo que esta última é encontrada principalmente no suco gástrico de fetos e recém nascidos de mamíferos (Kageyama, 2002; Tanji *et al.*, 2007).

Em peixes teleósteos, a sequência de aminoácidos de proteases digestivas tem sido reportada em várias espécies (Gudmundsdottir *et al.*, 1993; Douglas & Gallant, 1998). A aplicação de técnicas de biologia celular e molecular na ontogenia de larvas de peixes pode determinar se mudanças na atividade das enzimas digestivas refletem um controle no nível de transcrição ou tradução e identifica os genes envolvidos na regulação do desenvolvimento gastrointestinal (Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Cahu *et al.*, 2004 e Wang *et al.*, 2006). Entretanto, são recentes os trabalhos utilizando tais técnicas para o estudo da expressão gênica das enzimas digestivas em peixes (Cahu, *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2005 e Wang *et al.*, 2006). Paralelamente, alguns estudos têm analisado a atividade das enzimas digestivas juntamente com a expressão gênica obtendo

resultados mais apurados sobre a funcionabilidade do trato gastrointestinal em peixes (Murray *et al.*, 2003; 2004; 2006).

1.1. Expressão gênica das enzimas digestivas

A expressão gênica é regulada em múltiplos níveis na célula e parece ser espécie específica e dependente da idade. O estudo da regulação da expressão gênica das enzimas digestivas é importante para a compreensão dos processos digestivos e do crescimento larval. Em vertebrados, a expressão das enzimas digestivas de células acinares é regulada pelo menos por dois complexos sinais fisiológicos: hormônios e dieta (Peres *et al.*, 1998 e Wang *et al.*, 2006). Alguns autores têm mostrado que os genes que codificam a tripsina pancreática, a quimiotripsina, a elastase, a carboxipeptidase A e B e a lipase de linguado japonês são expressos no momento do início da alimentação exógena (Srivastava *et al.*, 2002). A composição e quantidade da dieta controlam os ajustes de tripsina e amilase em larvas de robalo europeu. A regulação da síntese de tripsina e amilase ocorre no nível traducional (Peres *et al.*, 1998).

1.2. A técnica de PCR em tempo real

O primeiro relato de PCR em tempo real foi feito por Higuchi *et al.* (1993) que, usando brometo de etídio como intercalante durante a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e um termociclador modificado para irradiar as amostras com luz ultravioleta (UV), conseguiram detectar a fluorescência resultante da reação com uma câmera acoplada.

O gráfico resultante da fluorescência gerada em função do número de ciclos representa, de maneira precisa, a concentração do produto de PCR que está sendo gerada a cada ciclo da reação, exceto nos ciclos iniciais, ou seja, aqueles que precedem a fase exponencial. Apesar de precisa e mais confiável que as demais metodologias utilizadas para quantificação até então, esta técnica apresentava alguns inconvenientes, pois detectava a fluorescência produzida por produtos de PCR não específicos, além do uso de uma substância carcinogênica, o brometo de etídio.

O princípio da técnica de PCR em tempo real leva em consideração duas descobertas importantes: a primeira é a atividade exonuclease 5'→3' da enzima *Taq* DNA polimerase e a segunda é a construção de sondas de oligonucleotídeos marcadas duplamente. Estas sondas são baseadas no princípio FRET (do inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e emitem sinal de fluorescência somente quando clivadas (Giulietti *et al.*, 2001).

Atualmente, há várias moléculas fluorescentes que são utilizadas rotineiramente, como SYBR™ Green e TaqMan™. As moléculas de SYBR™ Green emitem grande quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla-fita, enquanto no sistema TaqMan™ a emissão fluorescente depende de uma sonda que anela especificamente entre dois oligonucleotídeos (Applied Biosystems, 2007).

Utilizando-se qualquer uma das reações químicas desenvolvidas, o aumento na emissão de fluorescência pode ser lido por um detector em tempo real, durante a reação de PCR, como consequência direta da amplificação da sequência de DNA de interesse. Um programa de computador calcula um ΔR_n

usando a seguinte equação: $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$, onde Rn^+ representa a emissão de fluorescência em cada ponto e Rn^- , a emissão de fluorescência na linha de base (Alves, 2004).

O computador constrói a curva de amplificação usando os dados de emissão de fluorescência durante a PCR. Os valores de ΔRn são plotados *versus* o número de ciclos de amplificação (Figura 14). Durante os ciclos iniciais da amplificação por PCR, os valores de ΔRn não excedem a linha de base.

O parâmetro mais importante para a quantificação propriamente dita é o valor do limiar de fluorescência do método. Esse limiar, denominado de *Cycle Threshold (Ct)*, refere-se ao ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR. A fluorescência emitida abaixo desse valor é considerada ruído de fundo (*background*) (Gilbson *et al.*, 1996). O valor de *Ct* sempre é calculado durante a fase exponencial da reação de amplificação e é fundamental para a construção da curva de calibração, na qual o eixo x corresponde ao *log* da concentração de DNA/RNA e o eixo y aos valores de *Ct*. Este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o *Ct*, teoricamente mais expresso é determinado gene, ou seja, a diferença de 1 *Ct*, representa o dobro de expressão.

Existem duas estratégias para analisar dados de experimentos de PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa (Alves, 2004). Na quantificação absoluta determina-se com precisão o número de cópias de um determinado DNA pela comparação com uma curva de calibração apropriada.

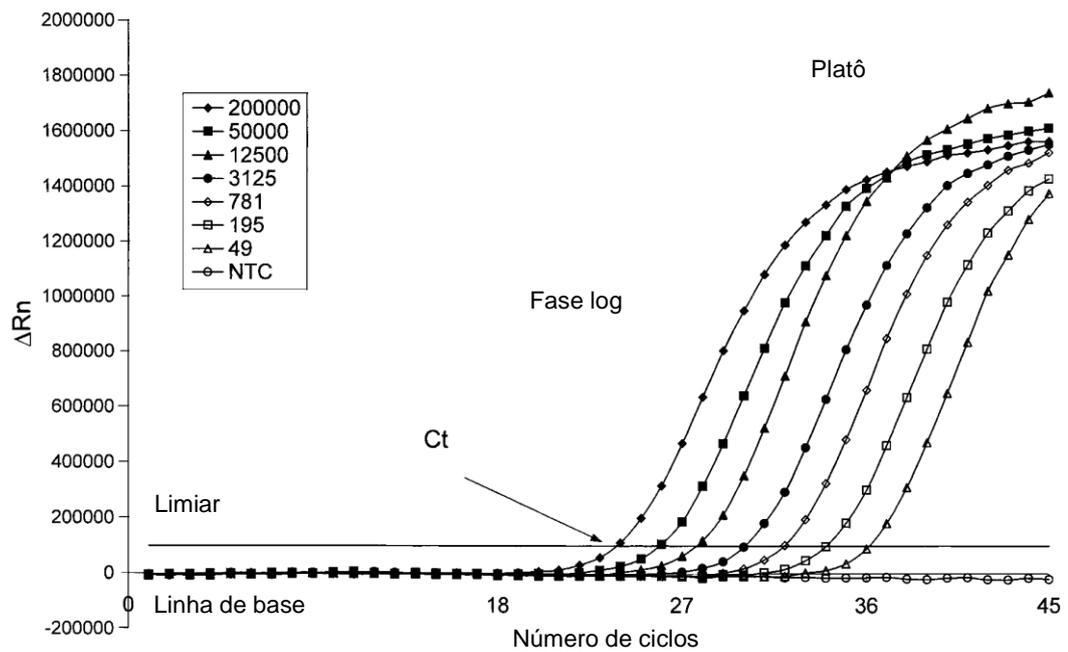


Figura 14. Curva de amplificação onde o ΔRn é plotado contra o número de ciclos. Fonte: Adaptado de Giulietti *et al.* (2001).

Para poder contrastar os resultados e quantificar cada amostra de DNA são necessários padrões cuidadosamente elaborados e precisos, cuja obtenção é difícil e laboriosa, pois demanda precisão na quantificação de concentrações dos padrões. Uma vez que a calibração esteja bem definida, a quantificação absoluta facilita a comparação entre os resultados da expressão gênica obtidos entre diferentes situações

Por outro lado, a quantificação relativa é de certa maneira fácil, uma vez que a transcrição do gene de interesse não será expressa em número absoluto de transcritos de uma amostra e sim expressa em termos da quantidade relativa de transcritos em relação a outro gene expresso, denominado gene de referência.

Este método é, na maioria das vezes, adequado para investigação de mudanças fisiológicas em termos de expressão gênica. As tendências e

processos biológicos podem ser mais bem explicados pela quantificação relativa, porém os resultados obtidos dependem do(s) gene(s) de referência escolhido(s) e dos procedimentos de normalização utilizados.

O método de PCR quantitativo em tempo real tem sido considerado uma ferramenta de extrema importância na quantificação de RNAs mensageiros em baixos níveis, tornando a quantificação mais rápida e acurada (Giulietti *et al.*, 2001).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Vide Capítulo I

2.2. Desenho dos oligonucleotídeos

Inicialmente foi realizada uma busca por homologia de seqüências de DNA similares para tripsina e pepsina de peixes teleósteos, depositadas em banco de dados públicos com auxílio do programa “BLAST 2.0” (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Homologias com baixo e-value foram, então, analisadas e, a partir das seqüências totais alinhadas, foram construídos oligonucleotídeos senso (forward) e anti-senso (reverse) com 19 a 22 pares de bases (pb) para cada gene. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Prodimol Biotecnologia S.A. (Tabela 3).

Tabela 3. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR.

Gene	Seqüência dos iniciadores senso e antisenso (5'- 3')	Tamanho do produto (pb) ¹
Tripsina	TCTCTCAGCACATCCATATCC	258
	TAGCTGCGCTCCTGCTGGCACC	
Pepsina	TACTGTGACACTGTGACGG	333
	TAGGCCAGACCCATGATGC	
18S	GGAATGAGTACACTTTAAATCC	200
	GGGGCGCCGAGAGGCAGGGGC	

¹bp: pares de base;

2.3. Extração de RNA total

Todo o material e soluções utilizadas durante o isolamento do RNA total, com exceção de Tris-HCl e solventes orgânicos, foram tratados com Dietil-pirocarbonato (DEPC 0,1% [v/v]) para completa eliminação das RNAses exógenas, conforme Sambrook *et al.* (2002) e autoclavados a 180°C.

O RNA total foi isolado utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, cerca de 100 mg de amostras de ovos, larvas e intestinos e estômagos de juvenis de tambaqui foram homogeneizadas em 1mL de TRIzol[®], solução composta de fenol e isotiocianato de guanidina, que destrói os tecidos e dissolve os componentes celulares sem danificá-los. Os extratos resultantes foram transferidos para microtubos e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Para reduzir compostos indesejáveis como polissacarídeos, lipídeos e DNA os microtubos foram centrifugados a 10000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi retirado e, em seguida, adicionado 200 µL de clorofórmio (puro) sob agitação intensa por 15 segundos, para separar o RNA dos outros compostos celulares. Após este procedimento, foram novamente incubados por 15 minutos a 4°C e centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA total foi então transferida para microtubos contendo 500 µL de isopropanol 100% (v/v) para a precipitação do RNA total. Os microtubos foram cuidadosamente invertidos por 30 vezes e finalmente centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado vagorosamente e os precipitados resultantes foram lavados duas vezes com 1mL de etanol 75% (v/v) para eliminar os resíduos de isopropanol. Em seguida, foram novamente centrifugados a 7500g por 5

minutos a 4°C, o etanol foi descartado e o RNA desidratado a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, o RNA total foi ressuscitado em 50µL de água deionizada livre de RNase (tratada com DEPC 0,01%). As amostras foram finalmente incubadas para desnaturação por 10 minutos a 55°C.

A concentração do RNA total foi determinada em espectrofotômetro a DO_{260nm} , a qualidade e integridade foram verificadas pela razão $DO_{260nm}:DO_{280nm}$ e em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (m/v).

2.4. Tratamento com DNase I

Para eliminar qualquer contaminação das amostras com DNA genômico o RNA total foi tratado com DNase I da Invitrogen Life Technologies. Para cada 1µg de RNA total obtido foi adicionado 1µL de tampão: 200mM Tris-HCl (pH 8,4); 20mM de $MgCl_2$ e 500mM de KCl, 1µL da enzima DNase I (1U/µL) e água tratada com DEPC (0,01%) em quantidade suficiente para um volume final de 10µL. A mistura da reação foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a DNase I foi inativada pela adição de 1µL de EDTA 25mM e as amostras foram aquecidas a 65°C por 10 minutos e congeladas em freezer -70°C.

2.5. Síntese de DNA complementar

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de RNA total livre de DNA genômico e DNase I utilizando a enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase) e um oligo(dT)₁₂₋₁₈ como iniciador, ambos da Invitrogen Life Technologies. Foram utilizados 5µg de RNA total, 1µL de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5µg/µL) e 1µL de dNTP mix (10mM), que foram incubados a

65°C por 5 minutos e resfriados a 4°C por 1 minuto. A essa reação foram adicionados 2µL de tampão 5X (250mM de Tris-HCl pH 8,3, 375mM de KCl e 15mM de MgCl₂), 2µL de DTT 0,1M e 1µL de RNase OUT (40U/µL) em um volume final de 20µL. Em seguida foram incubados a 37°C por 2 minutos. Após esse tempo foram adicionadas à reação 200 unidades de M-MLV transcriptase reversa. A transcrição reversa foi feita em termociclador ATC 401 da APOLLO Instrumentation nas seguintes condições: 37°C por 50 minutos, procedendo-se a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos.

Para a remoção do RNA molde da molécula híbrida cDNA:DNA adicionou-se 2 unidades de RNase H e incubou-se por 20 minutos a 37°C. O cDNA dos ovos, larvas e juvenis de tabaqui foi congelado em freezer -70° para posterior análise.

2.6. Amplificação por PCR

As reações de amplificação, utilizando cDNA extraído de estômago e intestino de tabaquis com 90 dias foram realizadas em um volume final de 100µL, contendo: 100ng de cDNA, 10µL de tampão (10X) para PCR (200mM de Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl), 3µL de MgCl₂ (50mM); 2µL de dNTP mix (10mM); 1µL do iniciador senso (3pmol); 1µL do iniciador anti-senso (3pmol); água estéril e 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL).

As condições de amplificação estabelecidas foram: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos para ambos os genes e 72°C por 1 minuto seguidos de 72°C por 10 minutos.

Para visualizar os produtos das reações de amplificação por PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1% e corada com brometo de etídio (m/v) e fotografado por meio de fotodocumentador ImageMaster® VDS da Pharmacia Biotech. Para cada par de oligonucleotídeos foram feitas três repetições com o objetivo de comprovar os resultados (Figura 15).

2.7. Purificação dos fragmentos provenientes da reação de PCR

Após eletroforese, as regiões do gel contendo as bandas de interesse foram retiradas e colocadas em microtubos de 1,5mL. Para purificação foram adicionados 100µL de tampão TE (Tris-HCl pH 7,4 10mM, EDTA 1mM) por 4 h a 65°C, para eluição do DNA. O máximo de tampão foi recolhido e o DNA resultante ressuspendido em 10µL de água estéril. Os fragmentos purificados foram amplificados novamente nas condições descritas anteriormente e reservados para posterior sequenciamento.

2.8. Sequenciamento dos produtos amplificados por PCR

A reação de sequenciamento foi realizada usando-se os procedimentos descritos no manual Kit ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction. Os produtos de PCR foram utilizados nas reações de sequenciamento assim constituídas: 100ng de DNA, 1,5 µL de oligonucleotídeo antisense (3µmol); 1,5 µL de tampão 2,5 X (Tris-HCl 200 mM, MgCl₂ 5 mM); 1µL de Big-dye e água deionizada estéril em quantidade suficiente para um volume final de 10 µL em placa de 96 poços. As condições de termociclagem foram: 96°C

por 2 minutos e 39 ciclos (96° C por 30 segundos, 55° C por 20 segundos e 60° C por 30 segundos) finalizando com 72°C por 7 minutos.

Após a PCR, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento adicionando 40 µL de isopropanol 65% (v/v) em cada poço. As amostras permaneceram à temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz e foram centrifugadas por 30 minutos a 3000g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 60% (v/v) foram adicionados. A placa foi novamente centrifugada à temperatura ambiente por 5 minutos a 3000g. O sobrenadante foi descartado por inversão e as amostras secas por 1 hora a 37 °C ao abrigo da luz. Em seguida foram acrescentados 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) em cada poço e a placa foi aquecida a 95 °C por 5 minutos, resfriada em gelo por mais 2 minutos e injetada no sequenciador automático de 1 capilar - ABI 7100 *Sequence Analyzer* (Applied Biosystems).

2.9. Análise das sequências

As sequências obtidas foram submetidas ao programa BLASTx e BLASTn, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), que deduz a sequência de aminoácidos a partir da sequência nucleotídica e compara com sequências de aminoácidos disponíveis em banco de dados. Desta maneira, pode-se inferir se a síntese é *de novo* homóloga a outra sequência ou se contém regiões que auxiliem a caracterização de sua função (Tabela 4 e 5).

2.10. Desenho dos oligonucleotídeos para qRT-PCR

Sequências dos genes de tripsina, pepsina e 18s (controle endógeno) de tabaqui, oriundas do seqüenciamento, foram utilizadas para o desenho dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR em tempo real. Os iniciadores foram desenhados com o uso do Software Oligo Explorer 1.2 (Gene Link) (<http://www.genelink.com/tools/gl-oe.asp>).

Tabela 4. Sequência parcial de nucleotídeos de tabaqui (A) tripsina (número de acesso bankit1241270) e pepsina (número de acesso bankit1241282) e 18S (número de acesso bankit1241334). As áreas sombreadas correspondem aos locais de acoplamento dos oligonucleotídeos.

(A) Tripsina (258pb)

ACCCAAAGTTATGGGCGGGGGGACCATGTGCTCACTGCCGACCGCAACAAGCTGCAGTGTCTGG
AG**ATCCCCATCCTGTCTGAAAAG**GACTGTCAGAACTCCTACCCTGGCATGATCACTAATTCCATGT
TCTGCGCTGGTTATCTGGAGGGAGGCCA**AGGACTCTTGCCAGGGT**GACTCTGGTGGTCCTGTGGT
GTGCAATAATCAGCTGCAGGGTGTGTGTCCTGGGATATGGATGTGCTGAGAGAAGTGCCAAC

(B) Pepsina (333pb)

AGTCGTACGGTTGGGTGGAGCTTCAGTCTCGCTCAGTCCATAGATCTGATTCTGAATTGAGATTCC
ACCAACCGTACAGTGTACAGTAACATCATGGGTCTGGCCTAAATCATGGGTCGGGCCTAAATCC
TTTGGATTGCCTAAGTTCAA**GAATGCCAATAAACTCTCTCCA**ATTCAGTACGGCACCGGCAGGCT
TCGCGGATACCTGCACTACGAGGCTCGAGGAGTTGGTGGAGCCACTATTCAAATCACTTGTTAGG
ACTGAGC**GGGACTGACACTGGATACTT**GACTAGAATGGCAGAAAATGGCATCATGGGTCTGGCCTAAAA

(C) 18S (200pb)

GGAATGAGTACAATTTAAATCCTTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATCTTAAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCG
GGATCGAGCTGACGGTCCGCCGCGAGGCGAGCCACCGTCTGTCCCA**GCCCCTGCCTCTCGGCGC**
CCC

Tabela 5. Comparação das seqüências nucleotídicas de tripsinogênio e pepsinogênio de *Colossoma macropomum* com seqüências de peixes publicadas⁽¹⁾.

Nº de acesso	Espécie	Gene	Homologia	Valor e ⁽²⁾
AB359189.1			89%	6e-74
AB359190.1	<i>Solea senegalensis</i>	Tripsinogênio 1A,	88%	1e-70
AB359191.1		1B e 1C	88%	6e-69
U25747.1	<i>Takifugu rubripes</i>	Tripsinogênio	89%	6e-74
NM_001123711.1	<i>Salmo salar</i>	Tripsina 1A, 1B	88%	8e-68
X70072.1				
DQ443543.1		Precursor de		
AY550948.1	<i>Sparus aurata</i>	tripsinogênio II,	90%	3e-67
		Tripsinogênio		
AY737395.1	<i>Oreochromis aureus</i>	Tripsina	87%	1e-65
AY179347.1	<i>Sphoeroides annulatus</i>	Tripsina	86%	2e-64
EU688996.1	<i>Siniperca chuatsi</i>	Tripsinogênio 1A	87%	6e-64
AY737394.1	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tripsina	88%	3e-62
AY496969.1	<i>Tautogolabrus adspersus</i>	Pre-tripsinogênio	86%	3e-62
NM_001104900.1	<i>Oryzias latipes</i>	Tripsinogênio	87%	4e-61
EU807926.1	<i>Siniperca scherzeri</i>	Pepsinogênio 1A	78%	4e-05
EU807925.1	<i>Siniperca chuatsi</i>	Pepsinogênio 1A	78%	4e-05
AJ550951.1	<i>Trematomus bernacchii</i>	Pepsina 3A	76%	0.002

¹ Todas as seqüências de nucleotídeos estão publicadas no banco de genes do NCBI.

² Cut -off: 1e⁻⁰³

Tabela 6. Seqüência dos oligonucleotídeos para o PCR quantitativo.

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos senso e antisenso (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)¹	Número de acesso²
Tripsina	ATCCCATCCTGTCTGAAAAG ACCCTGGCAAGAGTCCT	108	bankit1241270
Pepsina	GAATGCCAATAAACTCTCTCCA CCCGCTCAGTCCTAACAA	121	bankit1241282
18S	GGAATGAGTACACTTTAAATCC GGGGCGCCGAGAGGCAGGGGC	200	bankit1241334

¹Pares de base

²seqüências submetidas ao Banco de dados Genbank, a partir das quais os oligonucleotídeos foram desenhados.

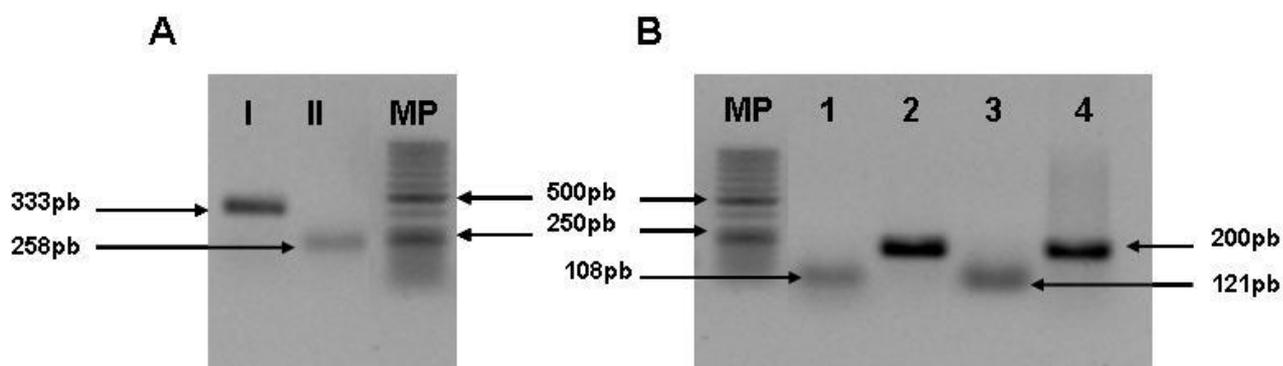


Figura 15. Gel de agarose 1% com EtBr (m/v) em TBE 1X mostrando os produtos de PCR utilizando os oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências do Banco de Dados (A) e utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir das seqüências dos produtos em A (B). Linha I e 3= pepsina, linha II e 1=tripsina, linha 2 e 4= 18S, MP = marcador de peso molecular.

2.11. Confirmação de especificidade dos oligonucleotídeos

O cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído das amostras foi empregado nas reações de PCR em tempo real com o objetivo de estabelecer as condições de amplificação para cada um dos genes estudados por meio da verificação da especificidade dos oligonucleotídeos, que foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) (Figura 15). A especificidade pode também ser confirmada pela análise das curvas de desnaturação, que foram realizadas de 70°C a 95°C a 0,1°C/s para os genes estudados, os quais mostraram apenas o produto esperado, como ilustrado na figura 2, e cujas temperaturas de desnaturação foram 74,55°C e 70,87°C para tripsina e pepsina, respectivamente.

A análise da curva de desnaturação é um método preciso e rápido para verificar a especificidade dos produtos de PCR, mas não deve ser utilizado como única fonte de confirmação de especificidade, uma vez que em alguns casos, produtos de diferentes comprimentos podem ter a mesma temperatura de desnaturação, sendo indistinguíveis por essa análise.

2.12. Reação de qRT-PCR

As reações de PCR para a análise por PCR em tempo real foram feitas utilizando o equipamento ABI Prism 7500 *Real Time PCR* System (Applied Biosystems, CA). As reações foram compostas por: 5 μL de SYBR[®] *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems CA), 1 μL do iniciador senso (0,25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) e 1 μL do iniciador antisenso (0,25 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$), 100ng de cDNA e água ultra pura suficiente para completar o volume de 10 μL . As condições de reação foram: 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A amplificação dos produtos da PCR foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% e por análise das curvas de desnaturação (*melting curve*), que possibilita a verificação da temperatura de desnaturação do produto amplificado, o que permite diferenciar produtos inespecíficos dos produtos esperados

2.13. Eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio de uma curva de diluição em série dos produtos da PCR obtidos a partir de amostras de estômago e intestino de tambaqui com 90 dias após eclosão. A partir dos dados obtidos, um gráfico do ciclo de início da detecção do produto amplificado (Ct)

versus o \log_{10} do número relativo de cópias da diluição em série foi produzido. Uma regressão linear foi realizada para determinação do coeficiente angular da reta (S), o qual foi utilizado para determinar a eficiência de amplificação usando a fórmula desenvolvida por Pfaffl (2001):

$$\text{Eficiência (E)} = 10^{(-1/S)}.$$

2.14. Quantificação relativa da expressão gênica

Com o objetivo de observar diferenças de expressão do tripsinogênio e pepsinogênio entre os estágios de desenvolvimento do tabaqui, optou-se pelo método de quantificação relativa (Pfaffl, 2001). Este método é uma modificação do método Ct comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$) baseado na quantificação do gene de interesse em relação a um gene constitutivo denominado gene de referência (18S) e a eficiência na transcrição reversa.

A razão de expressão relativa é baseada na eficiência de amplificação e na variação do Ct do grupo controle ou calibrador e os outros grupos de interesse em relação ao gene constitutivo denominado gene de referência. A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa:

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct gene alvo (calibrador - amostra)}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct gene referência (calibrador - amostra)}}$$

Onde:

$E_{\text{gene alvo}}$ = Eficiência de amplificação do gene alvo

$E_{\text{gene referência}}$ = Eficiência de amplificação do gene de referência

Ct = Ciclo de início da detecção do produto amplificado

2.15. Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média da expressão relativa \pm erro padrão da média. A significância estatística das diferenças entre a expressão relativa dos estágios, para cada gene, foi estabelecida por meio de análise de variância ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de Tuckey, com limite de significância de 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Extração de RNA Total

O RNA total extraído de ovos e larvas, bem como de intestinos e estômagos de tambaqui estão ilustrados na figura 16A. A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu verificar a integridade do RNA total, avaliada pelas bandas estruturais do RNA ribossômico (28s, 18s e 5,8s). A pureza do RNA extraído foi verificada por espectrofotometria com índices entre 1,8-1,9. A integridade do DNA complementar a partir dos RNAs extraídos pode ser observada na figura 16B.

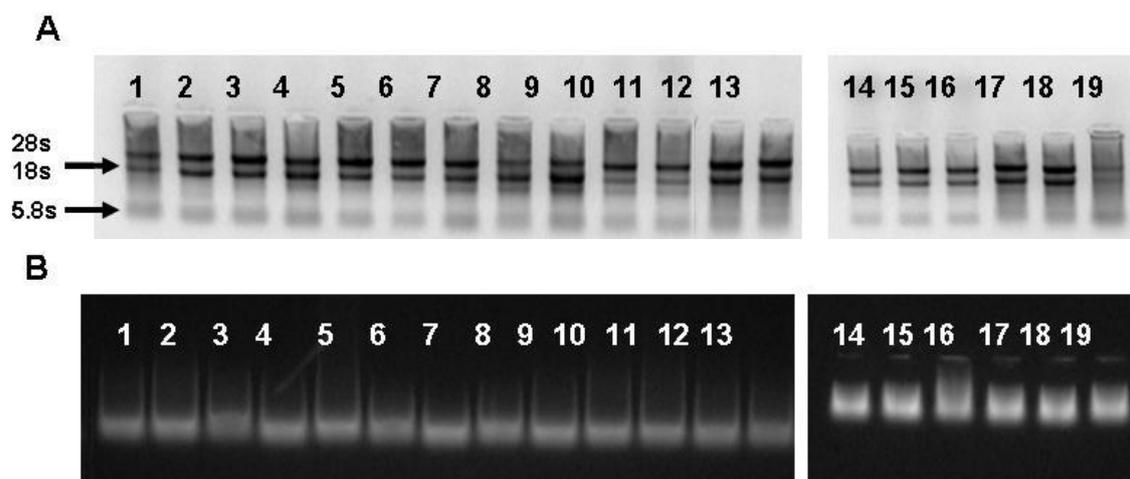


Figura 16. Amostras de RNA (A) e cDNA (B) de ovos, larvas e juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* após eletroforese em gel de agarose 1%/EtBr em TAE 1X. Linha 1 corresponde a embriões movimentando-se na cápsula ovular pouco antes da eclosão. Linhas 2 a 12 correspondem a larvas nos estágios de 1 até 120 horas após eclosão (a cada 12 horas). Linha 13 corresponde a larvas com 16 dias após eclosão. Linhas 14, 16 e 18 correspondem a intestinos de tambaqui com 30, 45 e 90 dias após eclosão. Linhas 15, 17 e 19 correspondem a estômagos de tambaqui com 30, 45 e 90 dias após eclosão.

3.2. Confirmação de especificidade dos oligonucleotídeos

A especificidade de amplificação para cada amplicom foi confirmada pela realização da curva de desnaturação “*Melting Curve*” para cada amplificação realizada por qRT-PCR (Figura 17).

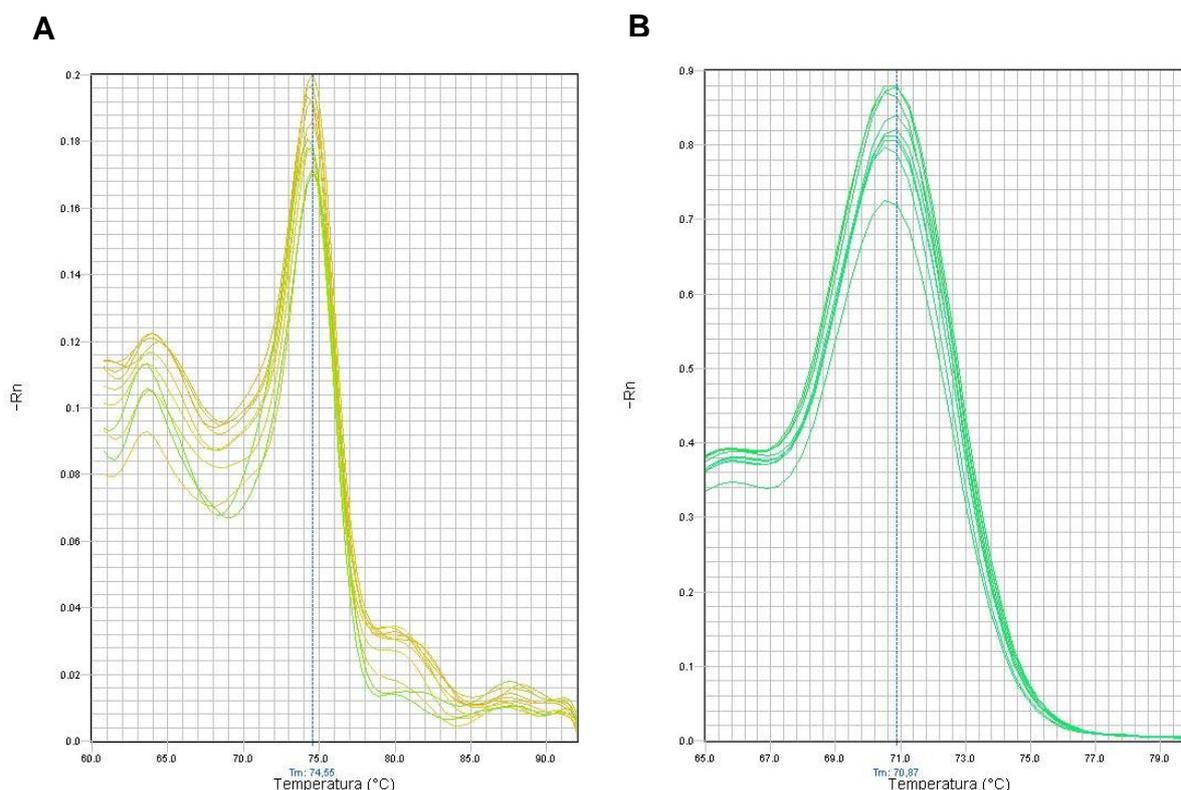


Figura 17. Curva de desnaturação para o gene precursor da tripsina (A) e pepsina (B). No eixo Y está representada a fluorescência emitida durante o aumento da temperatura e no eixo X a variação de temperatura. Cada linha da curva representa uma amostra submetida a qRT-PCR.

Essa curva consiste na elevação gradual da temperatura de incubação das amostras, logo após o término dos ciclos de reação de PCR. Na medida em que se aumenta a temperatura ocorre desnaturação (ou separação) gradual das fitas de DNA formadas durante a amplificação. A desnaturação ocorrerá em

temperaturas distintas, de acordo com o tamanho do amplicon. Uma vez que o corante fluoróforo SYBR Green só emite fluorescência quando intercalado na fita dupla de DNA, conforme as fitas de DNA vão se separando, o sinal de fluorescência captado será menor, até parar por completo. Desse modo, para que a amplificação seja específica, um pico deve ser observado no gráfico gerado pela curva de desnaturação, como observado nos nossos resultados (Figura 17). O programa de análise do termociclador converte o sinal emitido para valores positivos, permitindo a melhor visualização dos dados na forma de gráfico. A figura 18 mostra um único produto amplificado na reação de qRT-PCR.

3.2. Eficiência de amplificação

Os valores de (E) obtidos para cada gene foram utilizados para o cálculo da expressão relativa e podem ser visualizados na tabela 3. As análises de regressão revelaram valores acima de 0,95 para R^2 demonstrando a existência de uma relação linear entre a quantidade de amostra utilizada e os valores de Ct (Figuras 19 a 22). Segundo Wilkening & Bader (2004) a máxima eficiência possível na PCR é 2, ou seja, a cada ciclo da reação o produto de PCR é duplicado e um valor mínimo de 1 corresponde a nenhuma amplificação.



Figura 18. Análise da especificidade dos produtos de qRT-PCR em tempo real na fase platô. Eletroforese em gel de agarose 1 %/ EtBr em TAE 1X. Precursor de tripsina (A); precursor de pepsina (B) e gene constitutivo 18S (C). Linha 1 corresponde a amostras de embriões movimentando-se no ovo. Linhas 2 a 12 correspondem a larvas nos estágios de 1 até 120 horas após eclosão (de 12 em 12 horas). Linha 13 corresponde a larvas com 16 dias após eclosão. Linhas 14, 15 e 16 em (A) correspondem a intestinos de tambaqui com 30, 45 e 90 dias após eclosão. Linhas 14,15 e16 em (B) correspondem a estômagos de tambaqui com 30, 45 e 90 dias após eclosão. Linhas 14 a 16 (intestinos) e 17 a 19 (estômagos) em (C) correspondem a tambaquis com 30, 45 e 90 dias após eclosão, respectivamente.

Tabela 7. Valores obtidos a partir da análise de regressão linear, para cálculo da eficiência de amplificação (E). S: Coeficiente angular da reta; R^2 : coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,95$.

Gene	S	R^2	E
Tripsina	-3,28	0,99	1,99
18s ¹	-3,34	0,99	2,01
Pepsina	-3,53	0,98	1,91
18s ²	-3,13	0,99	2,08

⁽¹⁾ Intestino e ⁽²⁾ estômago de tambaqui.

3.3. Quantificação relativa da expressão gênica

Os dados de CTs obtidos a partir dos ensaios da qRT-PCR em tempo real para quantificação dos genes precursores de tripsina e pepsina foram utilizados para o cálculo da expressão relativa segundo método descrito por Pfaffl (2001). A partir desta análise que utiliza a (E) encontrada para cada amplicom bem como um gene constitutivo como referência, para normalizar diferenças acumuladas durante os procedimentos preliminares, foram gerados gráficos de expressão relativa para estes genes (Figuras 23 e 24).

Os gráficos mostraram que transcritos de tripsinogênio e pepsinogênio estiveram presentes nos primeiros estágios de desenvolvimento e antes da abertura da boca e início da alimentação exógena do tambaqui.

Transcritos amplificados de tripsinogênio foram detectados cedo, em larvas ainda movimentando-se na cápsula ovular. O tripsinogênio foi sintetizado com valores elevados de expressão em quatro momentos durante o desenvolvimento,

0, 1, 36 e 120 HAE, alcançando valor máximo de expressão em larvas com 36 HAE ($p < 0,05$) (Figura 23). Os outros estágios de desenvolvimento mostraram valores relativamente constantes de expressão. Entretanto, a atividade enzimática da tripsina descrita no primeiro capítulo não segue o mesmo padrão de variação. Brevemente, a atividade específica registrou seu valor mínimo em larvas com 1 HAE ($0,02 \pm 0,001$ U/mg de proteína) e aumento significativo até 108 HAE ($0,61 \pm 0,09$ U/mg de proteína) quando houve depleção de atividade até 16 DAE ($p < 0,05$). Em seguida, foi registrado novo aumento até a atividade alcançar o valor máximo em larvas com 45 DAE ($1,87 \pm 0,04$ U/mg de proteína) e seguida de nova depleção em juvenis com 90 DAE ($0,62 \pm 0,08$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$).

Transcritos do precursor da pepsina foram detectados em larvas de 1 HAE. A razão da expressão manteve-se constante até larvas com 24 HAE aumentando significativamente até valores máximos em larvas com 72 HAE e, finalmente, mostrando um decréscimo progressivo até valores mínimos em juvenis com 90 DAE ($p < 0,05$) (Figura 24). Da mesma forma, as atividades enzimáticas da pepsina descritas no primeiro capítulo seguem o mesmo padrão de variação. Brevemente, houve aumento gradativo até alcançar a máxima atividade em larvas 108 HAE ($2,431 \pm 0,108$ U/mg de proteína) e diminuindo, em seguida, até o valor mínimo aos 90 DAE ($0,422 \pm 0,003$ U/mg de proteína) ($p < 0,05$).

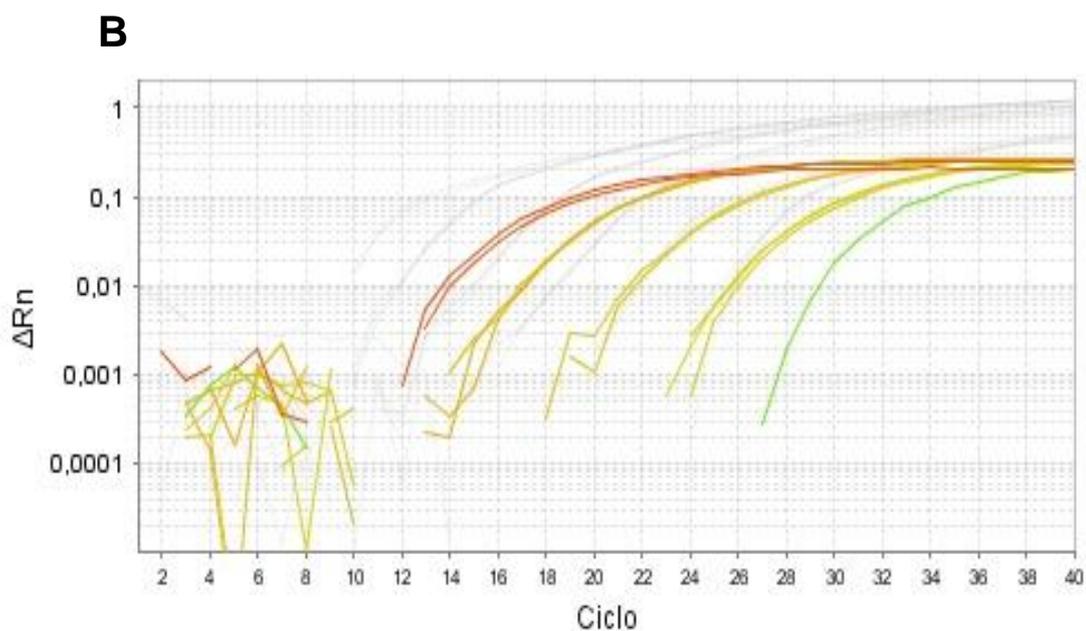
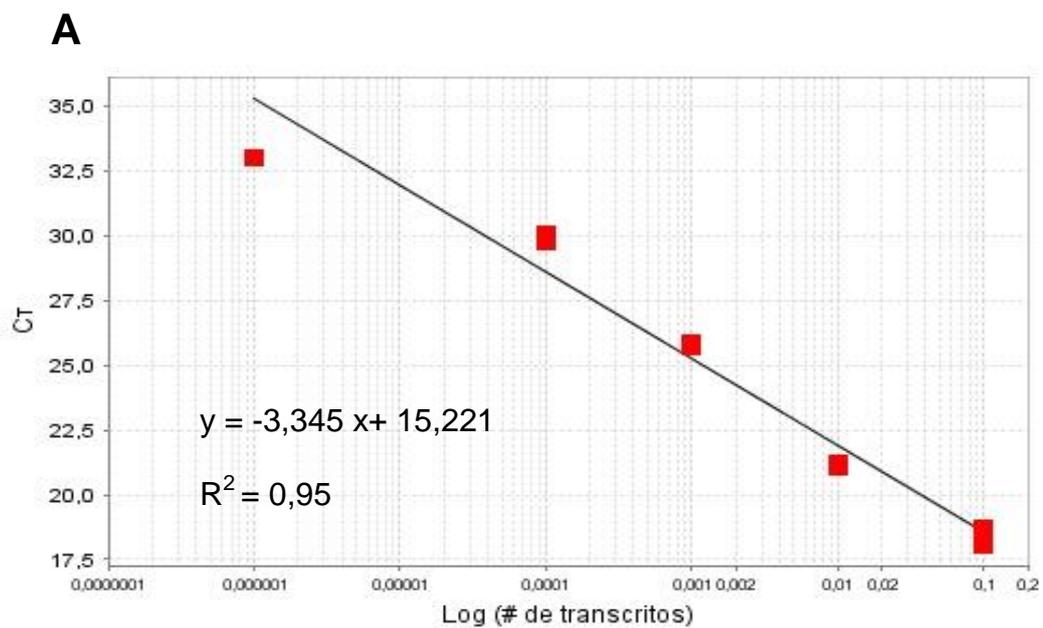


Figura 19. Curva padrão do tripsinogênio (em intestino de tambaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos. Cada linha da curva representa uma amostra submetida à qRT-PCR.

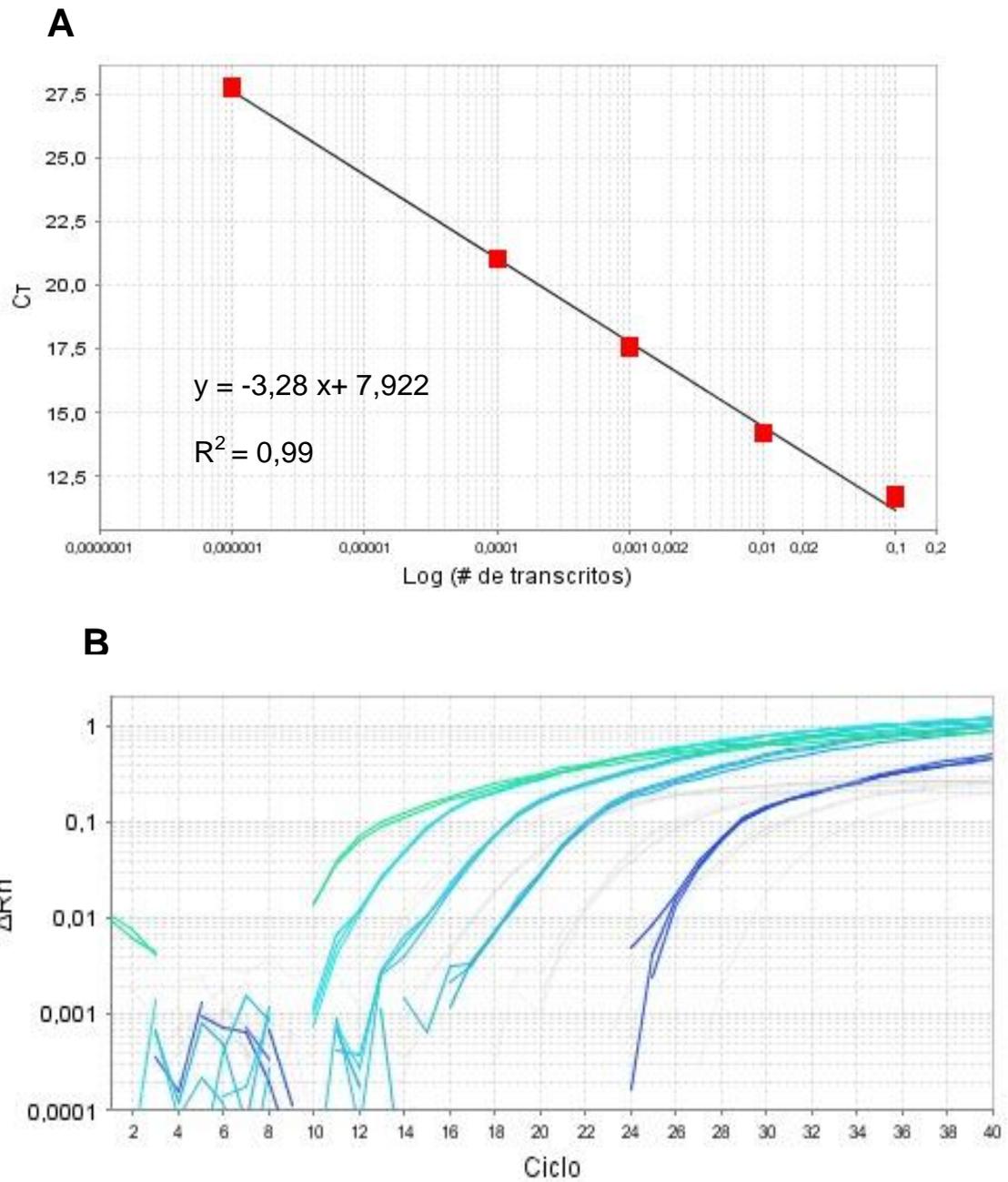


Figura 20. Curva padrão do 18S (em intestinos de tabaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos. Cada linha da curva representa uma amostra submetida à qRT-PCR.

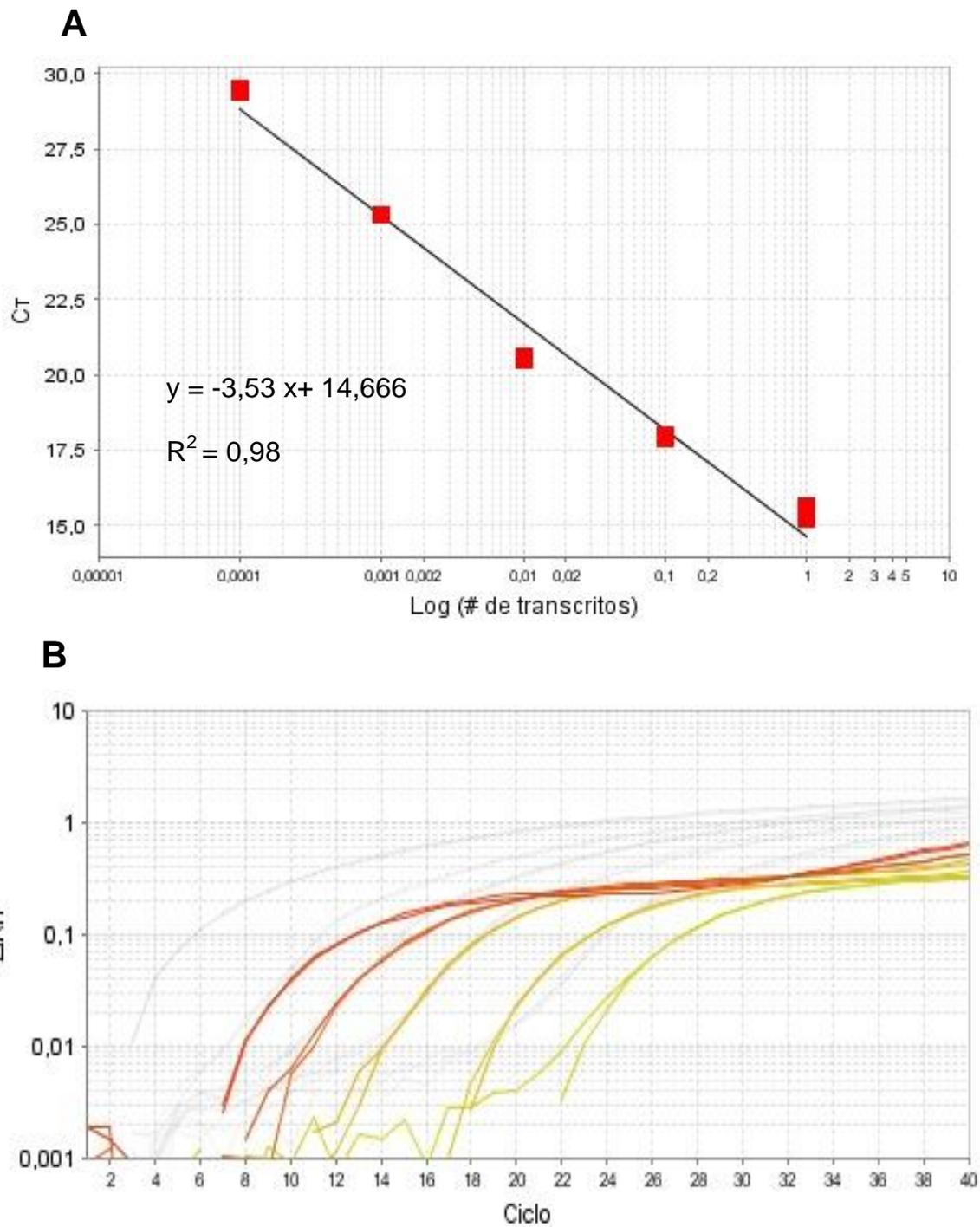
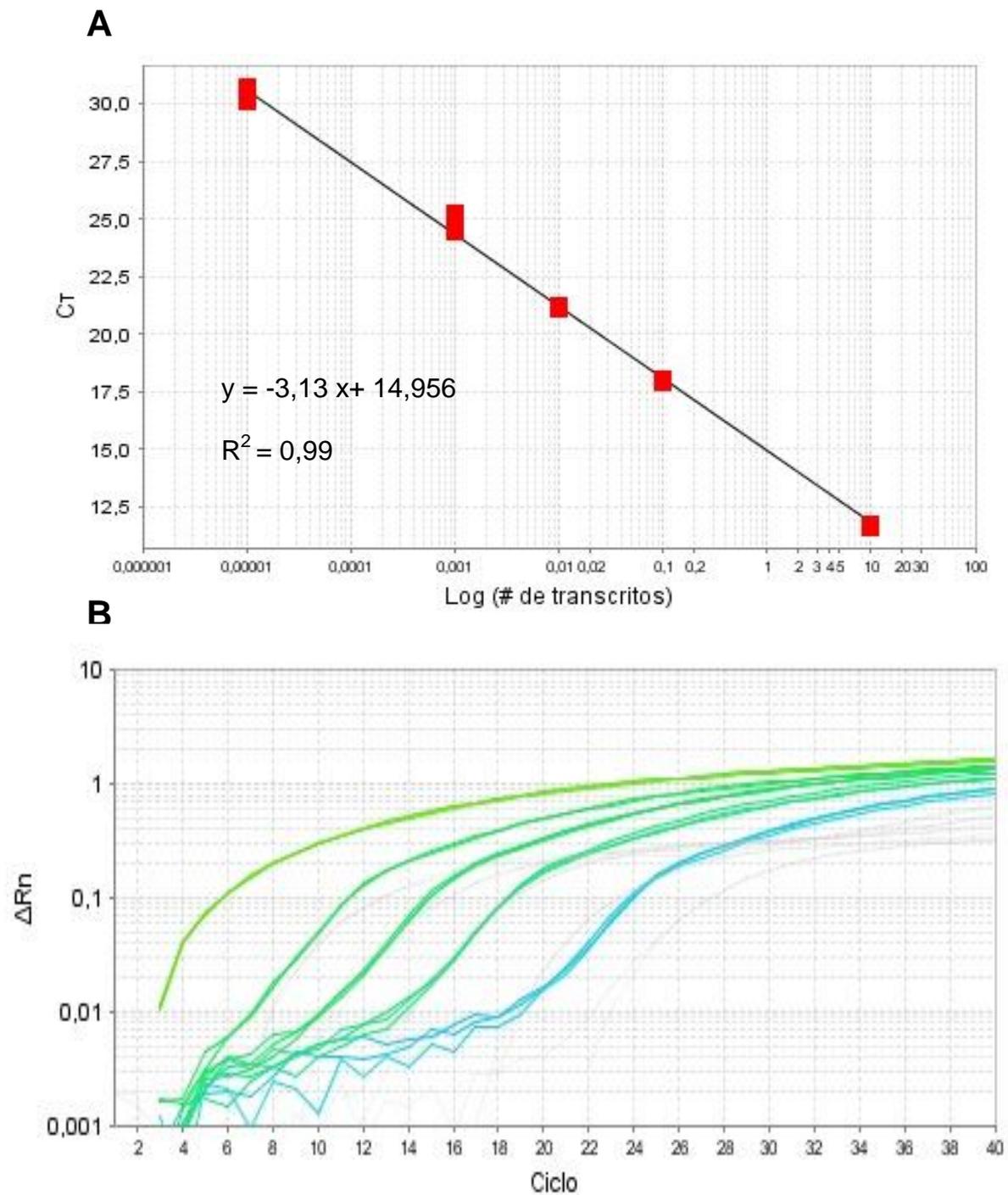


Figura 21. Curva padrão do pepsinogênio (em estômagos de tambaqui) gerada a partir dos valores de Ct e o log do número de transcritos. Cada linha da curva representa uma amostra submetida à qRT-PCR.



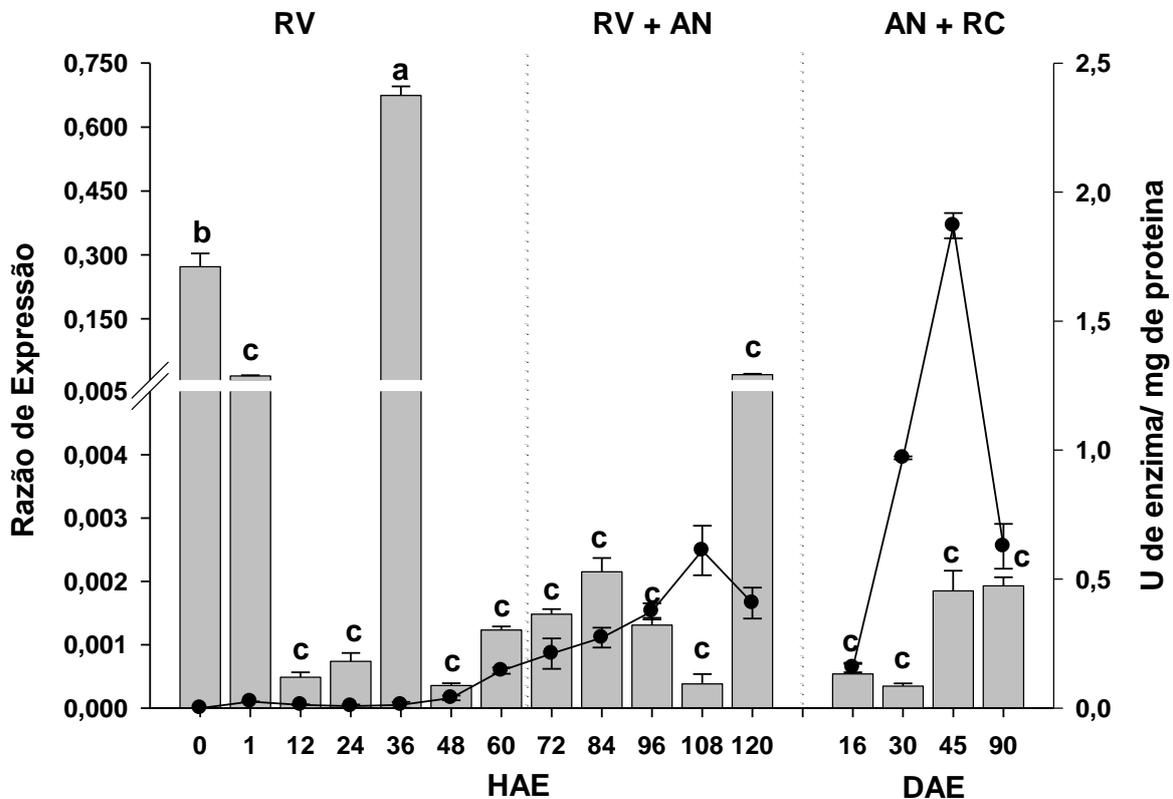


Figura 23. Razão da expressão de tripsinogênio entre larvas de tambaqui, *Colossoma macropomum* pouco antes da eclosão e larvas e juvenis entre 12HAE e 90DAE, normalizado para um gene de referência (18S). Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; NA: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A linha indica atividade enzimática da tripsina (Dados extraídos do capítulo 1).

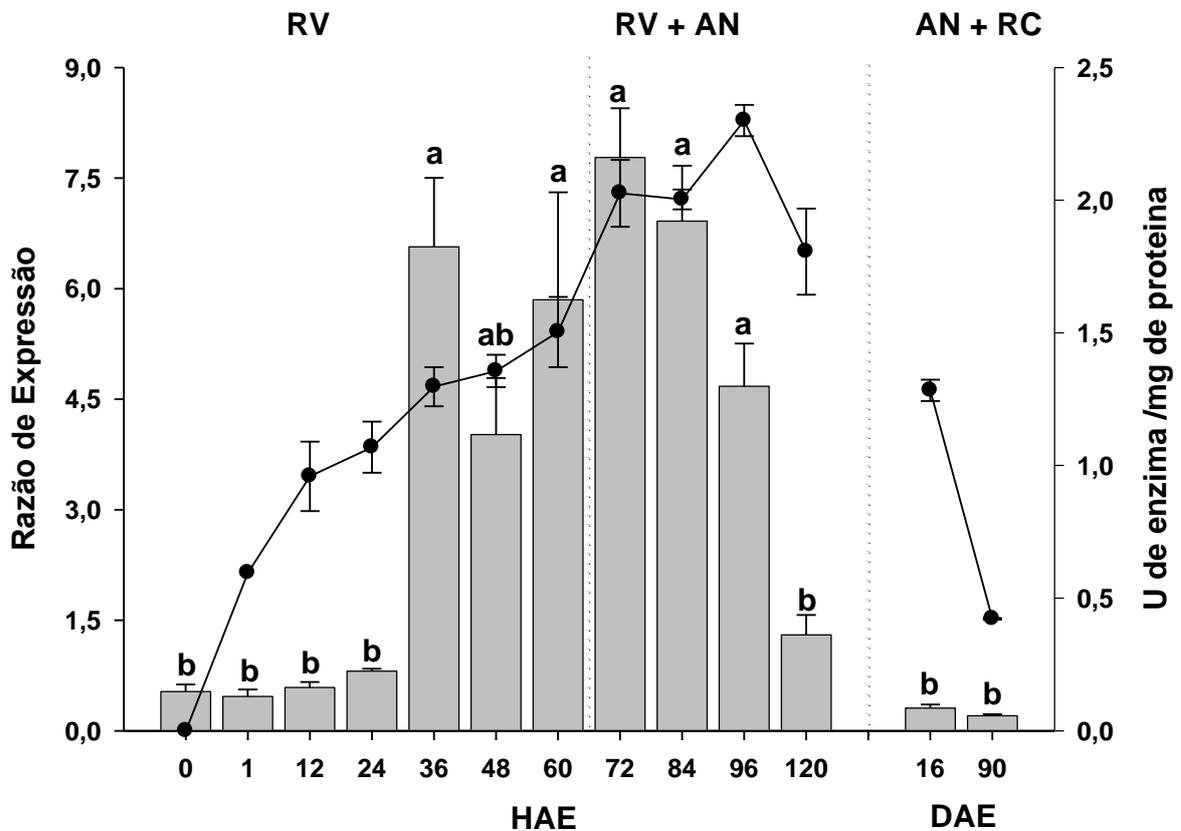


Figura 24. Razão da expressão de pepsinogênio entre larvas de tambaqui, *Colossoma macropomum* pouco antes da eclosão e larvas e juvenis entre 12HAE e 90DAE, normalizado para um gene de referência (18S). Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; NA: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A linha indica atividade enzimática de pepsina (Dados extraídos do capítulo 1).

4. DISCUSSÃO

A análise das sequências obtidas para tripsinogênio e pepsinogênio do tambaqui indicou um alto grau de similaridade com genes de outras espécies publicadas no banco de dados do NCBI. A sequência de pepsinogênio é homologa (>75%) às isoformas 1A e 3A de *Siniperca chuatsi* e *Trematomus bernachii*, respectivamente. Por outro lado, a sequência de tripsinogênio do tambaqui é homologa (>85%) às isoformas 1A, 1B e 1C do tripsinogênio de outras espécies de peixes (Tabela 5). Lo & Weng (2006) encontraram homologias de 81-88% para as isoformas A1 e A2 de pepsinogênio, de 88-96% para tripsinogênio e de 84-89% para a isoforma A2 de quimiotripsinogênio de tilápia, *Oreochromis mossambicus*, com outras espécies de peixes. Estes resultados indicam que as sequências conhecidas de nucleotídeos de pepsinogênio e tripsinogênio das espécies de peixes, incluindo o tambaqui, são altamente conservadas.

Os precursores das principais enzimas proteolíticas do tambaqui, tripsina e pepsina, são expressos em estágios iniciais do desenvolvimento, mesmo antes da eclosão. Já, o padrão de expressão de tripsinogênio durante o desenvolvimento ontogenético de *C. macropomum* não corresponde à atividade enzimática da tripsina indicando regulação pós transcricional desta enzima. Atividades das enzimas digestivas em peixes são afetadas pelo comportamento alimentar, controle genético, morfologia do trato gastrointestinal e nível trófico (Peres *et al.*, 1998; López-Vásquez *et al.*, 2009). Apesar disso, algumas evidências apontam a modulação da atividade enzimática pela composição da dieta, isto é, quantidade e natureza da proteína, pelo menos durante os estágios larvais (Kuz'mina, 1996; Jones *et al.*, 1997; Péres *et al.*, 1998). Wang *et al.* (2006), ao trabalhar com larvas

de bagre amarelo *Pelteobagrus fulvidraco*, descobriram que os níveis de proteína da dieta afetam significativamente a atividade e o nível de mRNA que codifica tripsinogênio.

A falta de correlação entre quantidade de mRNA que codifica tripsinogênio e atividade enzimática da tripsina pode estar relacionada às diferenças na regulação após a transcrição da enzima. No caso do tambaqui nem todos os mRNA de tripsinogênio devem ter sido traduzidos para tripsinogênio, de forma a ficar disponível para ativação da tripsina, devido aos transcritos serem sujeitos à degradação no citosol (McNurlan & Garlick, 2000).

Os fatores pós transcricionais que podem estar afetando a atividade enzimática podem ser devidos às modificações do mRNA que levam a uma tradução diferenciada dentro de um tecido ou devidos às modificações após a tradução, as quais alteram a estabilidade e funcionabilidade da proteína..Desta forma, faz-se necessária a determinação dos níveis teciduais de tripsinogênio durante a ontogenia do tambaqui para podermos identificar precisamente em que momento ocorre a regulação após transcrição.

Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica são muito complexos e atuam em varios níveis. Péres *et al.* (1998), ao trabalhar com robalo europeu, *D. labrax* verificaram que a tripsina é modulada pela quantidade e pela qualidade da proteína da dieta tanto no nível de transcrição como no de tradução. De fato, alguns estudos sugerem que certas quantidades de mRNA nunca são traduzidas em proteínas e que as mudanças observadas na concentração de mRNAs podem ou não resultar em relevantes mudanças na concentração da

enzima, dependendo da eficiência e fidelidade de tradução do mRNA (Kozac, 1994).

Neste trabalho, o tambaqui apresenta um elevado número de transcritos de tripsinogênio em embriões dentro da cápsula ovular pouco antes da eclosão. Esse número diminui significativamente na primeira hora após eclosão, enquanto que a atividade enzimática é encontrada apenas uma hora após eclosão.

A expressão do precursor de tripsina durante o desenvolvimento ontogenético varia de espécie para espécie. Kurokawa *et al.* (2002), ao analisarem a expressão das enzimas pancreáticas na enguia japonesa, *Anguilla japonica*, detectaram os primeiros sinais seis dias após eclosão. Entretanto, García-Gasca *et al.* (2006) encontraram transcritos de tripsina em embriões de *Spherooides annulatus* 24 horas após a fertilização, enquanto que a atividade enzimática foi detectada dois dias após eclosão quando o pâncreas e o intestino começaram o processo de diferenciação. Já Sveinsdóttir *et al.* (2006) estudaram o papel das tripsinas e quimiotripsinas no desenvolvimento embrionário do bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, e encontraram atividades elevadas de tripsina e quimiotripsina em ovos recém fertilizados, que com o desenvolvimento ontogenético, perderam gradualmente sua atividade.

Diversos fatores podem influenciar o incremento de mRNA transcrito, incluindo a taxa de transcrição do gene, a eficiência de processamento do transcrito primário e a estabilidade do mRNA no citoplasma da célula (Huvet *et al.*, 2003). Por outro lado, o número elevado de transcritos pode resultar dos mRNAs que codificam tripsinogênio de procedência materna, os quais são depositados nos ovócitos e transferidos para os ovos fertilizados. A depleção deste número em

estágios subsequentes é devida à diminuição deste mRNA materno até os estágios nos quais a larva é capaz de expressar seu próprio mRNA que codifica estas enzimas, garantindo a utilização da reserva vitelínica (Gilbert, 1997). Esta teoria poderia explicar os resultados obtidos para o tambaqui. No entanto, não determinamos a expressão gênica do precursor da tripsina em estágios anteriores, para que a mesma possa ser completamente aceita. Ainda, essa hipótese não explica os picos de expressão de tripsinogênio em 36 e 120 HAE. Uma explicação plausível para esses aumentos seria a transcrição de outras formas de tripsinogênio com função específica durante o desenvolvimento do tambaqui, o que não poderia ser detectado no nosso estudo por termos amplificado uma região conservada dentro da família das tripsinas.

A complexidade do genoma dos eucariontes com relação aos procariontes tem sido amplamente comprovada. Enquanto a maioria dos genes em procariontes é simples, uma grande proporção de genes eucariontes é hierarquicamente organizada dentro de famílias e superfamílias, compreendendo vários genes parálogos produzidos por duplicação gênica (Ohta, 1989). Uma família de genes é definida como um grupo de genes que compartilha similaridade em seus aminoácidos, maior do que 50%, enquanto que a superfamília inclui genes que apresentam baixa similaridade, mas são capazes de formar um set de sequências alinháveis.

Pesquisas com linguado americano, *P.americanus* (Murray *et al.*, 2004) e salmão do atlântico, *S. salar* (Rungruansak-Torrissen *et al.*, 1998), têm mostrado a existência de uma variedade de tripsinas produzidas durante o período de

desenvolvimento e sob diferentes temperaturas do meio ambiente, o que sugere que a função das tripsinas é específica do estágio ontogenético.

O padrão de expressão do pepsinogênio durante o desenvolvimento ontogenético do tambaqui, *C. macropomum*, corresponde à atividade enzimática da pepsina, indicando regulação traducional desta enzima. Da mesma forma que a tripsina, a pepsina pode ser encontrada em larvas ainda se movimentando na cápsula ovular, embora o número de transcritos encontrados tenha sido bem menor nos primeiros estágios e tenha aumentando significativamente apenas com 36 HAE.

O início da função gástrica é importante por uma série de razões que incluem a mudança da digestão intracelular das proteínas no intestino para uma digestão extracelular mais eficiente no lúmen do estômago (Govoni *et al.*, 1986) e, mais recentemente, como proteção para gastroenterite bacteriana (Kim *et al.*, 2004).

Darias *et al.* (2005), utilizando a técnica de hibridização *in situ*, detectaram os primeiros sinais de expressão de pepsinogênio em larvas de “red porgy” *Pagrus pagrus* 30 dias após eclosão, os quais aumentaram gradativamente até alcançar um pico de expressão entre 40 e 50 dias após eclosão. Por outro lado, estudos realizados por Douglas *et al.* (1999) com linguado marinho, *Pleuronectes americanus* mostraram, que a expressão da pepsina ocorre antes mesmo da diferenciação histológica das glândulas gástricas aproximadamente 80 dias após eclosão.

Huang *et al.* (1998) avaliaram o aparecimento de pepsinogênio em larvas de “summer flounder” utilizando imunohistoquímica. Esses autores encontraram produção de pepsinogênio uma semana após a formação das células gástricas.

Alguns trabalhos têm relatado que o tempo de ativação de pepsinogênio para pepsina é espécie específica e varia entre isoformas da mesma espécie (Wu *et al.*, 2009; Tanji *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). Geralmente, a conversão de pepsinogênio na forma ativa pepsina ocorre por duas vias: a primeira, diretamente pela liberação do sítio ativo, e a segunda, pela atuação da forma intermediária da pepsina (pseudopepsina) (Kageyama, 2002). Como exemplo, podemos citar *Anguilla anguilla*, que apresenta o tempo de 5 segundos para a ativação do pepsinogênio do tipo I, enquanto é necessário um minuto (60 segundos) para ativação das pepsinas do tipo II e III (Wu *et al.*, 2009). A completa ativação do pepsinogênio III ocorre apenas após 15 minutos, enquanto, que para as isoformas I e II ocorreram em intervalos menores de tempo.

Wu *et al.* (2009) identificaram e caracterizaram três pepsinogênios no estômago da enguia europeia, *A. anguilla*. Esses autores encontraram que a massa molecular e as pepsinas correspondentes nos três tipos de pepsinogênios eram similares sendo, entretanto, diferentes em suas características enzimáticas.

Ainda se desconhece porque diferentes isoformas de pepsinogênios e pepsinas existem no estômago de diferentes espécies de animais.

Provavelmente, múltiplos pepsinogênios poderiam ser uma vantagem para a digestão de diferentes alimentos, ao mesmo tempo em que múltiplas pepsinas poderiam aumentar a eficiência de utilização dos amino ácidos das proteínas, o que resultaria num ótimo crescimento e desenvolvimento muscular. Futuros

trabalhos são necessários para determinar a existência de diferentes pepsinogênios no estômago do tambaqui e se estes são produtos de diferentes genes ou resultado de modificações pós-traducionais, tais como, fosforilação, glicosilação, transformações essas que geram uma variedade de pepsinogênios com características catalíticas bem diferentes. Estudos de zimograma poderiam ajudar a estabelecer se, de fato, o tambaqui apresenta diferentes isozimas de pepsina as quais atuariam de forma diferenciada durante o desenvolvimento ontogenético, explicando o fato de apresentarem atividade de pepsina mesmo antes da completa formação do estômago.

Os dados apresentados aqui mostraram a habilidade do tambaqui em expressar os genes das principais enzimas proteolíticas durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário e larval indicando o grau de funcionabilidade do trato gastrointestinal livre de interferências inerentes aos ensaios bioquímicos. Entretanto, é necessário que novos estudos sejam delineados, tanto em nível molecular quanto em nível bioquímico para que possamos compreender os processos regulatórios que determinam tal habilidade.

5. CONCLUSÕES

1. A expressão gênica do tripsinogênio e pepsinogênio nos primeiros estágios de desenvolvimento indicam que o tambaqui possui a função digestiva bem equilibrada e precoce.
2. O tambaqui possui elevada expressão de tripsinogênio em estágios que precedem a abertura da boca e início da alimentação exógena (0, 1 e 36 horas após eclosão).
3. O tambaqui possui elevada expressão de tripsinogênio em estágios que precedem a mudança de alimento vivo para alimento formulado (120 horas após eclosão).
4. A expressão de tripsinogênio e a atividade enzimática da tripsina, não apresentam o mesmo padrão de comportamento durante o desenvolvimento ontogenético do tambaqui, indicando regulação pós-transcricional desta enzima.
5. O tambaqui apresenta baixos níveis de expressão de pepsinogênio nas primeiras 24 horas após eclosão, antes da formação completa do estômago, e aumenta gradativamente até pouco depois da abertura da boca e início da alimentação exógena, sugerindo a importância desta enzima na degradação das proteínas nos primeiros estágios de desenvolvimento.
6. A expressão de pepsinogênio em larvas com 120 DAE e juvenis foi menor quando comparada à expressão em estágios anteriores, o que sugere a modulação desta enzima no nível traducional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alliot, E.; Pastoureaud, A. and Trelu, J., 1980. Evolution des activités enzymatiques dans le tractus digestif au cours de la vie larvaire de la Sole. Variation des protéinogrammes et des zymogrammes. *Biochem. Syst. Ecol.* 8:441-445.
- Almeida, L.C.; Lundstedt, L.M. and Moraes, G. 2006. Digestive enzyme responses of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition.* 12: 443- 450.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. and Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in amazonian fishes: status of an under-explorer biological “goldmine”. *In:* Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M. & Van den Thilart, G. (Eds). *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation.* CRC Press, Boca Ratón. pp.438-445.
- Almeida-Val, V.M.F. and Val, A.L. 1995. Adaptação de peixes aos ambientes de criação. *In:* Val, A.L. & Honczaryk, A. (Eds). *Criando peixes na Amazônia.* Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus, Amazonas, BRASIL. pp.45-59.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. and Walker, I. 1999. Long- and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interespecific variation. *In:* A.L.Val and V.M.F.Almeida-Val (Eds). *Biology of Tropical Fishes.*..Manaus, INPA. pp 185-206.
- Altschul, S.F.; Madden, T.I.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.;Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Alvarez-González, C.A.; Cervantes-Trujano, M.;Tovar-Ramírez, D.; Conklin, D.E.; Nolasco, H.; Gisbert, E. and Piedrahita R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol. Biochem.*31, 83-93.
- Alves, H. J. 2004. *Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte.* Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 103pp.
- Applenbaum, S.L. and Holt, G.J. 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mar. Biol.* 142: 1159-1167.

- Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, J.P. & Holt, G.J. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiol. Biochem.* 25:291-300.
- Applied Biosystems. 2007. *Expressão gênica empregando PCR quantitativo*. ABI Expert Training Center, São Paulo. 70p.
- Amber, R.P. 1972. Carboxipeptidase A and B. *Methods Enzymology.* 25B:261-272.
- Anderson, A.J. and Lipovsek, Z.S. 1996. Nutritional implications of digestive enzymes activity in silver perch (*Bidyanus bidyanus*). In: World Aquaculture 96' Book of abstracts. Bangkok, Thailand, 29 January –2 February ,1996. 498pp.
- Araújo-Lima, C. and Goulding, M. 1997. *So fruitful a fish. Ecology, conservation and aquaculture of the amazon's Tambaqui*. Columbia University Press, N. Y., USA. 191p.
- Baglole, C.J.; Murray, H.M.; Goff, G.P. and Wright, G.M. 1997. Ontogeny of digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light micro-scopic and mucous histochemical study. *J. Fish Biol.* 51:120-134.
- Baglole, C.J.; Goff, G.P and Wright, G.M.1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *J.Fish Biol.* 53:767-784.
- Baldisserotto, B. 2009. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. UFSM Ed., Santa Maria RS.Brasil. 211 p.
- Baragi, V. and Lovell, R.T. 1986. digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Amer. Fish Soc.* 115:478-484.
- Barnard, E. A. 1973. Comparative Biochemistry and physiology of digestion. In: Prosser, C.L. (editor). *Comparative Animal Physiology*. Academic Press, New York, NY. pp. 133-164.
- Batista, V. da S. 1998. *Distribuição, dinâmica da frota e dos recursos pesqueiros da Amazônia Central*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. 291 p.
- Bayley, P.B. & Petre Jr, M. 1989. Amazon fisheries: assessment methods current status and management options. *Can. Spec. Publi. Aquat.*, 106:385-398.
- Bisbal, G.A. and Bengtson, D.A. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder, *J. Fish.Biol.* 47:277-291.
- Borlongan, I.G. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture.* 89:315-325.

- Buchet, V.; Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C.L., 2000. Effect of lipid level in compound diet on development of red drum (*Scianops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*. 184:339-347.
- Buddington, R.K.; Kroghdahl, Å. and Bakke-McKellep, A.M. 1997. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiol. Scand.* 161: 67-80.
- Cahu C.I., Zambonino Infante, J.I. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* .4(6):431-437.
- Cahu, C.; Ronnestad, I.; Grangier, V. and Zambonino-Infante, J.L. 2004. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*. 238:295-308.
- Cara, J.B.; Moyano, F.J.; Cárdenas, S.; Fernández-Díaz, C. & Yúferas, M. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of White bream. *J.Fish Biol.*63:48-58.
- Cara Torres, J.B.; Moyano, F.J.; Fernández Dias, C. and Yúfera, M. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvário del sargo (*Diplodus sargus*). In: Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA). 1., 2002. Resumos disponibles em <http://www.civa2002.org>: p. 110-121.
- Carter, C., Houlihan, D., Kiessling, A., Médale, F. & Jobling, M. 2001. Physiological effects of feeding. In: Houlihan, D., Boujard, T. & Jobling, M. (Eds.). *Food Intake in Fish*. Blackwell Science, Oxford, UK. pp. 297–331.
- Castagnolli, N. 1992. Piscicultura de água doce. Jaboticabal. FUNEP. 189pp.
- Chabalín, E.; Ferrari, V.A.; Gaspar, L.A. & Lucas, A. F. B. 1993. Custo de formação de reprodutores de tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, em monocultura experimental. *B. Téc. CEPTA*, 6(1): 59-67.
- Chakrabarti, R.; Rathore, R.M. and Kumar, S. 2006. Study of the digestive enzymes activities and partial characterization of digestive proteases in freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquaculture nutrition* 12, 35-43.
- Chakrabarti, I.; Gani, M.D.A.; Chaki, K.K.; Sur, R. and Misra, K.K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habitat and nich segregation. *Comp.Biochem.Physiol.*112:167-177.
- Chen, B.N.; Qin, J.G.; Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. and Clarke, S.M. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*. 260:364-271.

- Chong, A.; Hashim, R.; Lee, L. and Ali, A.B. 2002. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodum aequifasciata* larva. *Aquaculture Nutrition*. 33: 663-672.
- Corrêa, C.F. 2002. Estudo dos padrões de digestão enzimática e perfil metabólico em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) alimentado com diferentes teores de proteína e carboidrato em regime de confinamento. Tese (Doutorado)- São Carlos: UFSCar. 115p.
- Costa, O.T.F.; Ferreira, G.J.S.; Mendonça, F.L.P. and Fernádes, M.N. 2004. Suceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*. 232(1-4):627-636.
- Cousin, J.C.B. and Baudin-Laurencin, F. 1985. Morphogenèse de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus*.L. *Aquaculture*. 47:305-319.
- Cousin, J.C.B.; Baudin-Laurencin, F.; Gabaudan, J. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus*.L. *J. Fish Biol.* 30:15-33.
- Cuvier Péres, A. and Kestemont, P. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol. Biochem.* 24:279-285.
- Dahlqvist, A. 1961. Determination of maltase and isomaltase activities with a Glucose-Oxidase Reagent. *J. Biochem.* 80:547-551.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod.Nutr.Dev.* 24:807-833.
- Darias, M.J.; Murray, H.M.; Gallant, J.W.; Astola, A.; Douglas, S.E.; Yúfera, M. and Martínez-Rodríguez, G. 2006. Characterization of a partial α -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): expression during larval development. *Comp. Biochem.Physiol.* Part B 143: 209-218.
- Darias, M.J.; Murray, H.M.; Martínez-Rodríguez, G.; Cárdenas, S. and Yúfera, M. 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*).*Aquaculture*.248:245-252.
- Das, K.M. and Triphata, S.D. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp *Ctenopharingodon idella*. *Aquaculture*. 92:21-32.
- Donald, K.M.; Day, A.J.; Smerdon, G.R.; Cross, L.J. and Hawkins, 2003. Quantification of gene transcription and enzyme activity for functionally important proteolytic enzymes during early development in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Com.Biochem.Physiol.* 136:383-392.

- Douglas, S.E., Gallant, J.W., 1998. Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *J. Mar. Biotechnol.* 6: 214–219.
- Douglas, S.E.; Gawlicka, A.; Mandla, S. and Gallani, W. 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish. Biol.* 55:897-915.
- Douglas, S.E.; Mandla, S. and Gallant, J.W. 2000. Molecular analyses of the amylase gene and its expression during the development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture*.190:247-260.
- Einarsson, S. and Davies, P.S. 1997. A multiductal system conveys digestive enzymes from the pancreas into the intestine in the Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 50:1120-1123.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95:271-278.
- Evans, D.H. 1998. The physiology of fishes. CRC Press Boca Raton, New York. 517p.
- Fange, R. and Grove, D. 1979. Digestion. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. and Brett, J.R. (Editors). *Fish Physiology*, Vol 8. Academic Press, New York, NY. Pp 162-260.
- Falabella, P.G.R. 1994. *A pesca no estado do Amazonas: problemas e soluções*. Imprensa oficial do estado. Manaus, Amazonas, Brasil. 180p.
- Faulk, C.K.; Benninghoff, A. D. and Holt, G.J. 2007. Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *J. Fish Biol.* 70:567-583.
- Freeman, Z.J. 1995. Amazonian Aquatic resources, fishery management and Aquaculture development. Senior Thesis Woodrow Wilson School.123p.
- Gauthier, S.F.; Vachon, C.; Jones, J.D. and Savoi, L. 1982. Assessment of protein digestibility by in vitro enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis. *J. Nutr.* 112:1718-1725.
- Gawlicka, A.; Leggiadro, C.T.; Gallart, J.W. and Douglas, S.E. 2001. Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J Fish Biol.* 58:529-536.
- Gawlicka, A.; Parent, B.; Horn, M.; Ross, N; Opstad, I. and Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184:3003-314.

- Gawlicka, A.; The, S.J.; Hung, S.S.O.; Hilton, D.E. and Dela Noue, J. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiol Biochem.* 14:357-371.
- García-Carreño, F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization and the effect of feed on their composition. *Comp.Biochem. Physiol.* 103B: 575-578.
- García-Gasca, A.;Galaviz, M.A.;Gutierrez, J.N. and Garcia-Ortega, A. 2006. Development of the digestive tract, tripsina activity and gene expresión in eggs and larvae of the bullseye buffer fish *Sphoeroides annulatus*.*Aquaculture.* 251:366-376.
- Gilbson, U. E.; Heid, C. A. and Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RTPCR. *Gen Res. Woodbury.* 6: 995-1001.
- Gilbert, S.F., 1997. *Developmental Biology*, 5th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA. 461 pp.
- Gisbert, E.; Giménez, G.; Fernández, I.; Kotzamanis, Y. and Estevez, A. 2009. Development of digestive enzymes in common *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture.* 287:381-387.
- Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.;Bouillon, R. and Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR:Applications to quantify cytokine gene expression. *Meth.*25:386-401.
- Gjellesvik, D.R.; Raae, A.J. and Walther, B. T. 1989. Partial purification and characterization of a triglyceride lipase from cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*,Amsterdam. 79:177-184.
- Gjellesvik, D.R.; Lombardo, D. and Walther, B. T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochem Biosphys Acta.* 1124:123-134.
- Goulding, M.Z. and Carvalho, L.M. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): An important Amazonian food fish. *Rev. Bras. Zool.* 1(2): 107-133.
- Govoni J.J.; Boehlert, G.W. and Watanabe, Y.I. 1986.The physiology of digestion in fish larvae. *Environ Biol Fish.* 16:59-77.
- Goel, K.A. 1975.Histochemical study of the activity of acid and alkaline phosphatases and lipase in the gastrointestinal tract of *Cirrhinus migala*. *Act. Histochem* 54:49-55.
- Gudmundsdóttir,Á.; Gudmundsdóttir, E.; Óskarsson, S.; Bjarnason, J.B.; Eakin, A.K. and Craik, C.S. 1993. Isolation and characterization of cDNAs from Atlantic

- cod encoding two different forms of trypsinogen. *Eur. J. Biochem.* 217 (3):1091–1097.
- Hakim, Y., Uni, Z., Hulata, G., Harpaz, S., 2006. Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30% or 48% protein. *Aquaculture* 257: 420–428.
- Hepher, B. 1993. *Nutrición de peces comerciales en estanques*. University of Cambridge Press, Balderas, México. 406p.
- Higuchi, R. et al. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, New York, v. 11, p. 1026-1030.
- Hirji, K.N. and Courtney, W.A.M. 1982. Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Biol.* 21:615-622.
- Hoehne-Rietan, K.; Kjorsvik, E. and Retan, K.J. 2001. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. *J Fish Biol.* 58:746-754.
- Honczaryk, A. 1995. A reprodução de peixes em cativeiro. In: Val, A.L. and Honczaryk, A. (Eds). *Criando peixes na Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Manaus, Amazonas, BRASIL. p. 97-120.
- Hsu, Y.L. and Wu, J.L. 1979. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin.* 18:45-53.
- Huang, L.; Schreiber, A. M.; Soffientino, B.; Bengtson, D.A. and Specker, J.L. 1998. Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): thyroid status and the timing of gastric gland formation. *J. Exp. Zoo.* 280:413-420.
- Huvet, A.; Daniel, J.-Y.; Quéré, C.; Dubois, S.; Prudence, M.; Van Wormhoudt, A.; Sellos, D.; Samain, J.-F. and Moal, J. 2003. Tissue expression of two α -amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture*. 228:321–333.
- Izquierdo M. S. and Henderson R.J. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence based assays. *Fish Physiol Biochem.* 19:153 –162.
- Ismiño-Orbe, R.A.; Araújo-Lima, C.A.R.M.; Gomes, L.C. 2003. Excreção de amônia por Tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa de peixe. *Pesquisas Agropecuária Brasileira*. 38(10):1243-1247.
- Junk, W.J. 1984. Ecology, fisheries and fish culture in Amazonia. In: Sioli, H. (Ed). *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dordrecht, Dr. Junk Publishers, p.443-475.

Jobling, M. 1994. Fish bioenergetics. Chapman & Hall, London, UK. 309 pp.

Jones, D.A.; Kumlu, M.; Le Vay, L. and Fletcher, D.J. 1997. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture*.155:285-295.

Junk, W.J.; Bayley, P.B. and Sparks, R.E. 1984. The flood pulse concept in River-Floodplain systems, p. 110-127. *In* :Proceedings of the International large river Symposium. Vol. 106. Dodge, D.P. (ed.).*Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, Canada.

Kageyama, T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci.* 59:288–306.

Kawai, S. and Ikeda, S. 1972. Studies on the digestive enzymes of fishes. II. Effect of dietary changes on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Bull. Japan. Soc. Scent. Fish.* 38:265-270.

Kim, D.H.; Han, H.J.; Kim, S.M.; Lee, D.C. and Park, I.S., 2004. Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *J. Fish Dis.* 27, 497–505.

Kohla, U.; Saint-Paul, U.; Friebe, J.; Wernicke, D.; Hilge, V.; Braum, E. and Gropp, J. 1992. Growth, digestive enzymes activities and hepatic glycogen levels in juvenile *Colossoma macropomum* Cuvier from South America during feeding, starvation and refeeding. *Aquaculture and Fisheries Management.* 23(2):189-208.

Kolkowski, S.; Tandler, A.; Kissil, G.W. and Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzyme on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*12:203-209.

Kolodziejska, I. and Sikorski, Z.E. 1996. The digestive proteases of marine fish and invertebrates. *Bull. Sea Fish Inst.* 137(1): 51-56.

Koven, W.M.; Henderson, R.J. and Sargent, J.R. 1997. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): In-vivo and in-vitro studies of the lipolytic activity in various segments of the digestive tract. *Aquaculture*.155(1-4):155-171.

Kozak, M. 1994. Determinants of translational fidelity and efficiency in vertebrate mRNAs. *Biochimie.* 9: 815–821.

Kubitza, F. 2004. Coletânia de informações aplicadas ao cultivo do Tambaqui, do pacu e outros peixes redondos. *Panorama da Aquicultura.* 83:1-13.

Kumar, S. and Chakrabarti, R. 1998. Ontogenetic development of amylase activity in three species of Indian major carps, *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*, in relation to natural diet. *Asian Fish Soc.* 10:259-263.

Kurokawa, T.; Suzuki, T.; Ohta, H.; Kagawa, H.; Tanaka, H. and Unuma, T. 2002. Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish.Sci.* 68, 736–744.

Kurokawa, T. and Susuki, T. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of the digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 141:267-276.

Kurokawa, T. and Susuki, T. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 162: 113-124.

Kuz'mina, V.V. 1977. Peculiarities of membrana digestion in freshwater teleost. *Voprosy Ichthyologii*. 17:111-119.(in Russian).

Kuz'mina, V.V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148:25-37.

Kv°ale, A.; Mangor-Jensen, A.; Moren, M.;ESpe, M. and Hamre, K. 2007. Development and characterization of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture*: 264: 457-468.

Lazo, J.P.;Mendoza, R.;Holt, G.J.; Aguilera, C. and Arnold, C.R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Scianops ocellatus*). *Aquaculture*. 265 194-205.

Lazo, J.P.; Holt, G.J. and Arnold, C.R. 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition*.6:183-192.

Lagler, K.; Bardach, J.; Miller, R. and Passino, D. 1984. Reproducción. In: *Ictiología*. AGT Editores. México. P. 263-304.

Lemos, D; Hernández-Cortés, M.P.; Navarrete, A.; García-Carreño, F.L. and Phan, V.N. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Mar. Biol.* 135:653-662.

Lemos, D; García-Carreño, F.L.;Hernández-Cortés, P. and Navarrete del Toro, A.2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*.214:363-380.

Lijima, N.; Tanaka, S. and Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopâncreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol.Biochem*.18:59-69.

Lo, M.J. and Weng, C.F. 2006. Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*.261:1403-1412.

Lojda Z.; Gossrau R.; and Schiebler, T.H. 1979. *Enzyme Histochemistry: A Laboratory Manual*. New York: Springer-Verlag.

López-López, S.; Nolasco, H. and Vega-Villasante, F. 2003. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp.Biochem.Physiol*.135:337-347.

López-Vásquez, K.; Castro-Pérez, C.A. and Val, A.L. 2009. Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. *J Fish Biol*. 74:1620-1628.

López-Vásquez, K. 2001. Variação circadiana da atividade das enzimas digestivas amilase, maltase, protease e lipase em juvenis de tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (Characiformes, Serrasalminidae). Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. 55p.

Lovell, T. 1989. *Nutrition and feeding of fish*. Editorial Van Nostrand Reinhold, USA. 260p.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L.; Randall, R.J., 1951. Protein measurements with folin fenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193: 78-81.

Luizi, F.S.; Gara, B.; Shields, R.J. and Bromage, N.R. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and Artemia prey. *Aquaculture*. 176:101-116.

Ma, H.; Cahu, C.; Zambonino-Infante, J.L.; Ya, H.; Duana, Q.; Le Gall, M.M. and Ma, K. 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*. 245:239-248.

Mac Nurlan, M.A. and Garlich, P.J. 2000. Protein synthesis and degradation. In: *Biochemical and physiological aspect of human nutrition*. Stipanuk, M.H. Ed. Saunders Philadelphia. pp. 211-232.

Maroux, S.; Louvard, D. and Baratti, J. 1973. The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochim.Biophys. Acta*.321:282-295.

Martínez I.; Moyano F.J.; Fernández –Díaz, C. and Yúfera M.1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem*. 21:317-323.

- Mittelbach, G.C.; Osenberg, C.W. and Wainwright, P.C. 1999. Variation in feeding morphology between punkinseed populations: phenotypic plasticity or evolution?. *Evol. Ecol.Res.*1:111-128.
- Morais, S.; Cahu, C.; Zambonino-Infante, J.; Robin, J.; Ronnestad, I.; Dinis, M.T. and Conceição, L.E.C. 2004. Dietary TAG source levels affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids*. 39:449-458.
- Moriarty, D.J.W. 1973. The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid fish, *Tilapia nilotica*. *J. Zool. (Lond.)*.171:25-39.
- Moyano, F.J.; Barros, A.M.; Prieto, A.; Cañavate, J.P. and Cádenas, S. 2005. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas em larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces:Sparidae). *Revista AquaTIC* 22: 39-47.
- Moyano, F.J.; Diaz, M.; Alarcón, F.J. and Sarasquete, M.C. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream *Sparus aurata*.*Fish Physiol. Biochem.*15:121-130.
- Moyano F.J. and Sarasquete M.C. 1993. A screening on some digestive enzyme activities of gilthead seabream (*Sparus aurata* larvae) *World Aquaculture'93*. Special Publication.
- Murray, H.M.; Gallant, J.W.; Johnson, S.C. and Douglas, S.E. 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hipoglossus hipoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*.252:394-408.
- Murray, H.M.; Perez-Casanova, J.C.; Gallant, J.W.; Johnson, S.C. and Douglas, S.E. 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comp. Biochem. Physiol:* 138: 53–59.
- Murray, H.M., Gallant, J.W., Perez-Casanova, J.C., Johnson, S.C. and Douglas, S.E., 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *J. Fish Biol.* 62: 816–833.
- Murray, H.M.; Pérez-Casanova, J.C.; Gallant, J.W.; Douglas, S. and Johnson, S.C. 2000. Digestive enzyme expression in the exocrine pancreas during the ontogeny of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). V Fish Biology Congress Proceedings.
- Nagase, G. 1964. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambica* Peters. Digestive enzymes and the effects of diets on their activity. *Z. Vergl. Physiol.* 49:270-284.
- Núñez, J.M. and Salaya, J. 1984. Cultivo de la cachama, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818, en jaulas flotantes no rígidas en la represa de

Guanapito, Edo. Guarico, Venezuela. *Mems. Asoc. Latinoam. Acuicult.*, 5(3):481-494.

O'Connell, A.R.; Lee, B.W. and Stenson-Cox, C. 2006. Caspase-dependant activation of chymotrypsin-like proteases mediates nuclear events during Jurkat T cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 608–616.

Oozeki, Y. and Bailey, K. M. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Mar Biol.*122:177-186.

Ohta, T., 1989. Role of gene duplication in evolution. *Genome.* 31:304– 310.

Pereira-Filho, M. 1995. Nutrição de peixes em cativeiro. In: Val, A.L. & Honczaryk, A. (Eds). *Criando peixes na Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, BRASIL. p.61-74.

Péres, A., Cahu, C.L.; Zambonino-Infante, J.L.; Legall, M.M. and Quazuguel, P. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15:237-242.

Péres, A., Zambonino-Infante, J.L and Cahu, C.L. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19:145-152.

Pérez-Casanova, J.C.; Murray, H.M; Gallant, J.W.; Ross, N.W.; Douglas, S.E. and Johnson, S.C. 2006. Developmental of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 251, 377-401.

Person-Le Ruyet, J. 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. *Advances in Tropical Aquaculture*, Tahiti Feb. 20-march 4. IFREMER, *actes de Colloque brest France.* 9:625-642.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(900):2002-2007.

Picos-García, C; García-Carreño, F.L. and Serviere-Zaragoza, E. 2000. Digestive protease in juvenile Mexican green abalone, *Haliotis fulgens*. *Aquaculture.* 181:157-170.

Portella, M. C. ; Tesser, M. B.; Cameiro, D. J.; Pizauro Junior, J. M. 2002. Determinação da atividade enzimática em diferentes regiões do sistema digestório de *Pseudoplatystoma fasciatum*. In: XII Simposio Brasileiro de Aqüicultura,, Goiania. Anais do XII Simposio Brasileiro de Aqüicultura, 2002. v. 1. p. 038-038.

Ray, A.K. 1988. On the digestive enzymes in three indian freshwater perches in relation to food and feeding habits. *J. Inland Fish Soc.* 20(1):1-5.

Ribeiro, L.; Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.; and Dinis, M.T. 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed artemia and compound diet. *Fish Physiol. Biochem.* 27:61-69.

Ribeiro, F.A.L.T. and Jones, D.A. 2000. Growth and ontogenetic change in activities of digestive enzymes in *Fennero Penaeus indicus* postlarvae. *Aquaculture Nutrition.* 6:53-64.

Ribeiro, L.; Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C and Dinis, M.T.1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup, 1858. *Aquaculture.* 179:465-473.

Rick, W. 1965. Trypsin and chymotrypsin. In: *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H.U. (Ed.). Academic Press, New York and London, p.800.

Rolim, P. R. 1995. A infra-estrutura básica para criação de peixes no Amazonas, In Val, A.L. and Honczaryk, A. (Ed.) Criando Peixes na Amazônia. INPA, Manaus. P 7-16.

Rotta, M. A. 2003. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Corumbá: Documentos Embrapa Pantanal 48 p.

Rungruansak-Torrissen, K.; Pringle, G.M.; Moss, R. and Houlihan, D.F. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 19:247–255.

Sargent, J.R.; Henderson, R.J.; & Tocher, D.R. 1989. The lipids. In: Halver, J.R. Ed Fish Nutrition.. pp.153-218. New York:Academic Press.

Saint-Paul, U. 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae. *Environ. Biol. of Fishes.* 11(1):53-62.

Saint-Paul, U. 1986. Potential for aquaculture of South America freshwater fish: A review. *Aquaculture*, 54:205-240.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 2002. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory , New York.

Sastry, K.V. 1974. Distribution of lipase in the digestive system of two teleost fishes. *Act. Histochem*, 48:320-325.

Sedgwick, R.W. 1979. Effect of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis*. *Aquaculture.* 16(4): 279-298.

- Seixa Filho, J.T.; Oliveira, M.G.A.; Donzele, J.L.; Gomidae, A.T.M. and Menin, E. 1999. Atividade de amilase em quimo de três espécies de peixes Teleostei de água doce. *Ver.Bras. Zootc.*28(5):907-913.
- Segner, H.; Rosch, R.; Schmidt, H. and Poeppinghausen, K.J. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* 35:249-263.
- Segner, H.; Storch, V.; Reinecke, M.; Kloas, W. and Hanke, W. 1995. A tabular overview of organogenesis in larval turbot (*Scophthalmus maximus*). *ICES Mar Sci Symp.* 201:35-39.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluent: hydrograph, morphology of the river courses, and river types. In: Sioli, H. (Ed), *The Amazon: Limnology and landscape ecology of a might tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, p.127-166.
- Slack, J.M.W. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 121:1569-1580.
- Smith M.W. 1992. Diet effects on enterocyte development. *Proceedings of the Nutrition Society.*51:173-178.
- Somogyi, M. and Nelson, N. 1995. β -Glucosidase from sweet almond emulsion. *Meth. Enzym.*, 1: 234-235.
- Sveinsdóttir, H.; Thorarensen H. and Gudmundsdóttir A. 2006. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. *Aquaculture* 260:307–314.
- Srivastava, A.S.; Kurokawa, T. and Susuki, T. 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and stimulation of protein digestibility in first feeding larvae of the japonese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132:629-635.
- Steffens, W. 1987. Principios fundamentales de la alimentación de los peces. Acribia, S.A. Ed. Zaragoza, España. 273p.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company New York.
- Tanji, M.; Yakabe, E.; Kageyama, T.; Yokobori, S.; Ichinose, M. and Miki, K. 2007. Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of african coelacanth, *Latimeria chalumnaem*, and properties of the major pepsins. *Comp. Biochem. and Physiol.*146B: 412–420.
- Tengjaroenkul, B.; Bonnie, J.; Smith, B.; Smith, S.A. and Chatreewongsin, U. 2001. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oerochromis niloticus*. *Aquaculture*, 211:241-251.

- Torrissen, R.K.; Pringle, G.M.; Moss, R.; Houlihan, D.F. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 19, 247–255.
- Ueberschäer, B. 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Physiology and biochemistry of fish larval development. Walther, B.T. and Fyhn, H.J., (eds), pp.233-239. Bergen: University of Bergen Press.
- Ugolev, A.M. and De Laey, P. 1973. Membrane digestion: A concept of enzymatic hydrolysis on cell membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 300:105-128.
- Val, A.L. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in freshwater. In: Bicudo, J.E. (Ed). *The vertebrate gas transport cascade: adaptation to environment and mode of life*. CRC Press, Boca Raton, p.43-53.
- Val, A.L. and Almeida-Val, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environments: Physiological and Biochemical aspects. Heidelberg, Springer. 224 pp.
- Val, A.L. and Honczaryk, A. 1995. A criação de peixes na Amazônia: um futuro promissor. In: Val, A.L. and Honczaryk, A. (Eds). *Criando peixes na Amazônia*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, BRASIL. p.1-5.
- Vieira, V.L.A. and Jhonston, I.A. 1996. Muscle development in the tambaqui, an important amazonian food fish. *J. Fish Biol.* 49: 842-853.
- Vinatea, J.E. 1995. *Piscicultura tropical de aguas continentales*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú, 90p.
- Vega-Orellana, O.M.; Fracalossi, D.M. and Sugai, J.K. 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture.* 252: 484-493.
- Verreth, J.; Torreele, E.; Spazier, E.; Sluiszen, A.V.D.; Rombout, J.; Booms, R. and Segenr, H. 1992. The development of a functional digestive system in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *J World Aquacult. Soc.* 23:286-298.
- Wang, C; Xie, S.;Zhu, X. Lei, W.;Yang, Y.and Liu, J. 2006. Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture.* 254:554-562.
- Wallace, R.A. 1991. Digestion and nutrition. In: *Biology, the science of life*, 3rd edn (Wallace, R.A., Sanders, R.J. and Ferl, R.J. eds), pp. 909-936. Harper Collins Publishers Inc., New York, USA.

Walter, K. and Schutt, C. 1974. Alkaline phosphatase in serum (continuous assay). In: Bergmeyer, H.U. (Ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, 2nd ed. Academic press, New York, NY, pp. 860-864.

Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*; 12:397-402.

Whaley, K. and Lemercier, C. 1993. The complement system. In: Sim, E. (Ed.), *The Natural Immune System:Humoral Factors*. IRL Press, New York, pp. 121–150.

Whitaker, J.R. 1994. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2.ed. New York:Marcel Dekk.

Wilkening, S.and Bader, A.2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction:Methodical analysis and mathematical model. *J.Biomol. Tech.*15:107-111.

Wu, T.; Sun, L.;Du, C.; Cai, Q.;Zhang, Q.; Su, W. and Cao, M. 2009. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of european eel (*Anguilla anguilla*) *Food Chem.* 115:137–142.

Worthington, V. 1993. *Worthington Enzyme Manual: Enzymes and related biochemicals*. Worthington Biochemical, New York, 407 pp.

Woynarovich, E. 1986. Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. CODEVASF. Brasília, Brasil. pp.27-63..

Zambonino Infante, J.; Gisbert, E.; Sarasquete, C.; Navarro, L.; Gutiérrez, J. and Cahu, C.L. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O.;Bureau, D. and Kapoor, B.G. (Eds). *Feeding and digestive functions of fish*. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp 277-344.

Zambonino Infante, J.L. and Cahu, C. L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*. 268:98-105.

Zambonino Infante, J.L. and Cahu, C. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp.Biochem Physiol* 130:477-487.

Zambonino Infante J.I. and Cahu C.L.1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129:1195-1200.

Zambonino Infante J.I.; Cahu C.L. and Peres, A. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* development. *J. Nutr.* 127:608-614.

Zambonino Infante J.I.; Cahu, C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem.* 12(5):399-408.

Zhou, Q.; Fu, X. P.; Zhang, L. J.; Su, W. J. and Cao, M. J. 2007. Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsins. *Food Chem.* 103: 795–801.

ANEXOS

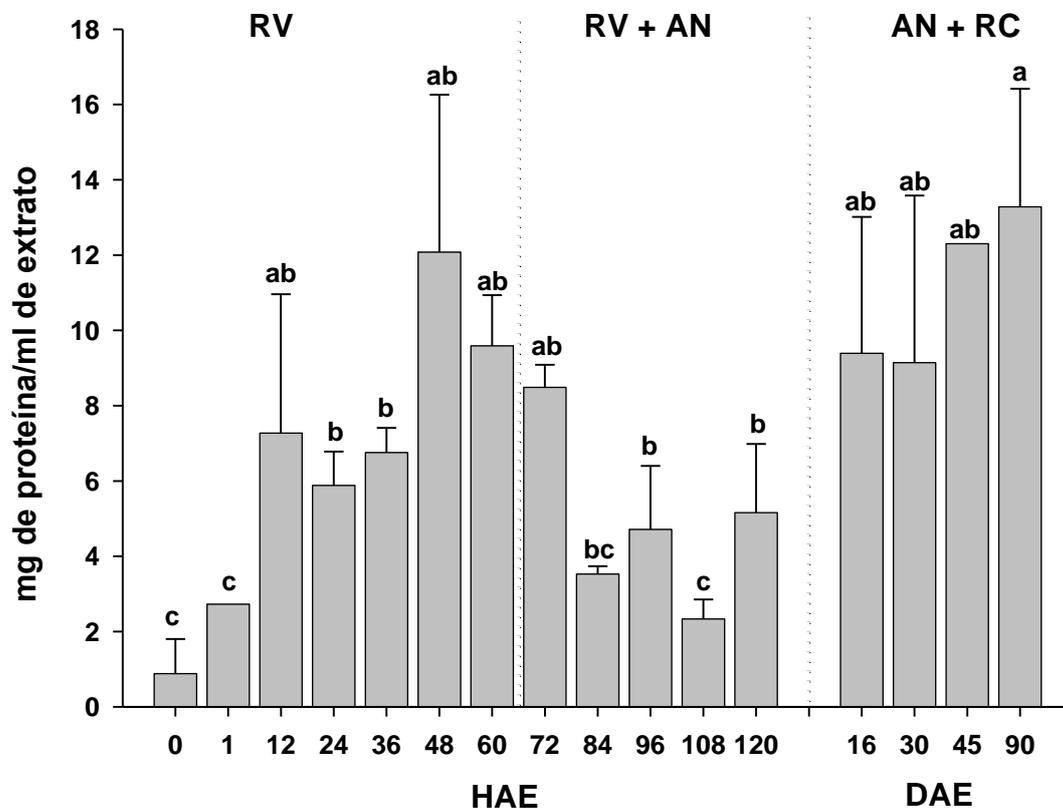


Figura 29. Variação da proteína solúvel durante o desenvolvimento ontogenético do tabaqui. Os valores estão apresentados como médias \pm SEM (n=3). Cada ensaio foi realizado em triplicata. HAE indica horas após eclosão e DAE indica dias após eclosão. RV: reserva vitelínica; AN: alimento natural; RC: ração comercial. As linhas pontilhadas indicam os períodos com diferentes fontes de nutrientes. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).