

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO EM ZOOTECNIA**

**RITMOS DIÁRIOS DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS, DOS  
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E DE ATIVIDADE LOCOMOTORA DA  
TILÁPIA DO NILO**

**BARTIRA GUERRA SANTOS**

**SALVADOR - BAHIA**

**ABRIL - 2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE DOUTORADO EM ZOOTECNIA**

**RITMOS DIÁRIOS DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS, DOS  
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E DE ATIVIDADE LOCOMOTORA DA  
TILÁPIA DO NILO**

**BARTIRA GUERRA SANTOS**

**Médica Veterinária**

**SALVADOR - BAHIA**

**ABRIL - 2016**

**BARTIRA GUERRA SANTOS**

**RITMOS DIÁRIOS DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS, DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E DE  
ATIVIDADE LOCOMOTORA DA TILÁPIA DO NILO**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fortes da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Vítor Oliveira Vidal

**SALVADOR - BAHIA**

**ABRIL - 2016**

**Sistema de Bibliotecas da UFBA**

Santos, Bartira Guerra.  
Ritmos diários das atividades de enzimas digestivas, dos parâmetros imunológicos e de atividade locomotora da tilápia do Nilo / Bartira Guerra Santos. - 2016.  
113 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fortes da Silva.  
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Vitor Oliveira Vidal.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2016.

1. Tilápia (Peixe) - Criação. 2. Enzimas. 3. Glicose. 4. Genética - Expressão. 5. Peixe - Alimentação. I. Silva, Rodrigo Fortes da. II. Vidal, Luiz Vitor Oliveira. III. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

CDD - 639.3  
CDU - 639.3

**RITMOS DIÁRIOS DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS, DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E DE  
ATIVIDADE LOCOMOTORA DA TILÁPIA DO NILO**

Bartira Guerra Santos

Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia

Salvador, 29 de abril de 2016

Comissão examinadora:



---

Dr. Luiz Vítor Oliveira Vidal  
UFBA  
Orientador / Presidente



---

Dr. Ricardo Castelo Branco Albinati  
UFBA



---

Dra. Thereza Cristina Borio dos Santos Calmon de Bittencourt  
UFBA



---

Dr. Alexandre Moraes Pinheiro  
UFRB



---

Dr. Ronald Kennedy Luz  
UFMG

*Compositor de destinos  
Tambor de todos os ritmos  
Tempo, tempo, tempo, tempo  
Entro num acordo contigo  
Tempo, tempo, tempo, tempo  
Por seres tão inventivo  
E pareceres contínuo  
Tempo, tempo, tempo, tempo  
És um dos deuses mais lindos  
Tempo, tempo, tempo, tempo*

*Caetano Veloso*

## AGRADECIMENTOS

Eu poderia simplesmente dizer: Deus lhe pague, valeu, *thank, gracias, gratias tibi, grazie* para todos, mas é difícil fazer isso sabendo que o empenho, a dedicação, o desprendimento, físico e intelectual, de todos que estiveram comigo foi imensurável. Ainda assim, faço empréstimos destas formas para, em primeiro lugar, expressar minha gratidão ao professor Rodrigo Fortes, meu orientador nesse trabalho sobre tempos e ritmos. Sou muito grata por ter compartilhado seu tempo comigo e por ter me apresentado à pesquisa em Cronobiologia, num ritmo de constantes descobertas e possibilidades, nas quais sua orientação foi determinante para que eu entrasse no ritmo desse campo de estudos. Mudei de fuso horário, perdi o ritmo, mas, sob sua orientação, me encontrei nas pesquisas sobre o tempo. Agradeço ao meu coorientador, Luiz Vítor Oliveira Vidal, pela presteza e solicitude de sempre. Por ser alguém com quem se pode contar.

Também agradeço ao professor Robson Bahia que, com “régua e compasso” me orientou pelos caminhos da Imunologia e me incentivou a sempre ir além do que supostamente está posto. Sua contribuição foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Agradecer à galera do laboratório talvez seja a parte mais difícil, pois foi um tempo em que as contribuições vinham de muitas mãos e mentes. Começo por Deni (Jogue Limpo), com quem partilhei tempo e ideias. Obrigada por sua amizade. Agradeço também aos “anjos dos céus” (como sempre os chamei): Kay, Lice, Line, Yane, Sil, Jéssica, Ade, Mara, Mari, Drine, Vi, July, Tai, Deise, Uriel, Bruno, Eduardinho, Charlle, Alisson, Lincoln e, já ia me esquecendo, Kaycka (*in memoriam*). Todos correndo contra o tempo para não perdermos o ritmo dos acontecimentos.... Vocês foram fantásticos no laboratório e também no fotoperíodo da alegria. Minha gratidão não cabe nas páginas desse trabalho, está marcada na memória do tempo.

Agradeço pelas parcerias encontradas no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidad de Murcia: as parcerias de Javier e José Fernando, que compartilharam técnicas, enriqueceram minhas reflexões com discussões produtivas e ampliaram conhecimentos fundamentais à pesquisa desenvolvida. Agradeço a Oli, Manu e Juan Fernando. Destaco, especialmente, a parceria de Bruno que, mais uma vez, demonstrou

que a pesquisa é realizada por cientistas, mas sobretudo por pessoas. Obrigada por sua amizade em momentos tão cruciais, quando a distância da família e dos amigos nos fazia compreender o que é saudade. Obrigada principalmente por ter me apresentado a um restaurante de comida brasileira!!!

Agradeço aos Guerra de todos os tempos e tamanhos. Esses também tiveram uma forma muito especial e peculiar de me ajudar nessa pesquisa. “Tamo junto”! Sempre. Sou muito grata pela constante renovação de nossos afetos. Agradeço especialmente a Liceu e Zé de Bira, pelo fato de, em outros tempos, terem me acolhido para que eu realizasse meus planos de estudo. Agradeço enormemente a Dé Guerra, por sempre ter estado por perto, cuidando, orientando e estimulando.

Endereço um agradecimento especial à pessoa a quem dedico este trabalho, Cris Farias-Guerra (“RNA later”), *“Por seres tão inventiva”*.

Agradeço aos Farias e aos Ramos, pessoas amigas que quero ter sempre por perto, especialmente a D. Celia, pessoa que muito admiro, por seu carinho e amizade sincera.

Agradeço ao apoio financeiro da FAPESB e do CNPq e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFBA. Mas não encerro aqui, pois preciso registrar um agradecimento mais que especial ao professor Ricardo Albinati. Obrigada por acreditar em mim, por ter visto potencial onde eu via dúvidas, por ter, ainda na graduação, me apresentado à pesquisa científica. Você é um dos seres humanos que eu mais respeito e admiro.



**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 02: Ritmos diários nas respostas imunes de tilápia do Nilo  
(*Oreochromis niloticus*).**

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados na análise quantitativa de qPCR .....	90
Tabela 2 - Médias $\pm$ S.E.M. do eritrograma (Hb = hemoglobina; VG = volume globular; RBC= eritrócitos; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média) de tilápias do Nilo desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> em diferentes fotoperíodos.....	99
Tabela 3 - Médias $\pm$ S.E.M. do Leucograma (Trom. = Trombócitos; LT. = Leucócitos Totais; Lf = Linfócitos; Lf Imat. = Linfócitos Imaturos; Nt = neutrófilos; Mn = Monócitos; Es. = Eosinófilos; BS = basófilos) de tilápias do Nilo desafiadas, experimentalmente, com <i>Streptococcus agalactiae</i> em diferentes fotoperíodos.....	101

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura Geral

Figura 1 - Esquema do sistema de temporização circadiano endógeno.....	20
Figura 2 - Conexão molecular entre o sistema imune e as vias do relógio biológico.....	28

### **CAPÍTULO 01: Sincronização dos ritmos diários de atividade locomotora, de glicose no plasma e das enzimas digestivas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Figura 3 - Representação dos horários circadianos .....	58
Figura 4AB - Actograma e formas de onda média representantes da atividade da tilápia submetidas à alimentação fixa uma vez por dia no ML.....	62
Figura 5AB - Actograma e formas de onda média representantes da atividade da tilápia submetidas à alimentação fixa uma vez por dia no MD.....	63
Figura 6 - Mapa de fases da protease alcalina e da glicose .....	65
Figura 7AB - Perfis diários de protease alcalina em tilápias submetidas à alimentação periódica, ML (A) e MD (B).....	66
Figura 8AB - Atividade da amilase no intestino médio de tilápias submetidas à alimentação periódica, ML (A) e MD (B) .....	68
Figura 9AB - Níveis diários de glicose no sangue de tilápias, submetidas a alimentação periódica, ML (A) e MD (B) .....	70

### **CAPÍTULO 02: Ritmos diários nas respostas imunes de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Figura 10 - Representação dos horários circadianos.....	83
Figura 11 - Desenho esquemático .....	84
Figura 12 - Mortalidade dos peixes no período experimental antes da exposição (A-vacina, C-controle) e após a exposição à bactéria (B-vacina, D-controle) .....	91
Figura 13 - Mapa de fase das variáveis IL1 $\beta$ , IL-12, TNF $\alpha$ 3, TGF $\beta$ 1, peroxidase IgM, VG e trombócitos. ....	92
Figura 14 - Valores dos níveis de IgM em peixes vacinados (A) e controle (B), e da atividade de peroxidase em peixes vacinados (C) e controle (D). ....	93
Figura 15 - Valores de expressão relativa de genes IL1 $\beta$ e IL12 na tilápia no tratamento vacina (A, C) e controle (B, D), respectivamente.....	95
Figura 16 - Valores de expressão relativa de genes TGF $\beta$ 1 e TNF $\alpha$ 3 na tilápia no tratamento vacina (A, C) e controle (B, D), respectivamente.....	96
Figura 17AB - Valores médios de VG (A) e trombócitos totais (B) no tratamento controle nos diferentes horários de coletas.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAA - Atividade antecipatória alimentar  
AA-NAT - Arilalquilamina Nacetiltransferase  
AQUAUFRB - Laboratório de Nutrição e Comportamento Alimentar de Organismos Aquáticos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
CAID - Centro de Apoyo a la Investigación y Desarrollo  
CCG - Gene controlado pelo relógio  
CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média  
DD - período 24 horas escuro  
DNOCS - Departamento Nacional de obras contra as secas  
EGR1 - Resposta de crescimento precoce 1  
ELISA - Ensaio imunoenzimático  
HCM - Hemoglobina corpuscular médio  
HBSS - Solução salina balanceada de Hanks  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
HTP - Hidroxitriptofano  
IgG - Imunoglobulina G  
IgM - Imunoglobulina M  
IL1 $\beta$  - Interleucina 1-beta  
IL12 - Interleucina 12  
LD - Luz-escuro  
MALT - Tecido linfoide associado a mucosa  
ML - metade do período de luz  
MD - Metade do período escuro  
mM - Milimolar  
NF-k $\beta$  - Fator nuclear kappa beta  
NaCl - Cloreto de sódio  
NAS - N-acetilserotoina  
NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Carbonato de sódio

μL - microlitro

OD - Densidade ótica

pH - Potencial hidrogeniônico

STAT - Sinal de tradução e ativação de transcrição

Tris-HCl - Hidroximetil-aminometano-hidroclorídrico

TNFα - Fator de necrose tumoral-alfa

TGFβ1- Fator transformador do crescimento-beta 1

TPH1 - triptofano hidroxilase-1

TMB - Tetrametilbenzidina

UM - Universidade de Murcia

UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

VCM - Volume corpuscular médio

VG - Volume globular

ZT - *Zeitgeber*

## SUMÁRIO

### Ritmos Diários das Atividades de Enzimas Digestivas, dos Parâmetros Imunológicos e de Atividade Locomotora da Tilápia do Nilo

	Página
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução Geral.....	17
1 Revisão de Literatura geral.....	18
1.1 Ritmos Biológicos em Peixes.....	18
1.2 Ritmo x Sistema de Temporização.....	22
1.3 Ritmos Biológicos: Organização Celular e Molecular .....	25
1.4 Ritmos Circadianos do Sistema Imunológico de Peixes.....	29
1.4.1 <i>Peroxidase</i> .....	32
1.4.2 <i>IgM</i> .....	33
1.4.3 <i>Citocinas</i> .....	34
1.5 Ritmos Diários da Atividade Locomotora de Peixes .....	36
1.6 Ritmos Diários das Enzimas Digestivas de Peixes.....	40
1.7 Tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	41
2 Referências bibliográficas.....	45

### CAPÍTULO 01: Sincronização dos ritmos diários de atividade locomotora, de glicose no plasma e das enzimas digestivas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Resumo.....	54
Abstract.....	55
1 Introdução.....	56
2 Material e Métodos .....	57
2.1 Instalações experimentais.....	57
2.2 Desenho experimental.....	59
2.3 Análise das atividades da amilase e da protease Alcalina.....	60

2.4 Análise de glicose.....	61
2.5 Análises de dados.....	61
3 Resultados e Discussão.....	61
3.1 Ritmos diários da atividade locomotora.....	62
3.2 Ritmos diários dos parâmetros fisiológicos .....	65
3.2.1 <i>Enzimas Digestivas</i> .....	65
3.2.2. <i>Glicose</i> .....	69
4 Conclusão.....	72
Referências Bibliográficas.....	73

**CAPÍTULO 02: Ritmos Diários nas Respostas Imunes de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Resumo.....	79
Abstract.....	80
1 Introdução.....	81
2 Material e Métodos.....	82
2.1 Animais e instalações.....	82
2.2 Desenho experimental.....	83
2.2.1 <i>Fase 1: Imunização</i> .....	84
2.2.2 <i>Fase 2: Desafio (exposição dos peixes à cepa de <i>Streptococcus agalactiae</i>)</i> .....	85
2.3 Coleta de amostras.....	85
2.4 Análises hematológicas.....	86
2.5 Análises Imunológicas (Atividade da Peroxidase e IgM) .....	87
2.6 Expressão gênica.....	88
2.6.1 <i>Primer e qPCR</i> .....	89
2.7 Análises Estatísticas.....	90
3 Resultados e Discussão.....	91
3.1 Mortalidade.....	91
3.2 Variáveis imunológicas.....	92
3.3 Expressão gênica.....	94
3.4 Variáveis hematológicas.....	97

4 Conclusão.....	103
5 Considerações Finais Gerais.....	104
Referências Bibliográficas.....	105

## RESUMO

O ciclo claro-escuro e a alimentação são fatores sincronizadores dos ritmos biológicos em peixes, fato que demandou a pesquisa ora desenvolvida, cujo objetivo foi avaliar os ritmos das funções fisiológicas, metabólicas e locomotora da tilápia do Nilo. Experimento 1: avaliar a sincronização dos ritmos diários da atividade locomotora, da amilase, da protease alcalina e dos níveis da glicose ao horário de alimentação. Juvenis (n=120) (65,04±0,58g) foram divididos em 2 grupos. Um grupo foi alimentado uma vez ao dia, às 11h (ZT6) (grupo ML) e o outro, alimentado às 23h (ZT18) (grupo MD). A atividade locomotora dos animais foi mensurada por meio de fotocélula fixada nos tanques. A atividade locomotora, bem como análise do Cosinor para os parâmetros de glicose, protease alcalina e amilase foram analisados. Todos os resultados foram expressos como média ± S.E.M. e avaliados por ANOVA one-way, teste de Duncan. Os peixes alimentados em ML demonstraram uma atividade locomotora diurna (74,01% da atividade total) e sincronização ao horário de alimentação. Esse grupo demonstrou antecipação da atividade locomotora ao horário da alimentação. Nos peixes em MD houve um rompimento no padrão diário de atividade locomotora (58,94% período de luz e 41,06%, escuro). A atividade de protease alcalina no intestino médio dos dois grupos (ML e MD) demonstrou padrão rítmico diário (COSINOR, P<0,05). A amilase não demonstrou padrão rítmico de atividades (COSINOR, P>0,05), nem diferença significativa (P>0,05). Os resultados demonstraram uma variação rítmica diária para a glicose plasmática, Cosinor, P<0,05 e diferença significativa (ANOVA, P<0,05). O horário da alimentação exerceu influência sobre os ritmos diários dos parâmetros comportamentais, fisiológicos e metabólicos da tilápia do Nilo, que demonstrou plasticidade do sistema circadiano com capacidade de controle do padrão de atividade locomotora. Experimento 2: avaliou as variações diárias nas respostas imunológicas e hematológicas de tilápia. Juvenis (n=144) (38.06±0.42g) foram distribuídos em 2 grupos e mantidos em temperatura de 28°C e fotoperíodo 12:12LD. Um grupo foi vacinado contra *S. agalactiae* (T1) e outro grupo recebeu solução salina como controle (T2). Após trinta dias da imunização todos os peixes foram desafiados com a bactéria *S. agalactiae*. A atividade de peroxidase demonstrou um ritmo diário (COSINOR, p<0,05), nos peixes do tratamento controle. Os níveis de IgM no soro dos peixes vacinados, demonstrou um padrão rítmico diurno, Cosinor (p<0,05) e diferença significativa entre os pontos de coleta (p<0,05). O grupo controle (T2) apresentou expressões rítmicas gênicas de TGFβ1, TNFα3 e IL12 (COSINOR, p<0,05), todos com acrofase diurna. No grupo controle, o VG e trombócitos demonstraram variação rítmica (COSINOR, p<0,05), como também o VG, o VCM e o CHCM demonstraram diferença estatística (p<0,05). Nos peixes vacinados houve diferença significativa para o VG e CHCM (p<0,05). Há evidências de variação diária das funções imunológicas e hematológica da tilápias do Nilo, sincronizadas com o ciclo claro-escuro do dia. Isso reflete a importância da dimensão temporal na gestão do cultivo dessa espécie.

Palavras-chave: Amilase, glicose sanguínea, protease, expressão gênica, rede imunológica rítmica, tilápia do Nilo



## ABSTRACT

The light-dark cycle and food are factors synchronizers of biological rhythms in fish, a fact which required research now developed, whose objective was to evaluate the rhythms of physiological functions, and locomotor metabolics of Nile tilapia. Experiment 1: assess the synchronization of daily rhythms of locomotor activity, amylase, alkaline protease and glucose levels at feeding time. Juveniles (n = 120) ( $65.04 \pm 0.58\text{g}$ ) were divided into 2 groups. One group was fed once a day, at 11am (ZT6) (ML group) and the other fed to 23h (ZT18) (MD group). The locomotor activity of the animals was measured by photocell fixed in the tanks. The locomotor activity, as well as Cosinor analysis for glucose parameters, alkaline protease and amylase were analyzed. All results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and evaluated by one-way ANOVA, Duncan test. Fish fed on ML showed a diurnal locomotor activity (74.01% of the total activity) and synchronizing the feeding schedule. This group showed anticipation of locomotor activity at the time of feeding. In fish in MD there was a disruption in the daily pattern of locomotor activity (58.94% light period and 41.06%, dark). The alkaline protease activity in the midgut of the two groups (ML and MD) demonstrated daily rhythmic pattern (COSINOR,  $p < 0.05$ ). The amylase did not show rhythmic pattern of activities (COSINOR,  $p > 0.05$ ), no significant difference ( $p > 0.05$ ). The results show a daily rhythm variation for plasma glucose, Cosinor,  $p < 0.05$  and significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ). The power of time exerted influence on the daily rhythms of behavioral, physiological and metabolic parameters of Nile tilapia, which demonstrated the plasticity of the circadian system with standard control capability of locomotor activity. Experiment 2: evaluated the daily changes in immunological and hematological responses of tilapia. Juveniles (n = 144) ( $38.06 \pm 0.42\text{g}$ ) were divided into 2 groups and kept at  $28^\circ\text{C}$ , photoperiod 12:12LD. One group was vaccinated against *S. agalactiae* (T1) and another group received saline as control (T2). Thirty days after immunization all fishes were challenged with the bacterium *S. agalactiae*. Peroxidase activity showed a daily rhythm (COSINOR,  $p < 0.05$ ) in the control treatment of fish. IgM levels in fish serum vaccinated showed a diurnal rhythm pattern, Cosinor ( $p < 0.05$ ) and significant difference between the collection points ( $p < 0.05$ ). The control group (T2) showed rhythmic gene expressions of TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ 3 and IL12 (COSINOR,  $p < 0.05$ ), all with daytime acrophase. In the control group, GV and thrombocytes demonstrated rhythmic variation (COSINOR,  $p < 0.05$ ), as well as GV, MCV and MCHC showed statistical difference ( $p < 0.05$ ). In fish vaccinated significant difference to the GV and MCHC ( $p < 0.05$ ). There is evidence of daily variation of immunologic and hematologic functions of the Nile tilapia, synchronized with the light-dark cycle of the day. This reflects the importance of the temporal dimension in this kind cultivation management.

Keywords: Amylase, glucose rhythms, protease, Nile tilapia, gene expression, rhythmic immune network.

## INTRODUÇÃO GERAL

A Cronobiologia é o ramo da Biologia que investiga a natureza e as características dos eventos de ordem temporal que ocorrem nos organismos vivos e se repetem em um determinado intervalo de tempo (ROTENBERG et al., 2003). Esses ritmos podem se dar dentro de um período de 24h, sendo então denominados de ritmos circadianos; podem ter um período maior que 28h, são os chamados ritmos infradianos; ou podem ocorrer num período inferior a 20h, classificados como ultradianos (SCHULZ e LEUCHTENBERGER, 2006). Esses ciclos se estabeleceram ao longo do processo evolutivo, definindo os ritmos dos comportamentos e funções fisiológicas dos seres vivos (CYMBOROWSKI, 2010).

A luz e a temperatura se destacam como alguns dos principais fatores sincronizadores do ritmo diário de comportamento, bem como de expressão de genes relógio (CARR et al., 2006). A oferta de alimento se constitui em um importante sincronizador, sendo considerado um relevante temporizador (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009; MONTOYA et al., 2010). Kulczykowska e Sánchez-Vázquez (2010) consideram que esses fatores são elementos que agem definindo a fase de expressão rítmica dos genes relógio com arrastamento de ciclos, permitindo que os peixes antecipem e respondam de forma adequada às mudanças ambientais.

Embora os ritmos dos seres vivos sejam arrastados por sincronizadores, esses são de natureza endógena, ou seja, podem se manifestar independentemente das condições ambientais, se expressando mesmo na ausência de pistas externas. Esses ritmos ocorrem em livre-curso (*free running*) (MARQUES et al., 2003). Esse relógio biológico é um sistema complexo composto por diversos genes que expressam fatores de transcrição e que também modulam sua própria expressão (KO e TAKAHASHI, 2006).

As pesquisas com peixes têm demonstrado a influência do ciclo claro-escuro no comportamento desses animais, classificando-os em diurnos, noturnos ou crepusculares. Algumas espécies, contudo, têm demonstrado uma plasticidade em relação a essa classificação e podem ser duais, tanto noturnos, quanto diurnos, como também podem mudar de fase em determinadas circunstâncias (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 1995, 1996). Ainda há aquelas espécies que não apresentam uma relação de sua atividade locomotora

com sua atividade de alimentação (FORTES-SILVA et al., 2010a). Esses estudos também têm revelado que a alimentação é um potente sincronizador da atividade dos peixes, quando eles concentram mais sua atividade no horário de receber o alimento, demonstrando que podem antecipar a atividade alimentar. Algumas horas antes da alimentação, os peixes exibem atividade locomotora intensa, como também produção de enzimas para o processo digestivo (MISTLBERGER, 1994; VERA et al. 2007).

Há um longo caminho a percorrer na área da imunologia e da hematologia de peixes, mas estudos já revelaram que esses sistemas também sofrem influência do ciclo claro-escuro, se expressando de forma rítmica. Essas variações circadianas têm sido demonstradas na atividade de peroxidase, de lisozima, de fagocitose, atividade do complemento, de leucócitos e no volume globular de variadas espécies de peixes (ESTEBAN et al. 2006; BINURAMESH e MICHAEL 2011; DE PEDRO et al. 2005).

Explorar e compreender as possibilidades abertas pelo conhecimento da influência do fotoperíodo sobre os ritmos circadianos de peixes aumenta o espectro de ação do sujeito envolvido na produção aquícola. Assim, com o intuito de entender como essas relações do ciclo claro-escuro se manifestam em tilápia do Nilo, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar os ritmos diários das enzimas digestivas, dos parâmetros imunológicos e hematológicos e da atividade locomotora dessa espécie.

## **1 REVISÃO DE LITERATURA GERAL**

### **1.1 Ritmos Biológicos em Peixes**

A vida está sujeita a ciclos diários de luz e de escuridão e às mudanças decorrentes das variações relacionadas às diferentes estações do ano, resultantes dos movimentos de rotação e translação da Terra (CYMBOROWSKI, 2010). Tais eventos cíclicos promovem a manifestação dos ritmos biológicos, que nada mais são do que qualquer evento de natureza biológica que se repete a um dado intervalo de tempo (ASCHOFF, 1981). Ressalte-se que se trata de eventos naturais de caráter cíclico regendo ritmos biológicos também de natureza cíclica.

No ano 325 aC, foi revelado ao mundo o primeiro episódio de cunho científico sobre ritmo biológico pelo historiador Andróstenes de Thasos, que descreveu o

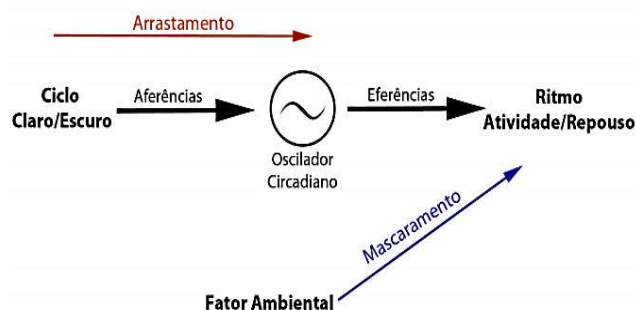
movimento periódico das folhas da planta tamarindo, *Tamarindus indica* (SCHILDKNECHT, 1983). Segundo Rotenberg et al. (2003), esse trabalho pode se tratar do primeiro relato sobre o ciclo atividade/repouso em planta. Outra descrição dessa natureza surgiu no século XVIII (1729), quando Jean Jacques de Mairan descreveu os movimentos das folhas da *Mimosa pudica*, mantida em local isolado de ciclo ambiental claro-escuro. Apesar da situação de isolamento em que se encontrara, a planta continuou a movimentar suas folhas regularmente, revelando um caráter endógeno do ritmo de movimentação (MOORE-EDE et al., 1982). Outra importante observação, nessa mesma linha de investigação, ocorreu em 1835, descrita por De Candolle (JORES, 1975). Na oportunidade, o autor descreveu que o movimento foliar da *Mimosa pudica* variava entre 22 até 23 horas, quando esta era mantida em condições constantes de iluminação. Entretanto, uma vez reestabelecida a condição normal de iluminação, o ciclo da sensitiva era ajustado para 24 horas. Tal fenômeno aponta para o fato de que a manutenção da ritmicidade é de natureza endógena, sendo passível de sincronização pela variável ambiental claro-escuro. Este é um ritmo em “livre-curso”, conforme Marques et al. (2003).

Von Buttel-Reepen (1900) e Forel (1910), citados por Saunders (1982), apresentaram as primeiras evidências sobre o caráter endógeno dos ritmos biológicos ao concluir que abelhas possuem um “sentido temporal”, ou “memória temporal”, que lhes permite procurar alimento na hora adequada todos os dias. Para estes pesquisadores, a “memória temporal” era controlada por uma oscilação circadiana endógena. A confirmação da endogenicidade veio das experiências de Renner (1955, 1957) desenvolvidas também com abelhas.

Os organismos vivos utilizam dois tipos de estratégias para ajustar seu ritmo endógeno às pistas ambientais cíclicas, que são os mecanismos de arrastamento e de mascaramento. Esses mecanismos compreendem dois processos por meio dos quais os seres vivos conseguem utilizar as oscilações externas para ajustar seu relógio interno. No primeiro caso, o ritmo biológico endógeno pode ser sincronizado por um evento ambiental cíclico. Assim, o ritmo endógeno, com período distinto do ambiental, ajusta sua fase e período ao ciclo do ambiente. Ocorre uma sincronização diária na qual um ciclo ambiental ajusta o período e fase do oscilador, deslocando periodicamente sua fase (MOORE-EDE et al., 1982). Nesse caso, se diz que o ritmo endógeno foi arrastado pelo

ciclo ambiental. O elemento ambiental capaz de arrastar o ritmo é denominado sincronizador ou *Zeitgebers*, termo de origem alemã que significa doador de tempo. Já na sincronização por mascaramento, conforme assevera Aschoff (1988), vários estímulos, de natureza cíclica ou não, podem modificar a expressão final do ritmo de atividade do organismo. Nesse caso, o mecanismo de controle não inclui o oscilador circadiano. Existe uma plasticidade no sistema que permite aos animais modular a amplitude da expressão dos ritmos, bem como modificar a fase na qual ocorrem as atividades. Como exemplo de sincronização do ritmo com o ciclo dia/noite por mascaramento, pode-se supor que temperaturas elevadas durante o dia podem inibir a atividade de um organismo que é diurno, conforme determinado pelo oscilador circadiano arrastado, resultando na expressão da atividade nas horas frias da noite. A Figura 1 ilustra os ajustes dos ritmos por arrastamento e mascaramento.

Figura 1 - Esquema do sistema de temporização circadiano endógeno



Fonte: Tomotani e Oda, 2012, p. 2.

Luz e temperatura, conforme já dito, são fortes sincronizadores dos ritmos biológicos, mas a oferta de alimento, também, se constitui em um importante sincronizador, sendo considerado um relevante temporizador (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009; MONTOYA et al., 2010). Segundo Kulczykowska e Sánchez-Vázquez (2010), luz, temperatura e alimentação agem definindo a fase de expressão rítmica dos genes relógio com arrastamento de ciclos, permitindo que os peixes antecipem e respondam de forma adequada às mudanças ambientais.

Diversos estudos têm demonstrado que os peixes apresentam atividades rítmicas de comportamento, assim como da fisiologia. Investigações na área da reprodução têm

demonstrado ocorrência de oscilações circadianas dos parâmetros reprodutivos de peixes teleósteos, com registros nas espécies European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (BAYARRI et al., 2004) e em Senegal sole (*Solea senegalensis*) (OLIVEIRA et al., 2009), em Gilthead seabream (*Sparus aurata*) (MESEGUER et al., 2008), em zebrafish (*Danio rerio*) (BLANCO-VIVES e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009) e European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (VILAMIZAR et al., 2012).

Vera et al. (2013) registraram variação diária da eficiência do anestésico tricaina (MS-222), bem como ritmo da atividade de glutathione-S-transferase (GST) hepática e da atividade locomotora em Gilthead seabream (*Sparus aurata*) sincronizadas com o horário de alimentação. Montoya et al. (2010), estudando o mesmo peixe, concluíram que a atividade locomotora, assim como a atividade das enzimas digestivas, amilase e proteases, os níveis de glicose sanguínea e do pH gástrico apresentaram um padrão rítmico diário e foram influenciados pelo horário de fornecimento do alimento. Del Pozo et al. (2012) demonstraram que em European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) o padrão de alimentação influenciou o ritmo diário da glicose, da atividade de amilase e da expressão do gene relógio biológico *Per1*. López-Olmeda et al. (2012) em pesquisa com enguia (*Anguilla anguilla*) registraram variação diária nos níveis de cortisol, de glicose e da atividade das enzimas amilase e proteases ácida e alcalina.

Investigações nas áreas da imunologia e da hematologia também têm revelado variação cíclica diária nos parâmetros desses sistemas. Por sua vez, Binuramesh e Michael (2011), investigando o padrão rítmico do sistema imune de tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), registraram variação diária nas atividades de lisozima, peroxidases, de globulina totais, de leucócitos e de cortisol. De Pedro et al. (2005), estudando os parâmetros hematológicos e bioquímicos da tenca (*Tinca tinca*), demonstraram neste peixe a ocorrência circadiana dos parâmetros de eritrócitos, de hematócrito, de hemoglobina total, de leucócitos totais, de proteína total, de triglicérides, de colesterol e de glicose.

Estudos em peixes têm demonstrado o caráter endógeno dos ritmos. As investigações da existência do controle endógeno do comportamento nesses animais são, geralmente, feitas usando condições constantes, tais como escuro constante (DD), iluminação constante (LL) ou pulso de luz (LD) (ERIKSSON e Van VEEN, 1980; REEBS, 2002; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1996). Nessas condições, os animais

ficam isentos do arrastamento por pistas ambientais externas e seus ritmos circadianos se expressam em livre-curso com um período (t) aproximado de 24 horas, quando se trata de ritmos circadianos (ASCHOFF, 1981).

Os animais adequam o seu ritmo endógeno às condições do meio para prever as mudanças ambientais, tornando-se capazes de desempenhar diversas funções biológicas no momento mais oportuno do dia. Episódios importantes da vida animal, como a alimentação, a reprodução e a desova acontecem na melhor condição e momento, a fim de garantir a sobrevivência da espécie (DeCOURSEY, 2004). Para Menna-Barreto (2003), a natureza endógena desses ritmos é orquestrada por um conjunto de estruturas responsáveis pela gênese do tempo biológico.

## **1.2 Ritmo Biológico x Sistema de Temporização**

Na seção anterior, estudamos o ritmo biológico e suas características. Nesta seção, veremos a relação entre eventos rítmicos e o sistema de temporização, que representa o conjunto de estruturas que atua para a geração desses ritmos. Aschoff (1960) afirma que os ritmos biológicos são mais que meras reações às condições do ambiente cíclico, eles são desencadeados por fatores endógenos que persistem, mesmo na ausência de pistas ambientais cíclicas. Essa característica é marcada pela existência de osciladores associados a um sistema de temporização circadiano endógeno, responsável pela geração e controle da fase e do período desses ritmos (DAAN, 1981; MOORE-EDE et al., 1982).

Para Menna-Barreto (2003), no caráter rítmico endógeno reside a justificativa da existência de elementos responsáveis pela gênese do tempo biológico, ou seja, a presença de estruturas geradoras de tempo no interior dos organismos, os chamados relógios biológicos. Por esta expressão, utilizada pela primeira vez pelo cientista alemão Gustav Kramer (1952), entende-se o conjunto de mecanismos endógenos capazes de conferir ritmicidade a processos fisiológicos e comportamentais do organismo, independentemente das pistas ambientais externas. As estruturas responsáveis por gerar esta ritmicidade são denominadas como osciladores e sua capacidade oscilatória

circadiana é decorrente da expressão rítmica de certas proteínas ao longo do dia, codificadas pelos “genes relógio”.

Em mamíferos, o oscilador central é composto pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), que sincronizam o ritmo das outras células do corpo e os osciladores periféricos ao ciclo claro-escuro, permitindo que o organismo seja capaz de prever as variações externas circadianas (LIMA e VARGAS, 2014). O marcador circadiano central no núcleo supraquiasmático, do hipotálamo anterior, contém neurônios especializados em receber o impulso fótico através do trato retino-hipotalâmico (RHT) e pistas não fólicas por impulsos neurais (ROSENWASSER, 2009).

Em peixes, o relógio biológico é formado por um eixo circadiano, constituído por três estruturas interconectadas, sendo uma central que mantém o comando e a regulação dos ritmos. Estas estão representadas pela retina, pela pineal e pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo (MENAKER et al., 1997). Todas elas são dotadas de fotorreceptores que fornecem informações sobre a quantidade de luz no ambiente (ZORDAN et al., 2001). O sistema circadiano de peixes é composto por um marcapasso central presente no cérebro e por osciladores periféricos localizados na retina e na pineal. A existência de um oscilador circadiano tem sido associada à glândula pineal, à retina e ao cérebro, estando estas estruturas envolvidas na transdução do sinal fótico para estabelecer um ritmo circadiano em peixes. O acoplamento entre essas estruturas pode variar em cada indivíduo, de acordo com as condições fisiológicas e ambientais, resultando em uma plasticidade no sistema circadiano de teleósteos (VERA et al., 2013). A pineal é um órgão fotorreceptor direto, que contém um oscilador circadiano que controla a secreção rítmica de melatonina (EKSTRÖM e MEISSL, 1997; FALCON et al., 2007) e está diretamente envolvida em muitos processos rítmicos fisiológicos e comportamentais. Em peixe, a pineal é o principal componente do sistema circadiano e do calendário biológico que controla os ritmos fisiológicos e comportamento desses animais (FALCON, et al., 2007).

A percepção e o processamento da informação fótica são ocorrências relevantes na regulação de distintas funções do organismo (SETH e MAITRA, 2010), sendo a melatonina o hormônio responsável (FALCÓN et al., 2010; VILLAMIZAR et al., 2012). Esta é produzida principalmente pela glândula pineal e retina e é regulada pelo ciclo diário de luz-escuro (NIKAIDO et al., 2009; NIKAIDO et al., 2010). Portanto, sua



síntese se dá de modo rítmico, com flutuação regular em intervalos de 24 horas, sendo sua liberação no período escuro e inibição em presença de luz (NIKAIDO et al., 2009; NIKAIDO et al., 2010; VILLAMIZAR et al., 2012).

A produção desse hormônio advém das seguintes reações enzimáticas: o aminoácido triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase-1 (TPH1), cujo nível é maior na fase de escuro. O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, o que dá origem à serotonina que será metabolizada na fase de escuro em N-acetilserotonina (NAS) através da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Em seguida, a NAS é usada como substrato pela enzima hiroxi-indol-O-metiltransferase (AANAT), resultando no produto final, a 5-metoxi-N-acetiltriptamina, ou seja, a melatonina (FALCÓN et al., 2007; FALCÓN et al., 2010).

Há uma vasta literatura sobre ritmos circadianos, mas muito pouco em relação à recepção das informações e seus mecanismos de condução. Um sistema circadiano está equipado com diversos componentes pelos quais a luz entra no organismo e se converte em sinal nervoso ou hormonal. O seu núcleo é feito de um relógio cuja atividade está sincronizada para o ciclo de 24h (FALCÓN et al., 2010).

Em peixes teleósteos, a pineal, em geral, apresenta-se como uma vesícula conectada por uma haste ao diencéfalo (EKSTRÖM e MEISSEL, 1997). Sua função consiste em sinalizar para o organismo, pelos níveis de melatonina presentes, se é dia ou noite e informar, pela regularidade diária do hormônio, qual a estação do ano. Assim, a melatonina produzida pela glândula pineal rege os ritmos de uma série de funções neuroendócrinas, conforme vasta literatura na área, a saber: alimentação, vigília, reprodução, termorregulação (FALCÓN et al., 2010), entre outras, mas também a imunidade (ESTEBAN et al., 2006).

De acordo com Esteban et al. (2013), além das mudanças impostas pelos ciclos circadianos e circanuais, os peixes estão sujeitos, também, ao relógio lunar, que pode afetar a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, interferindo na reprodução. Segundo os autores, este é um parâmetro que ainda carece de mais pesquisas. Contudo, há estudos que sugeriram que a melatonina e os esteroides endógenos estão associados às alterações cíclicas descritas em determinados processos fisiológicos (RAHMAN et al., 2003). Estudos com o *Siganus guttatus* e com o *Siganus canaliculatus* revelaram

flutuações diárias dos níveis de melatonina no sangue, que se apresentaram reduzidos durante o dia e elevados no período noturno (TAKEMURA et al., 2003; ZIMECKI, 2006). Tais resultados sugerem que os peixes ajustam a quantidade de melatonina no plasma de acordo com o horário (ESTEBAN et al., 2013).

As investigações acerca da melatonina em peixes teleósteos apontam que, ao longo da evolução, houve mudanças nos mecanismos envolvidos na transdução e percepção da luz. O sistema circadiano de teleósteos é considerado como um multifotorreceptor e multioscillador (FALCÓN et al., 2010).

A informação temporal dos ciclos ambientais é processada e transmitida ao oscilador por vias aferentes que conseguem ajustá-lo diariamente. Tem sido proposto que um básico mecanismo de tempo é generalizado no organismo, sendo atribuída a cada célula a existência de seu próprio relógio circadiano (MARQUES et al., 2003). Para os autores, a presença da ritmicidade endógena em todos os níveis da matéria viva sugere que a rotação da Terra tenha sido um fenômeno tão marcante ao longo da evolução dos organismos, que os ritmos biológicos associados ao ciclo dia-noite deveriam possuir uma base genética para se perpetuarem.

### **1.3 Ritmos Biológico: Organização Celular e Molecular**

A evidência quanto a existência de ritmos biológicos em seres unicelulares (GOTO et al., 1985) foi um fato que conduziu as investigações no sentido de que uma única célula poderia dispor de todos os elementos de um relógio biológico (LIMA e VARGAS, 2014). Estudos realizados com a mosca *Drosophila melanogaster* (KONOPKAR e BENKER, 1971) confirmaram que os mecanismos responsáveis pela oscilação endógena, verificados nos NSQ, realizam-se em nível celular (LIMA e VARGAS, 2014).

As pesquisas com genética molecular revelaram que esse relógio biológico é composto por diversos genes que expressam fatores de transcrição e que também modulam sua própria expressão. O mecanismo circadiano regulador da ritmicidade em vertebrados consiste de interações de ciclos de autorregulação positivas e negativas de transcrição e translocação (BUHR e TAKAHASHI, 2013). Os genes CLOCK e

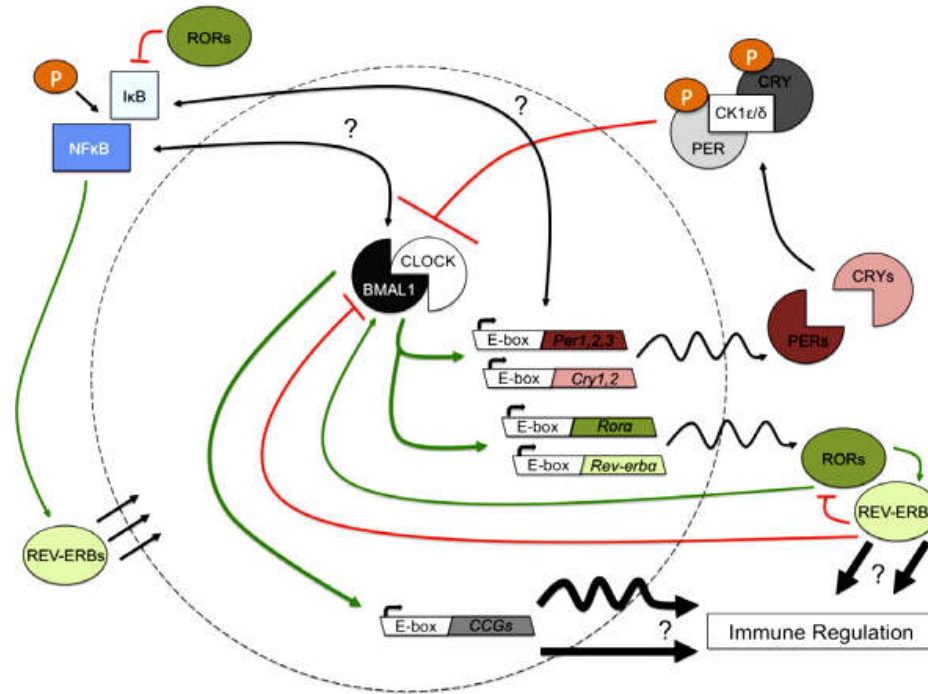
BMAL1, elementos positivos, formam um heterodímero que age como fator de transcrição, liga-se ao *E-box* localizado na região regulatória para a expressão dos genes *Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) e *Cryptochrome* (*Cry1* e *Cry2*), elementos negativos. O RNAm dos genes *Per* e *Cry* são traduzidos no citoplasma para a formação das proteínas PER (*Period*) e CRY (*Cryptochrome*), onde essas proteínas são fosforiladas e formam monômeros. Este complexo é transportado para o núcleo e bloqueia sua própria transcrição ao inibir a ação do complexo CLOCK-BMAL, formando um sistema de autorregulação (REPPERT e WEAVER, 2001; KO e TAKAHASHI, 2006). A transdução de informação circadiana é alcançada por ativação rítmica dos genes que são controlados por relógio biológico (REPPERT e WEAVER, 2002). Os genes *Cry*, *Per*, BMAL e CLOCK têm sido reportados em zebrafish. Três genes CLOCK (1, 2 e 3), três genes BMAL1 (*bmal1a*, 1b e 2), quatro genes *Per* (*Per1a*, 1b, 2 e 3) e seis genes *Cry* (*Cry 1a*, 1b, 2a, 2b, 3 e 4) (VATINE et al., 2011; IDDA et al., 2012).

A maioria dos genes biológicos em zebrafish parece ser transcrita e se expressa ritmicamente em todo tecido do peixe. Em linhagem de células embrionárias, a expressão desses genes, nesse teleosteo, pode ser induzida pelo ciclo claro-escuro (PANDO et al., 2001). O RNAm Clock é ritmicamente expresso em zebrafish em estruturas que podem estar associadas ao marcapasso central circadiano, bem como na maioria dos tecidos periféricos (WHITMORE et al., 1998). Pando et al. (2001) desenvolveram estudos que relataram expressão rítmica de genes *Per3* em oócitos não fertilizados do zebrafish. Conforme mencionado por Sánchez et al. (2010), o *Per1* foi amplamente expresso em European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Nesse estudo, o RNAm de *Per1* foi detectado em todos os tecidos analisados, como cérebro, coração, fígado, brânquia, músculo, trato digestório, tecido adiposo, baço e retina. Del Pozo et al. (2012) demonstraram a expressão rítmica diária de *Per1* no cérebro desse mesmo peixe, não sendo essa expressão afetada pela alimentação. Por outro lado, no fígado, o horário da alimentação afetou os níveis médios de expressão do *Per1*, que se apresentou maior nos peixes diurnos do que nos noturnos. Estudos que reportam a expressão de genes relógio em muitos tecidos periféricos, tanto em mamíferos quanto em peixes, desconsideram o cérebro como elemento único dessa expressão (WHITMORE et al., 1998; YOO et al., 2004).

Como afirmam Bozec et al. (2009), vários fatores de transcrição em mamíferos, que têm suas funções relacionadas ao sistema imunológico, são regulados pelo gene relógio. Os sinais de tradução e ativação de transcrição (STAT3 e STAT5), o fator de resposta de crescimento precoce 1 (EGR1) e o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) são exemplos de alguns desses fatores

As respostas imunes podem ser reguladas por genes relógio, que modulam a produção de citocinas e outros fatores por via de sinalização de NF- $\kappa$ B (BOZEC et al., 2009). Outros CCGs (genes controlados pelo relógio), tais como REV-ERB e RORs, conectam o relógio molecular à resposta imune (KO e TAKAHASHI, 2006). A figura 2 ilustra a conexão entre o relógio biológico e o sistema imune.

Figura 2 - Conexão molecular entre o sistema imune e as vias do relógio biológico.



Fonte: Logan e Sarkar, 2012, p. 85.

Autorregulação controlada por temporização circadiana. CLOCK/BMAL1 heterodímero se liga à região de sequência E-box e induz a transcrição de *Per1-3*, *Cry1* e *2*. Estes se deslocam ao citoplasma para sofrer tradução. PER e CRY se translocam ao núcleo, onde bloqueiam o complexo CLOCK/BMAL1, inibindo sua própria transcrição. BMAL1 e CLOCK também controlam a expressão de genes controlados pelo relógio. Alguns estão relacionados com a função imune. Os RORs e REV-ERBs são uma alça que fornece estabilidade e robustez ao relógio e também regula a função imune. NF-κβ regula a resposta imune por indução da expressão de genes e fornece conexões para o relógio.

Um controle circadiano por genes relógio do sistema imune pode permitir ao organismo antecipar as mudanças diárias na atividade e alimentação e a associação do risco de infecção ou dano ao tecido. O entendimento do ritmo diário do sistema imune pode ter implicações para vacinação como também no manejo das doenças infecciosas (LOGAN e SAKAR, 2012).

Embora as bases celulares e moleculares dos fenômenos rítmicos em peixes não estejam elucidadas, alguns estudos, contudo, tentam esclarecer acerca das variações diárias da função imunológica nesses animais, conforme se abordará a seguir.

#### **1.4 Ritmos Circadianos do Sistema Imunológico de Peixes**

Os peixes, como outros vertebrados, apresentam padrão diário do seu comportamento e fisiologia (KAPLAN et al., 2008) e podem detectar mudanças no ambiente ao seu redor e ajustar-se a estas (BINURAMESH e MICHAEL, 2011). O sistema imunológico desses animais está sujeito à interferência de fatores como poluentes, doenças, hormônios e alimentação (SITJÀ-BOBADILLA et al., 2005). Para além dessas situações, o ciclo claro-escuro exerce uma influência marcante no sistema imune dos animais, sendo suas atividades arrastadas por esse ciclo.

A relação estabelecida entre o ciclo de luz e escuridão e o sistema imune está bem descrita em mamíferos (CARRILLO-VICO et al., 2005), mas em peixes essas investigações são raras, apesar da importância que tais informações têm para a pesquisa básica e aplicada, conforme Esteban et al. (2006).

Os estudos nesse campo de investigação têm apontado o caráter rítmico das células do sistema imunológico em diversas espécies analisadas. Melchart et al. (1992) desenvolveram pesquisa que demonstraram as variações diárias de neutrófilos em seres humanos. Registrou-se ritmicidade de células natural *killer* em ratos e *hamsters* (ARJONA et al., 2004; YELLON et al., 2005). Fortier et al. (2011) identificaram variação diária de células T, tanto *in vivo* quanto *in vitro* em camundongo. Bollinger et al. (2009) demonstraram ritmo da proliferação de células T em humanos, com níveis máximos à noite.

Em relação aos ritmos circadianos do sistema imune de peixes, a primeira pesquisa direcionada ao estudo da resposta imunológica parece ter sido desenvolvida por Psiscilla e Michael (1994), que avaliaram a resposta rítmica de anticorpos à albumina do soro bovino em tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*). Neste experimento, os níveis de anticorpos alcançaram picos às 12h e às 16h. Biswas et al. (2004), avaliando o efeito do fotoperíodo sobre o estresse, verificaram altos níveis de

linfócitos em tilápia do Nilo. Quando expostos a curto período de luz-escuro (6:6LD), os peixes exibiram mais linfócitos no sangue do que quando em fotoperíodo mais longo (12:12LD).

Na mesma linha de pesquisa, Esteban et al. (2006) submeteram as espécies Gilthead seabream (*Sparus aurata*) e o European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) a fotoperíodo claro-escuro de 12h de luz e 12h de escuridão (12:12LD). Assim, o soro dos peixes foi obtido para análises às 2h, às 8h (luz ligada), às 14h, às 20h (luz desligada) e às 8h. Os resultados mostraram que a resposta imune apresentou um padrão rítmico diário, mostrando a influência exercida pelo fotoperíodo sobre os parâmetros de atividades de lisozima, mieloperoxidase e do complemento. Embora tenham sido demonstradas diferenças entre as espécies, a lisozima seguiu também um padrão rítmico diário de atividade. Na espécie Gilthead seabream, aumentou durante o dia e decresceu à noite, tendo os maiores valores às 8h. No European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) foi observado um comportamento oposto com a lisozima sérica. Decresceu durante o dia e aumentou durante as horas da noite, com o valor mais alto às 20h, exatamente na fase escura. A atividade do complemento também se expressou ritmicamente. Alcançou altos valores durante o dia e valores mais baixos durante a noite na Gilthead seabream. O European sea bass apresentou valores semelhantes nas duas fases. Já a atividade da peroxidase exibiu um padrão contrário, ou seja, decresceu durante o dia e esteve aumentada à noite nas duas espécies estudadas. Para Esteban et al. (2006), esses resultados claramente indicaram que a atividade circadiana dos parâmetros imunológicos estudados podem estar relacionados aos níveis de melatonina expressos durante as fases do dia. O fotoperíodo afetou o sistema imune humoral nas duas espécies estudadas, o que leva os autores a apontarem a manipulação do ciclo claro-escuro como uma valiosa ferramenta para aprimorar o sistema imunológico e bem-estar do peixe de cultivo.

Kaplan et al. (2008) apresentaram a primeira evidência da variação rítmica diária na atividade de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por leucócitos de zebrafish (*Danio rerio*). Para isso, investigaram o padrão de leucócitos nessa espécie em fotoperíodo de 14:10LD. Os autores analisaram a fagocitose e a produção de espécie reativa de oxigênio por essas células. Os resultados mostraram que a cinética de ROS variou significativamente ao longo do dia. O pico de fagocitose para

as bactérias ocorreu durante a noite, às 2h, com decréscimo às 18h. Verificou-se, com esses achados, que variações diurnas ocorreram na atividade celular associada com o sistema imune inato em zebrafish. Os autores destacaram que o pico e os níveis mínimos dos dois parâmetros de produção de ROS e de participação na fagocitose ocorreram diariamente em um ponto de transição claro-escuro. Assim, é possível que fenômenos como a queda da atividade fagocitária no zebrafish durante a noite estejam influenciados pelo aumento nos níveis de melatonina na fase noturna.

Em pesquisa desenvolvida por Binuramesh e Michael (2011), foram identificadas variações diárias dos parâmetros imunológicos com tilápia (*Oreochromis mossambicus*). Foram investigados o padrão de comportamento sérico da lisozima, da peroxidase, globulina e cortisol. Os resultados apontaram um típico padrão dos níveis de cortisol, expressando alta concentração durante a manhã e baixa à noite, revelando um pico pela manhã cedo. Para os autores, esse padrão do cortisol foi o desencadeador das variações nas concentrações de lisozima, de peroxidase e de globulina. Outros trabalhos demonstram que leucócitos de peixes apresentam receptores para corticosteroides (MAULE e SCHRECK, 1991; WEYTS et al., 1998) e, portanto, Binuramesh e Michael (2011) inferiram que estes modularam suas funções em resposta à variação do cortisol. Este hormônio regula uma ampla variedade de processos, inclusive a resposta do sistema imunológico (BARNES, 2006). Pesquisas sustentam a ideia de interação estabelecida entre o sistema neuroendócrino com o sistema imunológico de vertebrados e muitas respostas neuroendócrinas exibem ritmos circanual e circadiano. Devido a essa estreita relação entre esses dois sistemas, é possível que alguns parâmetros imunológicos se expressem de forma rítmica (ESTEBAN, et al., 2013). A lisozima demonstrou pico à noite (22h) e se estendeu até as 6h. Um correspondente aumento ou decréscimo no número de granulócitos circulantes com a atividade de lisozima confirma que a variação diária de sua atividade pode ser devido à mudança no número de fagócitos, principalmente granulócitos e monócitos, que são duas das principais fontes de secreção de lisozima (BINURAMESH e MICHAEL, 2011). A peroxidase, nesse estudo, demonstrou uma tendência rítmica similar à da lisozima, com pico às 2h. Sua expressão correspondeu à variação no número de granulócitos. Portanto, a flutuação das células brancas do sangue pode ser um fator para mudanças na atividade da peroxidase.



O total de globulina demonstrou picos às 14h e às 18h e essa variação pode ser atribuída ao número de linfócitos circulantes, que demonstrou similar tendência ao nível da globulina. A variação no número total de linfócitos refletiu o padrão de aumento e decréscimo total de leucócitos circulantes (BINURAMESH e MICHAEL, 2011). Esses achados corroboram os resultados de De Pedro et al. (2005) que em estudos com a espécie tenca (*Tinca tinca*) registraram número total e diferencial de leucócitos com significativas flutuações diárias, variando em função da estação.

Estudo com o Atlântico halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) também avaliou mudanças diárias da lisozima, porém a longo prazo. Assim, um grupo de peixes foi submetido a um constante fotoperíodo de 16:8LD e outro grupo a 8:16LD, durante seis meses. Os resultados demonstraram que a manipulação do fotoperíodo não produziu diferenças nos níveis de lisozima, visto que ocorreu em relação apenas entre as estações, sendo que no verão os índices foram significativamente mais altos do que no inverno (BOWDEN et al., 2004).

A plasticidade do sistema circadiano permite aos organismos a otimização de suas funções fisiológicas e a coordenação entre diversos sistemas. Essa sincronia é fundamental para a manutenção da homeostase e, por outro lado, interrupções circadianas estão associadas a danos à saúde. (SCHERNHAMMER et al., 2003). O sistema imunológico é indispensável para a defesa do organismo contra infecções bacterianas, virais e outras doenças e, segundo Logan e Sarkar (2012), está firmemente associado à regulação circadiana.

#### **1.4.1 Peroxidase**

As peroxidases representam um grupo de enzimas que tem o peróxido de hidrogênio como substrato. São importantes agentes contra microrganismos patogênicos em mamíferos. Estão presentes dentro dos grânulos das células fagocíticas, sendo liberadas do fagossomo para o meio externo após fagocitose, quando então a peroxidase exercerá sua ação lítica (TORREILLES et al., 1996; RODRÍGUEZ et al., 2003). Os níveis dessa enzima presentes no sangue têm sido considerados um indicador da atividade de leucócitos circulantes (ESTEBAN et al. 2013). Estudos com peixes,

demonstraram que a atividade da peroxidase foi mais alta significativamente em seabream às 8h do que durante o resto do ciclo do dia, enquanto a espécie sea bass não apresentou diferença significativa para essa enzima durante o fotoperíodo (ESTEBAN et al., 2006). Binuramesh e Michael (2011), também investigando a atividade rítmica da peroxidase, em pesquisa desenvolvida com tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), descreveram a atividade rítmica noturna da peroxidase, com concentrações mais altas às 2 e 6 horas, na fase escura do fotoperíodo. Nesse estudo, os autores relacionaram este ritmo noturno da peroxidase aos níveis de corticosteroides.

Para Esteban et al. (2013), a influência do ciclo claro-escuro sobre os níveis de peroxidase no soro é variável de acordo com a espécie de teleósteo.

#### **1.4.2 IgM**

O sistema imune adaptativo dos peixes é semelhante ao dos mamíferos (DOOLEY e FLAJNIK, 2006), e como estes, os peixes agem contra diferentes grupos de patógenos produzindo anticorpos. A diferença entre os dois grupos reside no fato de que os peixes expressam três classes de imunoglobulinas, a IgM, a IgD e um terceiro isotipo, IgT (HANSEN et al., 2005). A IgM de teleósteo forma uma estrutura tetramétrica composta por quatro cadeias polipeptídicas, com cada par da cadeia pesada ligada covalentemente ao par da cadeia leve (WILSON et al., 1997). Os anticorpos dos teleósteos desempenham as funções de opsonização para fagocitose, da ativação da via do complemento e da neutralização de bactérias e vírus (TSUTSUI et al. 2013).

A imunoglobulina IgM representa o principal anticorpo da resposta imune humoral primária e secundária (WATTS et al., 2001). Esta imunoglobulina está presente no plasma, no muco e na bile de peixes. Também já foi identificada a produção de IgM no MALT (tecido linfóide associado à mucosa) no peixe mandarin (*Siniperca chuatsi*). Raros são os estudos que avaliam a resposta rítmica de anticorpos em peixes. Psiscilla e Michael (1994) avaliaram a resposta rítmica de anticorpos à albumina do soro bovino em tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*). Neste experimento, os níveis de anticorpos alcançaram picos às 12h e às 16h. Biswas et al. (2004), avaliando o efeito do fotoperíodo sobre o estresse em tilápia do Nilo,

constatarem maiores níveis de linfócitos quando estas foram expostas a curto período de luz-escuro (6:6LD), do que quando submetidas a fotoperíodo mais longo (12:12LD). Estudo com o salmão do Atlântico, com objetivo de avaliar o efeito da vacinação em juvenis dessa espécie, demonstrou que os níveis de IgM foram baixos durante o inverno, com os animais mantidos em fotoperíodo de 12:12LD, e aumentou quando os animais foram expostos ao período de luz contínua 24:0LD (MELINGEN e WERGELAND, 2002).

### **1.4.3 Citocinas**

“As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias” (ABBAS et al., 2008, p. 268). Trata-se de mediadores solúveis que exercem interações fundamentais entre as células do sistema imunológico de diferentes organismos.

Os estudos com citocinas têm sido desenvolvidos em peixes avaliando a resposta dessas proteínas aos diversos imunoestimulantes (ABDEL-TAWWAB e AHMAD, 2009; CHAKRABARTI et al., 2014). Entretanto, estudos que relacionam a expressão dessas proteínas às variações circadianas, parecem inexistentes. O fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que representa o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias e outros microrganismos infecciosos (ABBAS et al., 2008). A principal função fisiológica do TNF- $\alpha$  é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, bem como ativar essas células para erradicar microrganismos. A interleucina 1 (IL-1) é um importante mediador da resposta a micróbio invasor e dano a tecido. Esta citocina tem ação biológica semelhante ao TNF $\alpha$ , agindo como mediador da inflamação local, nas células endoteliais, aumentando a expressão de moléculas de superfície que promoverão a adesão de leucócitos. Segundo Low et al. (2003), essa citocina pode estimular a resposta imune por ativação de linfócitos ou induzir a liberação de outras citocinas que são capazes de ativar macrófago, célula NK e linfócitos. A interleucina 12 (IL-12) tem como principal função aumentar a secreção e a atividade do interferon gama (INF- $\gamma$ ) pelas células NK e pelos linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>). Além disso, acentua a atividade citotóxica de células NK

ativadas e linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). A IL12 é secretada por linfócitos B e por neutrófilos, após serem ativadas por células dendríticas e por macrófagos após a ativação por células apresentadoras de antígenos (APC) (ABBAS et al., 2008). O fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) é um grupo de proteínas que age na proliferação, diferenciação e migração celular, na regulação da função de célula imunitária, na angiogênese, bem como na remodelação e reparação tecidual (CHIN et al., 2004; LE et al., 2005; LI et al., 2006; McGEACHY e CUA, 2007). Quatro isoformas de TGF- $\beta$  têm sido identificadas em peixes. Conforme Marie et al. (2006), o TGF- $\beta$ 1 pode ser a forma predominante a desempenhar função no sistema imune. Genes de TGF- $\beta$ 1 têm sido clonados em muitas espécies de teleósteos, incluindo tilápia (*Oreochromis niloticus*) (ZANG et al., 2015), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (MAEHR et al., 2012) e carpa (*Cyprinus carpio*) (ZHAN e JIMMY, 2000). O TGF- $\beta$ 1 em tilápia foi altamente expressado em tecidos e células envolvidos no sistema imune, tais como rim e baço. Sugerindo, dessa forma, que o TGF- $\beta$ 1 desempenha papel relevante na função do sistema imune de tilápia. Altos níveis dessa citocina já foram registrados em brânquias de tilápia, órgão este exposto diretamente ao ambiente e, dessa forma, altamente vulnerável a infecções. Assim, a presença de TGF- $\beta$ 1 nas brânquias dessa espécie revela um estratégico papel protetor (ZANG et al., 2015).

Outros elementos, como as variáveis hematológicas, também estão envolvidos no bem-estar de peixes de cultivo, representando componentes importantes na homeostase desses animais. A investigação dos parâmetros hematológicos de peixes, constitui-se em uma ferramenta muito útil no diagnóstico de enfermidades, na identificação do estado fisiológico, nutricional e de estresse dos peixes de cultivo e assume relevância na avaliação do sistema imunológico (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004, 2007).

Os peixes apresentam um padrão cíclico da sua atividade fisiológica, que é influenciada pelo ciclo claro-escuro. Também o sistema hematológico desses animais é influenciado pelo fotoperíodo (LEONARDI e KLEMPAU, 2003). Os estudos sobre a expressão circadiana desses parâmetros ainda são raros. De Pedro et al. (2005) apresentaram resultados que indicam a existência de variações diárias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue do peixe tenca (*Tinca tinca*), sendo esses ciclos diários dependentes das estações do ano. Nesse estudo o número de eritrócito, o volume

globular (VG) e a hemoglobina exibiram um padrão semelhante na primavera e no verão, com valores altos durante a fase noturna do fotoperíodo. Para os autores, esses resultados estão relacionados ao padrão de atividade da tenca, que, segundo Herrero et al. (2003), se trata de uma espécie estritamente noturna, e assim, tal característica lhe impõe uma alta demanda respiratória durante a noite. Gallagher e Farrell (1998) consideram que em vertebrados, após aumento da atividade, há uma liberação de eritrócitos pelo baço e subsequente aumento do VG nesses animais.

Estudos realizados com o bagre tropical (*Clarias lazera*) revelaram um aumento de leucócitos totais nos períodos de maior incidência de luz (TAVARES e MORAIS, 2004). Variações anuais foram registradas na contagem de células vermelhas sanguíneas em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com os menores valores registrados no inverno e os maiores no verão (MORGAN et al., 2008). Segundo Baldisserotto (2013), o fotoperíodo é um componente essencial para o desenvolvimento da piscicultura, pois pode promover alterações fisiológicas nos peixes. Os fatores ambientais, como fotoperíodo, exercem grande influência sobre os mecanismos hematológicos dos peixes (TAVARES e MORAES, 2004).

Variações diárias, incluindo metabólitos, hormônios, alimentação e atividades locomotoras, têm sido descritos em peixes (ALI 1992; MADRID et al., 2001; REEBS 2002). Apesar da relevância da ritmicidade expressa nos parâmetros fisiológicos e comportamentais de peixes, poucos estudos abordam essa temática em relação aos parâmetros hematológicos.

### **1.5 Ritmos Diários da Atividade Locomotora de Peixes**

O ciclo diário claro-escuro é um importante sincronizador dos ritmos biológicos em peixes, os quais exibem um padrão de atividade que os classificam em diurnos (TOGUYENE et al., 1997; BLANCO-VIVES e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009; FORTES-SILVA et al., 2010), em noturnos (HERRERO et al., 2003; BAYARRI et al., 2004) ou crepusculares (HERRERO et al., 2003; SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006). Por outro lado, algumas espécies são dotadas de um sistema circadiano flexível e, com isso, são capazes de mudar de fases (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1995), tendo

a abrangência do seu comportamento alimentar não necessariamente restrita às fases de luz ou escuro (VERA et al., 2006).

Tais padrões de atividades resultam de longos períodos evolutivos nos quais os animais desenvolveram mecanismos de sobrevivência a partir de intensas forças seletivas, como aquelas geradas pela forte necessidade de fugir de predadores, de garantir sua nutrição e o sucesso reprodutivo (MADRID et al., 2001).

Em comparação com os vertebrados superiores, os peixes são mais flexíveis na expressão desses ritmos, os quais manifestam variação tanto entre as diferentes espécies, quanto dentro da mesma espécie, conforme assevera Madrid et al. (2001). O European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) é um teleósteo de fase dual, exibindo ritmos de alimentação noturna e diurna (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1995). Em condições de laboratório, esse peixe, oriundo da mesma desova, mostrou comportamento alimentar noturno em alguns tanques, mas, simultaneamente, em outros tanques demonstrou comportamento diurno.

Em algumas espécies, a locomoção está dissociada do padrão de alimentação, como é o caso do Goldfish (*Carassius auratus*), que apresenta atividade alimentar diurna e atividade locomotora noturna (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1996). Essa flexibilidade está presente também no comportamento da tilápia (*Oreochromis niloticus*), conforme Vera et al. (2009), cuja pesquisa identificou variação no padrão de atividade diária dessa espécie, resultado que contraria Toguyeni et al. (1997), para quem a tilápia apresenta comportamento estritamente diurno. A variação no comportamento desta espécie também foi verificada por Fortes-Silva et al. (2010), que demonstraram que tilápias mantidas em espaço individual apresentam intensa atividade durante o dia, mas preferem se alimentar à noite. Nesse experimento, as tilápias mantidas individualmente em tanques e submetidas a fotoperíodos de 12:12LD mudaram seu comportamento e passaram a se alimentar no período noturno.

As diversas espécies investigadas apresentam comportamentos que podem se manter inalterados ou, podem variar dentro da mesma espécie. A truta, por exemplo, é uma espécie predominantemente diurna (BOUJARD e LEATHERLAND, 1992), com seus ritmos biológicos sincronizados com a fase de luz, o que estimula seu comportamento alimentar. Já a tenca, *Tinca tinca* (HERRERO et al., 2003) é uma espécie estritamente noturna.

Além do ciclo claro-escuro, a alimentação é um importante sincronizador dos ritmos biológicos em animais (LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2010). Os primeiros estudos que buscaram compreender os ritmos diários de alimentação datam de 1942, no qual Hoar descreveu que Atlantic salmon (*Salmo salar*) e brook trout (*Salvelinus fontinalis*) têm preferência por se alimentar durante a fase de luz do ciclo, durante o verão. O advento de alimentadores por autodemanda (ROZIN e MAYER, 1961), duas décadas depois, representa uma importante ferramenta para estudos de ritmos alimentares em peixes e, assim, o padrão diário do comportamento alimentar tem sido descrito para várias espécies de peixes (MADRID et al., 2001; REEBS, 2002).

Quando o alimento é fornecido em um mesmo horário diariamente, os animais apresentam um comportamento denominado de atividade antecipatória alimentar (AAA), que consiste num aumento da atividade locomotora algumas horas antes do horário corriqueiro da alimentação (MISTLBERGER, 1994). A AAA permite aos animais otimizar seus processos digestivos e metabólicos (DAVIDSON e STEPHAN, 1999). A vantagem desse fenômeno reside no fato de que se o organismo consegue antecipar os processos digestivos, irá aprimorar a aquisição e utilização de nutrientes. Diversos peixes têm demonstrado essa habilidade sincronizando seu comportamento e fisiologia ao horário da alimentação (LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2010). O goldfish (*Carassius auratus*), poucas horas antes do horário da alimentação, exhibe aumento da atividade locomotora, da atividade de amilase e da secreção de neuropeptídeo Y (VERA et al., 2007). Segundo Reebbs e Lague (2000), esse fenômeno é controlado por osciladores endógenos e representa uma demonstração da sincronização do comportamento animal à alimentação, além do que, caracteriza-se como uma vantagem adaptativa com a qual o animal melhora sua aquisição e utilização de nutrientes. Diversos estudos já mostraram a atividade antecipatória dos peixes, a saber: goldfish *Carassius auratus* (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1997; ARANDA et al., 2001; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 2001; VERA et al., 2007; LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009) e seabream (*Sparus aurata*) (MONTROYA et al., 2010).

O sistema de temporização circadiano dos seres vivos lhes confere a capacidade de antecipar e responder aos desafios ambientais diários, e para serem funcionais no meio onde vivem, os organismos devem se sincronizar com os ciclos ambientais diários (TOMOTANI e ODA, 2012).

Embora se considere que o ritmo de ingestão alimentar seja controlado endogenamente, ele pode ser arrastado por diversas variáveis ambientais, sincronizando-os com suas fases (BOUJARD e LEATHERLAND, 1992; MADRID et al., 2001). Fotoperíodo, temperatura, estações climáticas, alimentação, intensidade luminosa são alguns dos fatores desencadeadores desse processo (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1995, 1998; FRASER et al., 1995; LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2010).

O ciclo circadiano se destaca como o mais estudado dentre os ciclos por se tratar do mais importante fator ambiental sincronizador dos ritmos biológicos e por sua presença registrada, tanto nos mais variados grupos de vertebrados quanto invertebrados (VERA et al., 2009). Pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a manifestação desses ritmos, buscando confirmar e entender os ritmos locomotor, reprodutivo e alimentar e os ritmos de hormônios neuroendócrinos (SANCHEZ-VAZQUEZ, 1996; OLIVEIRA et al., 2009; KULCZYKOWSKA e SÁNCHEZ-VAZQUEZ, 2010). Estas pesquisas evidenciam a importância do ciclo claro-escuro como sincronizadores do ritmo biológico. O conhecimento do padrão de atividade locomotora das espécies é fundamental para sua criação em cativeiro, sobretudo no momento de escolher a espécie mais adequada aos aspectos da região de cultivo, fatores determinantes para o sucesso do empreendimento.

Há registros de variações diárias nos níveis de glicose, de cortisol, de hormônios, de enzimas digestivas, de lactato e triglicérides, associadas à sincronização pelo ciclo de alimentação (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1998; VERA et al., 2007; LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009; MONTOYA et al., 2010; DEL POZO et al., 2012). A glicose exerce um papel importante ao suprir a demanda de energia dos peixes, que mantêm sua glicemia por absorção digestiva, como também por meio das gliconeogênese e glicogenólise (POLAKOF et al., 2007). Trata-se de um carboidrato que funciona como um recurso importante para o cérebro, que o utiliza como principal fonte energética (SOENGAS, 2002). Peixes como a tenca (*Tinca tinca*), a truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), o Gilthead seabream (*Sparus aurata*) e a European eel (*Anguilla anguilla*) têm apresentado variações diárias nos níveis desse carboidrato (DE PEDRO et al., 2005; POLAKOF et al., 2007; MONTOYA, et al., 2010; LÓPEZ-OLMEDA et al., 2012).



## 1.6 Ritmos Diários das Atividades das Enzimas Digestivas em Peixes

As enzimas são proteínas que agem como catalisadores biológicos que promovem redução na energia de ativação necessária a uma reação química e, assim, no aumento da velocidade da reação, interferindo no metabolismo dos organismos vivos. A reação enzimática se dá mediante a quebra molecular das proteínas, lipídios e carboidratos, e a absorção desses através do epitélio intestinal (NELSON e COX, 2012).

De forma semelhante a outros sistemas fisiológicos, o sistema digestivo dos peixes apresenta um padrão rítmico de atividade de suas enzimas. Apesar da existência de muitos estudos que avaliam a atividade das enzimas do ponto de vista da alimentação, da fase de vida, do estado reprodutivo e do sexo, somente recentemente surgiram trabalhos que buscam investigar o caráter rítmico das enzimas em teleósteos, considerando o efeito do horário de alimentação sobre essa atividade (VERA et al., 2007; MONTOYA et al., 2010; LÓPEZ-OLMEDA et al., 2010; DEL POZO et al., 2012).

A atividade das enzimas proteases e amilases pode ser um dos mais importantes parâmetros que determina a eficiência de uma dada dieta, otimizando o crescimento e a utilização do alimento pelo animal (LEMIEUX et al., 1999; DEBNATH et al., 2007). Algumas espécies estudadas têm mostrado oscilação rítmica diária nas atividades dessas proteínas.

O Gilthead seabream (*Sparus aurata*) demonstrou um ritmo diário da atividade das enzimas digestivas (MONTOYA et al., 2010). Nessa pesquisa, os peixes alimentados em horário fixo demonstraram uma antecipação da secreção de amilase e protease alcalina, com maior atividade observada 4 horas antes do horário da alimentação. Observou-se também que essas enzimas demonstraram um ritmo diário da atividade. Por outro lado, os peixes que foram submetidos à alimentação em horários aleatórios demonstraram maior nível de atividade de amilase 1 hora depois do fornecimento da alimentação. Nesse grupo, os peixes demonstraram padrão arrítmico de atividade de amilase. Além disso, os peixes do grupo que foi alimentado em horário fixo apresentaram maior atividade com diferença estatística da enzima amilase do que os que foram alimentados de forma aleatória. Os níveis da atividade da protease alcalina não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos experimentais. Em relação à

atividade da protease ácida, esta não demonstrou ritmo diário nem foram encontradas diferenças estatísticas tanto na média diária quanto na média entre os grupos. A eel (*Anguilla anguilla*) também exibiu ritmo da atividade da protease alcalina em estudos de López-Olmeda et al. (2012). A espécie European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) demonstrou padrão rítmico diário da amilase (DEL POZO et al., 2012).

O entendimento acerca dos processos digestivos é fundamental para a elaboração de alimentos nutricionalmente completos para peixes. O domínio desta informação certamente contribuirá para os processos que estão envolvidos na criação de peixes, permitindo que os criadores aprimorem as técnicas e consigam aumentar sua margem de lucro e, sobretudo, oferecer peixes de qualidade para o mercado consumidor.

### **1.7 Tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

A tilápia é uma das espécies de teleósteos cuja produção tem alcançado grande destaque na aquicultura, constituindo-se como uma das espécies mais produzidas em todo o mundo. O sucesso do seu cultivo ocorre devido à grande resistência desses peixes aos baixos níveis de oxigênio e aos elevados níveis de amônia dissolvidos na água (ALCESTE e JORRY, 1998), ao rápido crescimento, à boa conversão alimentar e à boa aceitação de ração artificial desde a fase larval (MEURER et al., 2000).

Em virtude dessas características, sobretudo por apresentar excelente desempenho de crescimento, sua importância comercial tem se ampliado e sua criação tem se registrado em mais de 85 países do globo. Nas últimas décadas, sua produção aumentou de 332.186 toneladas em 1990 para 4.080.898 toneladas em 2012 (FAO, 2014), entretanto, esse perfil favorável ao cultivo não é o único motivo para o crescimento de sua produção. Ainda de acordo com a FAO, mais da metade dos recursos pesqueiros marinhos, em todo o mundo, atingiram sua máxima possibilidade de exploração, estão esgotados ou em recuperação, fatos estes que criam uma necessidade de cultivo, pois muitos países em desenvolvimento encontram no pescado sua principal fonte de proteína animal.

Embora diferentes espécies de tilápia sejam cultivadas, as mais populares incluem a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia azul (*Oreochromis aureus*) e a tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*). De acordo com Oliveira et al. (2007), a tilápia, peixe de origem africana, foi introduzida no Brasil na metade do século XX (*Tilapia rendalli*), mas, somente em 1971, por meio do DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas), foi desenvolvido um programa de criação de tilápia em reservatórios públicos da região Nordeste. Esta experiência inicial, apesar de não ter sido bem-sucedida, foi primordial para o início da aquicultura no país. Somente a partir dos anos 2000 o setor industrial da tilapicultura brasileira se expandiu, e, para isso, contribuíram a introdução de uma linhagem melhorada e o uso da técnica de incubação artificial, da reversão sexual e do desenvolvimento de outras técnicas de manejo (OLIVEIRA et al., 2007).

Se comparados às espécies carnívoras, peixes onívoros como a tilápia, por suas características morfológicas e fisiológicas, aceitam bem a utilização de rações com altos percentuais de ingredientes vegetais, pois processam bem os carboidratos e a proteína (TENGGARONKUL et al., 2000). De acordo com Fagbenro (1998) as tilápias se destacam entre as espécies onívoras na utilização de aminoácidos de fontes proteicas de origem vegetal. Essa boa aceitação do alimento de base vegetal impacta positivamente a produção, pois reduz os custos com alimentação, o que permite o crescimento do setor.

Trata-se de uma espécie que, além de ser de fácil adaptação ao cultivo, é resistente a doenças e apresenta elevados índices de sobrevivência. É um peixe que desfruta de boa aceitação no mercado consumidor por sua carne apresentar baixos teores de gordura, ser saborosa e de boa qualidade (BARBOSA e ARAÚJO, 2009). Além dessas características, de acordo com Meurer et al. (2003), a ausência de espinhos musculares em “Y” é uma característica bastante atraente para a industrialização, pois facilita o processo da filetagem.

Além da boa aceitação como alimento para humanos em forma de filé e hambúrgueres, a espécie tem aproveitamento, também, em outros segmentos comerciais, que utilizam seu couro na fabricação de calçados e outros acessórios (BARBOSA e ARAÚJO, 2009), além de ser apreciada como isca nos pesque-pagues.

A atividade aquícola brasileira tem apresentado números bastante relevantes e se mostra bastante promissora, conforme dados oficiais. A piscicultura continental

registrou uma produção de 474.330 toneladas em 2014, um crescimento da ordem de 20,9% em relação ao ano anterior. Desse total de peixes produzido, a tilápia foi responsável por 41,9%, contribuindo com 198.664 toneladas, representando um incremento de 17,3%, em relação à produção obtida em 2013, que foi de 169.306 (IBGE, 2014).

No ano de 2014, a região Norte despontou como uma das principais produtoras de peixes, entretanto, o Nordeste concentra um grande polo produtor de pescado cultivado em águas continentais. Trata-se de uma região que apresenta elementos propícios à atividade, pois tem clima favorável, apresenta áreas de cultivo apropriadas, tem um bom mercado consumidor e, conforme destacam Barbosa e Araújo (2009), há laboratórios de produção de alevinos, centros de beneficiamento, fábricas de gelo etc., estruturas que contribuem para o crescimento da atividade. Há que se destacar, porém, que toda essa tecnologia já desenvolvida carece de mais estudos que permitam o controle de doenças, principalmente as infecciosas, comuns na criação em cativeiro e também o desenvolvimento de tecnologias alimentares mais eficientes e a baixo custo.

A expansão da atividade de cultivo de peixes e a busca da máxima produtividade utiliza a estratégia de manter altas densidades populacionais em sistemas limitados de criação, o que provoca uma maior susceptibilidade a doenças e, conseqüentemente, a perdas e altas taxas de mortalidade nos sistemas intensivos de cultivo de peixes. Fatores como estresse, má nutrição, acúmulo de resíduos orgânicos nos viveiros ou tanques, baixa qualidade da água e mudanças abruptas da temperatura são elementos que contribuem para o desequilíbrio da saúde do peixe. Assim, o controle sanitário é fundamental para que produtos aquícolas de qualidade sejam ofertados, de modo a manter o mercado atual e conquistar novos espaços de comercialização, disponibilizando um produto de alta qualidade ao mercado consumidor.

A avaliação da resposta rítmica diária dos peixes à vacinação - resposta esta influenciada pelo ciclo claro-escuro - poderá subsidiar o cultivo intensivo desses animais. Esse conhecimento pode apontar o melhor momento para realizar as práticas de manejo na piscicultura, diminuindo a condição de estresse dos indivíduos, evitando altas mortalidades, uma vez que reduz os efeitos adversos das práticas comuns realizadas em determinadas horas do dia nas pisciculturas.

Poucos trabalhos com a espécie tilápia do Nilo, peixe que apresenta um grande destaque na aquicultura mundial, abordam as relações entre ritmos circadianos e a atividade locomotora, a alimentação e as atividades das enzimas digestivas, entretanto, tais informações são determinantes para que se conheçam a fisiologia e o comportamento animal em diferentes fotoperíodos. O desenvolvimento e a valorização desse processo contribui para a ampliação do entendimento e a definição de práticas de manejo mais adequadas nas pisciculturas. Tais abordagens trazem como consequência maiores índices de produção aquícola e amplia a qualidade dos produtos e o bem-estar animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.
- ABDEL-TAWWAB Mohsen; AHMAD Mohammad H. Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila* **Aquac. Res.**, v. 40, n. 9, p. 1037-1046, June, 2009.
- ALCESTE, C.; JORRY, D. Análisis de las tendencias actuales em comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norteamérica y la Union Europea. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA, 1.; 1998, Recife. **Anais...** Recife: SIMBRAQ, 1998. p. 349.
- ALI, M.A **Rhythms in fishes**. New York: Plenum Press, 1992. 236p.
- ARANDA, A.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. **J. Biol. Rhythm**, v. 16, n. 1, p. 50-57, Feb., 2001.
- ARJONA, A.; BOYADJIEVA, N.; SARKAR, D.K. Circadian rhythms of granzyme B, perforin, IFN-gamma, and NK cell cytolytic activity in the spleen: effects of chronic ethanol. **J. Immunol.**, v. 172, n. 5, p. 2811-2817, Mar., 2004.
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 25, p. 11-28, 1960.
- ASCHOFF, J. **Handbook of behavioral neurobiology 4: Biological Rhythms**. New York: Plenum Press, 1981.
- ASCHOFF, J. Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. **Adv. Biosci. Trends Chronobio.**, v. 73, p. 149-161, 1988.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Rio Grande do Sul: Editora UFSM, 2013.
- BARBOSA, A.; ARAÚJO, C. **Cultivo de tilápias em gaiolas**. Sistemas de produção, 07, Governo do Estado do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- BARNES, P.J. Corticosteroid effects on cell signalling. **Eur. Respir. J.** v. 27, n. 2, p. 413-426. Feb., 2006.
- BAYARRI, M.J.; MUÑOZ-CUETO, J.A.; LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; VERA, L.M.; ROL de LAMA, M.A.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Physiol. Behav.**, v. 81, n. 4, p. 577-583, June, 2004.
- BINURAMESH, C. R.; MICHAEL, D. Diel variations in the selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 30, n. 3, p. 824-829, Mar., 2011.
- BISWAS, A.K.; MAITA, M; YOSHIZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. **J. Fish Biol.**, v. 65, n. 3, p. 811-821, Sept., 2004.
- BLANCO-VIVES, B.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. **Physiol. Behav.** v. 98, n. 3, p. 268-275, Sept., 2009.
- BOLLINGER, T.; BOLLINGER, A.; SKRUM, L.; DIMITROV, S.; LANGE T.; SOLBACH, W. Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 155, n. 2, p. 231-238, Feb., 2009.
- BOUJARD T.; LEATHERLAND, J.F. Demand-feeding behaviour and diel pattern of feeding activity in *Oncorhynchus mykiss* held under different photoperiod regimes. **J. Fish Biol.**, v. 40, n. 4, p. 535-544, Apr., 1992.

- BOWDEN, T.J.; BUTLER, R.; BRICKNELL, I.R. Seasonal variation of serum lysozyme levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Fish Shellfish Immunol.**, v. 17, n. 2, p. 129-135, Aug., 2004.
- BOZEK, K., RELOGIO, A., KIELBASA, S.M., HEINE, M., DAME, C., KRAMER, A., HERZEL, H. Regulation of clock-controlled genes in mammals. **PLoS One**. v. 4, n.3, e4882, Mar., 2009.
- BUHR, E.D.; TAKAHASHI, J.S. Molecular components of the Mammalian circadian clock. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 217, p. 3-27, Oct., 2013.
- CARR, A. J.; TAMAI, T. K.; YOUNG, L. C.; FERRER, V.; DEKENS, M. P.; WHITMORE, D. Light reaches the very heart of the zebrafish clock. **Chronobiol. Int.**, v. 23, n. 1-2, p. 91-100, 2006.
- CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J.M.; LARDONE, P.J.; REITER, R.J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine.**, v.27, n.2, p.189-200, July, 2005.
- CHAKRABARTI, R.; SRIVASTAVA, P. K.; VERMA, N.; SHARMA, J.G. Effect of seeds of *Achyranthes aspera* on the immune responses and expression of some immune-related genes in carp *Catla catla*. **Fish Shellfish Immunol.** v. 41, n. 1, p.64-69, Nov., 2014.
- CHIN, D.; BOYLE, G.M.; PARSONS, P.G.; COMAN, W.B.; What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? **Br. J. Plast. Surg.**, v. 57, n. 3, p. 215–221, Apr., 2004.
- CYMBOROWSKI, B. Introduction to Circadian Rhythms. In: KULCZYKOWSKA, E.; WLODZIMIERZ, P.; KAPOOR, B.G. **Biological clock in fish**. Enfield: Science Publishers, 2010, p. 1-2.
- DAAN, S. Adaptive daily strategies in behavior. In: ASCHOFF, J. **Handbook of Behavioral Neurobiology 4: biological rhythms**. New York: Plenum Press, 1981, p. 275-298.
- DAVIDSON, A.J.; STEPHAN, F.K. Plasma glucagon, glucose, insulin and motilin in rats anticipating daily meals. **Physiol. Behav.**, v. 66, n. 2, p. 309-315, Apr., 1999.
- DE PEDRO, N.; GUIJARRO, A.I.; LÓPEZ-PATIÑO, M.A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; DELGADO, M.J. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical. **Aguac. Res.**, v. 36, n. 12 p. 1185-1196, Sept., 2005.
- DEBNATH, D.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; YENGGOKPAM, S.; BARUAH, K.; CHOUDHURY, D.; VENKATESHWARLU, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. **Comp. Biochem. Physiol.** B, v. 146, n. 1, p. 107-114, Jan., 2007.
- DeCOURSEY, P.J. The behavioral ecology and evolution of biological timing systems. In: DUNLAP, J.C., LOROS, J.J., DeCoursey P.J. **Chronobiology: biological timekeeping**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004, p. 27-65.
- DEL POZO, A.; MONTOYA, A.; VERA, L.M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. **Physiol. Behav.** v. 106, n. 4, p. 446-450, June, 2012.
- DOOLEY H.; FLAJNIK, M.F. Antibody repertoire development in cartilaginous fish. **Dev Comp Immunol.** v. 30, n. 1-2, p. 43-56, 2006.
- EKSTRÖM, P.; MEISSL, H. The pineal organ of fishes. **Rev. Fish Biol. Fish.** v.7, n. 2 p. 199-284, June, 1997.
- ERIKSSON, L.O.; van VEEN, T. Circadian rhythms in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Teleostei): Evidence for an endogenous rhythm in feeding, locomotor and reaction time behaviour. **Can. J. Zool.**, v. 58, n. 10, p. 1899-1907, 1980.
- ESTEBAN, M.A.; CUESTA, A.; CHAVES-POZO, E.; MESEGUER, J. Influence of melatonin on the immune system of fish: a review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 4 p.7979-7999, Apr., 2013.

- ESTEBAN, M.A.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; MESEGUER, J. Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. **J. Pineal Res.** v. 41, n. 3, p. 261-266, Oct., 2006.
- FAGBENRO, O. Apparent digestibility of various legumes seed meals in Nile tilapia diets. **Aquac. Int.**, v. 6, n. 1, p. 83-87, Jan., 1998.
- FALCÓN, J.; BESSEAU, L.; SAUZET, S.; BOEUF, G. Melatonin effects on the hypothalamopituitary axis in fish. **Trend. Endocrin. Met.**, v.18, n. 2, p. 81-88, Mar., 2007.
- FÁLCÓN, J.; MIGAUD, H.; MUÑOS-CUETO, J.A.; CARRILLO, M. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 165, n. 3, p. 469-482, Feb., 2010.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture; **FAO**, Roma, Italy, 2014.
- FORTES-SILVA, R.; MARTÍNEZ, F.J.; VILLARROEL, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. 2010a. Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v, 156, n. 4, p. 445-450, Aug., 2010a.
- FORTIER, E.E.; ROONEY, J.; DARDENTE, H.; HARDY, M.P.; LABRECQUE, N.; CERMAKIAN, N. Circadian variation of the response of T cells to antigen. **J. Immunol.** v. 187, n. 12, p. 6291-6300, Dec., 2011.
- FRASER, N.H.C.; J. HEGGENES, N.B.; METCALFE J.E. THORPE. Low summer temperatures cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. **Can. J. Zool.**, v.73, n. 3, p.446-451, 1995.
- GALLAUGHER, P.; FARREL, A. P. Hematocrit e blood oxygen-carrying capacity. In: PERY, S.F.; TUFTS, B. **Fish respiration**. New York: Academic Press., 1998, p. 185-227.
- GOTO, K.; LAVAL-MARTIN, D.L.; EDMUNDS, L.N.JR. Biochemical modelling of a autonomously oscillatory circadian clock in *Euglena*. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1284-1288, June, 1985.
- HANSEN, J.D.; LANDIS, E.D.; PHILLIPS, R.B. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 19, p. 6919-6924, May, 2005.
- HERRERO, M.J.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). **Chronobiol. Int.**, v.20, n.6, p.1001-1017, Nov., 2003.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão/IBGE. v. 42, p.1-39, 2014.
- IDDA, M.L.; BERTOLUCCI, C.; VALLONE, D.; GOTHILF, Y.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; FOULKES, N.S. Circadian clocks: lessons from fish. **Progr. Brain Res.**, v.199, p. 49-57, 2012.
- JORES, A. The origins of chronobiology: an historical outline. **Chronobiology**, v. 2, p. 155-159, 1975.
- KAPLAN, J.E.; CHRENEK, R.D.; MORASH, J.G.; RUKSZNIS, C.M.; HANNUM, L.G. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v.151, n.4, p.726-30, Aug., 2008.
- KO, C.H.; TAKAHASHI, J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock, **Hum. Mol. Genet.** v. 15 Spec, n. 2, p. 271-277, 2006.
- KONOPKA, R.J.; BENZER, S. Clock mutants of drosophila melanogaster. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 68, n. 9, p.2112-2116, Sept., 1971.



- KULCZYKOWSKA, E.; SÁNCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. **Aquac. Res.** v. 41, n. 5, p. 654-667, Apr., 2010.
- LE, Y.; YU, X.; RUAN, L.; WANG, O.; QI, D.; ZHU, J.; LU, X.; KONG, Y.; CAI, K.; PANG, S.; SHI, X. The immunopharmacological properties of transforming growth factor beta. **Int. Immunopharmacol.**, v. 5, n. 13-14, p. 1771-1782, Dec., 2005.
- LEMIEUX, H.; BLIER, P.; DUTIL, J.D. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? **Fish Physiol. Biochem.**, v. 20, n. 4, p. 293-303, May, 1999.
- LEONARDI, M.O.; KLEMPAU, A.E. Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 581- 591, May, 2003.
- LI, M.O.; WAN, Y.Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A.K.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v.24, p.99-146, 2006.
- LIMA, L.E.B.; VARGAS, N.N.G. O relógio biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. **Revista da Biologia**, v. 12, n. 2, p. 1-7, jun., 2014.
- LOGAN, R.W.; SARKAR, D. K. Circadian nature of immune function. **Mol. Cell.Endocrinol.** v. 349, n. 1, p. 83-90, Feb., 2012.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; BLANCO-VIVES, B.; APARICIO, R.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Daily rhythms of digestive physiology, metabolismo and behaviour in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquacult. Int.** v. 20, n. 6, p. 1085-1096, May, 2012.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. In: KULCZYKOWSKA, E.; POPEK, W.; KAPOOR, B.G. (Eds.), Feeding rhythms in fish: from behavioral to molecular approach. **Biological clock in fish**. Science Publishers, Enfield, NH, USA, p. 155-184, 2010.
- LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; EGEA-ÁLVAREZ, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? **Physiol. Behav.**, v.96, n.5, p.631-636, Mar., 2009.
- LOW, C.; WADSWORTH, S.; BURRELLS, C.; SECOMBES, C.J. Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet. **Aquaculture** v. 221, n. 1-4, p. 23-40, May, 2003.
- MADRID, J. A.; BOUJARD, T.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Feeding rhythms. In: HOULIHAN, D.; JOBLING, M.; BOUJARD, T. (Eds.). Food Intake in Fish. Oxford: **Blackwell Science**, p. 189-215, 2001.
- MAEHR, T.; WANG, T.; GONZÁLEZ, V.J.L.; WADSWORTH, S.; SECOMBES, C.J. Cloning and expression analysis of the transforming growth factor-beta receptors type 1 and 2 in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 37, n.1, p.115-126, May, 2012.
- MARQUES, M.D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação temporal. In: MARQUES, N; MENNA-BARRETO. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003.
- MAULE, A.G.; SCHRECK, C.B. Stress and cortisol treatment changes affinity and number of glucocorticoid receptors in leucocytes and gill of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 84, n.1, p. 83-93, Oct., 1991.
- McGEACHY, M.J.; CUA, D.J., T cells doing it for themselves: TGF-beta regulation of Th1 and Th17 cells. **Immunity**, v. 26, n. 5, p. 547-549, May, 2007.

- MELCHART, D.; MARTIN, P.; HALLEK, M.; HOLZMANN, M.; JURCIC, X.; WAGNER, H. Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults. **Chronobiol. Int.**, v. 9, n. 1, p. 35-45, 1992.
- MELINGEN, G.O.; WERGELAND, H.I. Physiological effects of an oil-adjuvanted vaccine on out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. **Aquaculture**, v. 214, n. 1-4, p. 397-409, Nov., 2002.
- MENAKER, M.; MOREIRA, L. F.; TOSINI, G. Evolution of circadian organization in vertebrates. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 30, n. 3, p.305-313, 1997.
- MENNA-BARRETO, L. O tempo na biologia. MARQUES, N; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003.
- MESEGUER, C., RAMOS, J., BAYARRI, M. J., OLIVEIRA, C.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Light synchronization of the daily spawning rhythms of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) kept under different photoperiod and after shifting the ld cycle. **Chronobiol. Int.**, v. 25, n. 5, p. 666-679, Sept., 2008.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Digestibilidade aparente de alguns alimentos protéicos pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **R. Bras. Zootec**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1801-1809, 2003. Suplemento 2.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, W. R. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 479-484, June, 2000.
- MISTLBERGER, R.E. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 171-195, 1994.
- MONTOYA, A.; LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; GARAYZAR, A.B.S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light–dark cycle. **Physiol. Behav.** v. 101, n. 1, p. 101-107, Aug., 2010.
- MOORE-EDE, M.C.; SULZMAN, F.M.; FULLER, C.A. **The clocks that time us: physiology of the circadian timing system**. Cambridge: Harvard University Press, 1982.
- MORGAN, A.L.; THOMPSON, K.D.; AUCHINACHIE, N.A.; MIGAUD, H. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 25, n. 6 p. 791-799, Dez., 2008.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NIKAIDO, Y.; ALURU N.; MCGUIRE, A.; PARK, Y-J.; VIJAYAN, M.M.; TAKEMURA, A. Effect of cortisol on melatonin production by the pineal organ of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 155, n. 1, p. 84-90, Jan., 2010.
- NIKAIDO, Y.; UEDA, S; TAKEMURA, A. Photic and circadian regulation of melatonin production in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. Physiol. A.** v. 152, n. 1, p. 77-82, Jan., 2009.
- OLIVEIRA, C.; DINIS, M.T.; SOARES, F.; CABRITA, E.; POUÇÃO-FERREIRA, P.; SÁNCHEZVÁZQUEZ, F.J. Lunar and daily spawning rhythms of Senegal sole (*Solea senegalensis*). **J. Fish. Biol.**, v. 75, n. 1, p. 61-74, July, 2009.
- OLIVEIRA, E. G.; SANTOS, F. J. S.; PEREIRA, A. M. L.; LIMA, C. B. Produção de tilápia: mercado, espécie, biologia e recria. Teresina: EMBRAPA, 2007. (**Circular Técnica 45**).

Disponível em <[http://www.cpamn.embrapa.br/publicacoes/new/circular/circular\\_pdf/circular\\_45.pdf](http://www.cpamn.embrapa.br/publicacoes/new/circular/circular_pdf/circular_45.pdf)>. Acesso em 14 mar. 2016. ISSN 0104-7633.

PANDO, M.P.; SASSONE-CORSI, P. Signaling to the mammalian circadian clocks: in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. *Sci. STKE*. v. 2001, n.107, Nov., 2001.

POLAKOF, S.; MÍGUEZ, J.M.; SOENGAS, J.L. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A*. v. 147, n. 2, p. 363-374, June, 2007.

PSISCILLA, A.S.; MICHAEL, R.D. Diel variations in antibody response to bovine serum albumin in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Indian J. Exp. Biol.* v. 32, p. 474-477, 1994.  
RAHMAN, M.S.; TAKEMURA, A.; PARK Y.J.; TAKANO, K. Lunar cycle in the reproductive activity in the forktail rabbitfish. *Fish Physiol. Biochem.* v. 28, n.1, p. 443-444, Mar., 2003.

REEBS, S. G. Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Ver. Fish Biol. Fisher.* v.12, p. 349-371, 2002.

REEBS, S.G.; LAGUE, M. Daily food-anticipatory activity in golden shiners: a test of endogenous timing mechanisms. *Physiol. Behav.* v. 70, p. 35-43, 2000.

RENNER, M. Neue versuche über den zeitsinn der honigbiene. *Z. Vergl. Physiol.* v. 40, n, 1, p. 85-118, Jan., 1957.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, v. 418, n. 6901, p. 935-941, Aug., 2002.

RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, v. 272, n. 1, p. 415-423. May, 2003.

ROSENWASSER, A.M., Functional neuroanatomy of sleep and circadian rhythms. *Brain Res. Rev.* v. 61, n. 2 281-306, Oct., 2009.

ROTENBERG, L.; MARQUES, N. MENNA-BARRETO, L. História e perspectivas da cronobiologia. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO (Org). *Cronobiologia: princípios e aplicações*. 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003. p. 31-53.

ROZIN, P.; MAYER, J. Regulation of food intake in the goldfish. *American J. Physiol.*, v. 201, p. 968-974, 1961.

SÁNCHEZ J.A.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Molecular cloning, tissue distribution, and daily rhythms of expression of *per1* gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Chronobiol. Int.* v. 27, n. 1, p. 19-33, 2010.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; ARANDA, A; MADRID, J.A. Differential effects of meal size and food energy density on feeding entrainment in goldfish. *J. Biol. Rhythm*, v.16, n.1, p.58-65, Feb., 2001.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; AZZAYDI M.; MARTÍNEZ F.J., ZAMORA S. MADRID, J.A. Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol. Int.*, v. 15, n. 6, p. 607-622, Nov., 1998.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MADRID, J.A.; ZAMORA S.; TABATA M. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A.*, v. 181, n. 2, p. 121-132. July, 1997.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MADRID J.A., ZAMORA S., IIGO M.; TABATA, M. Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol. Behav.*, v. 60, n. 2, p. 665-674, Aug., 1996.

- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J.; MADRID, J.A.; ZAMORA S. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand feeding pattern. **J. Biol. Rhythms**, v.10, n. 3 p. 256-266, Sept., 1995
- SAUNDERS, D. S. **Insect clocks**. 2. ed. Oxford: Pergamon Press, 1982.
- SCHERNHAMMER, E.S.; LADEN, F.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; HUNTER, D.J.; KAWACHI, I.; FUCHS, C.S.; COLDITZ, G.A. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, n. 11, p. 825-828, June, 2003.
- SCHILDKNECHT, H. Turgorins, hormones of the endogenous daily rhythms of higher organized plants – detection, structure, synthesis, and activity. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 22, n. 9, p. 695-710, Sept., 1983.
- SCHULZ, U.H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Braz. J. Biol.**, v. 66, n. 2, p. 565-574, May, 2006.
- SETH, M.; MAITRA, S.K. Photoreceptor proteins and melatonin rhythm generating AANAT in the carp pineal: Temporal organization and correlation with natural photo-thermal cues. **J. Photochem. Photobiol. B**. v. 99, n. 1, p. 21-28, Apr., 2010.
- SITJÀ-BOBADILLA, A., PEÑA-LLOPIS, S., GÓMEZ-REQUENI, P., MÉDALE, F., KAUSHIK, S., PÉREZSÁNCHEZ, J. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on nonspecific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 387-400, Sept., 2005.
- SOENGAS, J.L.; ALDEGUNDE, M. Enrgy metabolism of fish brain. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 131, n. 3, p. 271-296, Mar., 2002.
- TAKEMURA, A.; SUSILO, E.S.; RAHMAN, M.D.; MORITA, M. Perception and possible utilization of moonlight intensity for reproductive activities in a lunar-synchronized spawner, the golden rabbitfish. **J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.**, v. 301, n. 10, p. 844-851, Oct., 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **J. Fish Biol.**, v. 71 n. 2, p. 383-388, Aug., 2007.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Editora Eletrônica e Arte Final, 2004. 144p.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, R.; SMITH, S.A. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 182 n. 3-4, p. 317-327, Feb., 2000.
- TOMOTANI, B. M.; ODA, G.A. Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. **Revista da Biologia**, v. 9, n. 3, p. 1-6, dez., 2012.
- TORREILLES, J.; GUÉRIN, M.C.; ROCH, P. Espèces oxygénés réactives et systèmes de défense des bivalves marins. **CR Acad. Sci.**, v. 319, n. 3, 209-218, 1996.
- TSUTSUI, S.; ARIJI, T.; SATZ, A.; YOSHIDA, T.; YAMAMURA, N.; ODAKA, T.; ARAKI, K.; SUETAKE, H.; MIYADAI, T.; NAKAMURA, O. Serum GlcNAc-binding IgM of fugu (*Takifugu rubripes*) suppresses the growth of fish pathogenic bacteria: a novel function of teleost antibody. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 41, n. 1, p. 20-26, Sept., 2013.
- TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; BOUJARD, T.; FOSTIER, A.; KUHN, E. R.; MOL, K. A.; BAROILLER, J. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis Niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiol. Behav.**, v. 62, n. 2, p. 273-279, Aug., 1997.
- VATINE, G. et al. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. **FEBS Letters**. v. 585, n.10, p. 1485-1494, May, 2011.

- VERA, L.M.; MONTOYA, A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Effectiveness of the anaesthetic MS-222 in gilthead seabream, *Sparus aurata*: effect of feeding time and day-night variations in plasma MS-222 concentration and GST activity **Physiol. Behav.** v. 17, p. 51-57, Feb., 2013.
- VERA, L.M., CAIRNS, L., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., MIGAUD, H. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Chronobiol. Int.**, v. 26, n. 4, p. 666-681, May, 2009.
- VERA, L.M.; DE PEDRO, N.; GÓMEZ-MILÁN, E.; DELGADO, M.J.; SÁNCHEZ-MUROS, M.J.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. **Physiol. Behav.**, v. 90, n. 2-3 p. 518-524, Feb., 2007.
- VERA, L.M.; MADRID, J.A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). **Physiol. Behav.**, v. 88, n. 1-2, p. 167-172, June, 2006.
- VILLAMIZAR, N.; HERLIN, M.; LÓPEZ, M.D.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Daily spawning and locomotor activity rhythms of European sea bass broodstock (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 354-355, n. 2, p. 117-120, July, 2012.
- WATTS, M; MUNDAY, B.L; BURKE, C.M. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Dev. Comp. Immunol.**, v.19, n.2, p.153-164, Mar-Apr, 2001.
- WEYTS FAA, FLIK G, VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L. Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. **Dev. Comp. Immunol.** v. 22, p. 563-572. 1998.
- WHITMORE, D.; FOULKES, N.S.; STRAHLE, U. SASSONE-CORSI, P. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nat Neurosci** v.1, n.8, p.701-707, Dec., 1998.
- WILSON, M; BENGTON, E; MILLER, N.W; CLEM, L.W; DU PASQUIER, L; WARR, G.W. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 9, p. 4593-4597, Apr., 1997.
- YELLON, S.M.; KIM, K.; HADLEY, A.R.; TRAN, L.T. Time course and role of the pineal gland in photoperiod control of innate immune cell functions in male Siberian hamsters. **J. Neuroimmunol.**, v. 161, n. 1-2, 137-144, Apr., 2005.
- YOO, S.H. YAMAZAKI, S.; LOWREY, P.L. SHIMOMURA, K. KO, C.H.; BUHR, E.D.; SIEPKA, S.M.; HONG, H.K.; OH, W.J.; YOO, O.J. MENAKER, M.; TAKAHASHI, J.S. PERIOD2::LUCIFERASE realtime reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proc. Natl. Acad. Sciences of USA** v. 101, n. 15, p. 5339-5346, Dec., 2004.
- ZANG, X.L.; MA, T.A.Y.; WU, J.Y.; YI, L.Y.; WANG, J.Y.; GAO, X.K.; LI, W.S. Cloning and primary immunological study of TGF- $\beta$ 1 and its receptors T $\beta$ RI/T $\beta$ RII in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Dev. Comp. Immunol.** v. 51, n. 1, p.134-140, June, 2015.
- ZHAN, Y.; JIMMY, K. Molecular isolation and characterization of carp transforming growth factor  $\beta$ 1 from activated leucocytes. **Fish Selfish Immunol.**, v.10, n.4, p.309-318, May, 2000.
- ZIMECKI, M. The lunar cycle: effects on human and animal behavior and physiology. **Postepy Hig. Med. Dosw.**, v. 60, p. 1-7, 2006.
- ZORDAN, M.; A. ROSATO, E.; PICCIN, A.; FOSTER, R. Photic entrainment of the circadian clock: from drosophila to mammals. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 12, n. 4, p. 317-328, Aug., 2001.

## CAPÍTULO 1

---

**Sincronização dos ritmos diários de atividade locomotora, de glicose no plasma e das enzimas digestivas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

## RESUMO

O ciclo claro-escuro e a alimentação são fatores sincronizadores dos ritmos biológicos em peixes. A pesquisa teve por objetivo avaliar sincronização dos ritmos diários da atividade locomotora, da atividade da amilase, da protease alcalina e dos níveis da glicose sanguínea ao horário de alimentação fixa em tilápia. Assim, 120 juvenis de tilápia ( $65,04 \pm 0,58$ g) foram distribuídos em 12 tanques (10 peixes por tanque) e divididos em 2 grupos. Um grupo foi alimentado uma vez ao dia, às 11h (ZT6) (grupo ML) e o outro grupo foi alimentado às 23h (ZT18) (grupo MD). A atividade locomotora dos animais foi mensurada por meio de fotocélula (Omron, mod E3S-AD62, Kyoto, Japan). Estas foram fixadas em seis tanques a 5cm do fundo destes e 2cm da lâmina d'água. O registro da atividade ocorria toda vez que os peixes cruzavam o campo de captação do sensor infravermelho, os registros aconteciam a cada 10 minutos e eram transferidos automaticamente a um sistema computacional que armazenava os dados (DIO98USB, Universidade de Murcia, Murcia-Espanha). Os dados de atividade locomotora, bem como análise de Cosinor para os parâmetros de glicose, protease alcalina e amilase foram analisados. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. e avaliados por ANOVA *one-way*, teste de Duncan. Após o período de sincronização ao horário de alimentação, os peixes foram capturados e anestesiados com 50 $\mu$ L/L de eugenol (óleo de cravo) para coleta de sangue e do intestino. A coleta ocorreu em um período de 24 horas, com intervalo regular de 4 horas, compreendendo seis pontos de coleta para os grupos experimentais (n=88). Os peixes alimentados em ML demonstraram uma atividade locomotora diurna (74,01% da atividade total) e sincronização ao horário de alimentação. Esse grupo demonstrou antecipação da atividade locomotora em relação ao horário da alimentação. Nos peixes em MD se observou um rompimento no padrão diário de atividade locomotora (58,94% período de luz e 41,06%, escuro). Atividade de protease alcalina no intestino médio dos animais dos dois grupos (ML e MD) demonstrou padrão rítmico diário pela análise Cosinor,  $p < 0,05$ . A amilase não demonstrou padrão rítmico de atividades (COSINOR  $p > 0,05$ ), nem diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Os resultados demonstraram uma variação rítmica diária para a glicose plasmática, Cosinor,  $p < 0,05$  e diferença significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ). O horário da alimentação exerceu influência sobre os ritmos diários dos parâmetros comportamentais, fisiológicos e metabólicos da tilápia do Nilo, que demonstrou plasticidade do sistema circadiano com capacidade de controle do padrão de atividade locomotora.

**Palavras-chave:** Ritmo diário, amilase, protease, glicose, horário de alimentação, tilápia do Nilo.

## ABSTRACT

The light-dark cycle and food are factors synchronizers of biological rhythms in fish. The research aimed to evaluate synchronization of daily rhythms of locomotor activity, amylase and alkaline protease activity and blood glucose levels to fixed feeding schedule for tilapia. Thus, juvenile tilapia 120 ( $65.04 \pm 0.58$ g) were distributed in 12 tanks (10 fish per tank) and divided into 2 groups. One group was fed once a day, at 11:00h (ZT6) (ML group) and the other group was fed at 23:00 h (ZT18) (MD group). The locomotor activity of the animals was measured by photocell (Omron, mod E3S-AD62, Kyoto, Japan). These were fixed in six tanks 5cm below the bottom of the tank. The record activity occurred every time the fish were crossing the infrared sensor capture field, the records held every 10 minutes and were automatically transferred to a computer system that stored data (DIO98USB, University of Murcia, Murcia, Spain). The data locomotor activity, as well as Cosinor analysis for glucose parameters, alkaline protease and amylase were analyzed. All results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and evaluated by one-way ANOVA, Duncan test. After the synchronization period feeding time, the fish were captured and anesthetized by 50mL/L of eugenol (clove oil), to collect blood and intestine. The collection took place over a period of 24 h with regular interval of 4 hours, including six collection points for the experimental groups (n = 88). Fish fed on ML showed a diurnal locomotor activity (74.01% of the total activity) and synchronizing the feeding schedule. This group showed anticipation of locomotor activity in relation to the time of feeding. In fish in MD was observed a disruption in the daily pattern of locomotor activity (58.94% light period and 41.06%, dark). Alkaline protease activity in the midgut of the two groups of animals (ML and MD) demonstrated daily rhythm pattern by Cosinor analysis,  $p < 0.05$ . The amylase did not show rhythmic pattern of activities (COSINOR  $p > 0.05$ ), no significant difference ( $p > 0.05$ ). The results show a daily rhythm variation for plasma glucose, Cosinor,  $p < 0.05$  and significant differences (ANOVA,  $p < 0.05$ ). The time of the power exerted influence on the daily rhythms of behavioral parameters, physiological and metabolic the Nile tilapia, which demonstrated the plasticity of the circadian system with standard control capacity of locomotor activity.

**Keywords:** Daily rhythm, amylase, protease, glucose, feeding time, Nile tilapia.



## 1 INTRODUÇÃO

O ciclo claro-escuro e a alimentação são os fatores mais importantes no controle dos ritmos biológicos em peixes (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009a; MONTOYA et al., 2010), atuando como sincronizadores desses ritmos (LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2010). Estes parâmetros assumem relevância pela influência que exercem no desempenho, na fisiologia, no comportamento e no estresse de espécies aquícolas (KITAGAWA et al., 2015). Quando há oferta de alimento em horário fixo, os peixes apresentam um comportamento denominado de atividade antecipatória alimentar (AAA), que consiste no aumento da atividade locomotora (MISTLBERGER, 1994). A AAA permite aos animais otimizar seus processos digestivos e metabólicos (DAVIDSON e STEPHAN, 1999; STEPHAN, 2002), tendo como vantagem adaptativa aprimorar a aquisição e utilização de nutrientes (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009a; MONTOYA et al., 2010).

Por outro lado, estudos demonstram que os peixes exibem padrões de atividade locomotora e alimentar diversos se comparados a animais terrestres (MATTOS et al., 2016). Algumas espécies, como o European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) podem ser duais, ou seja, mudam de fases (SANCHEZ-VÁZQUEZ, 1995). Ainda há aquelas em que a fase da atividade alimentar não corresponde à atividade locomotora (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 1995, 1996; VERA et al., 2009; FORTES-SILVA et al., 2010a). Assim, a alimentação em aquicultura e seus efeitos comportamentais e fisiológicos são fatores complexos e devem ser considerados para melhoria da eficiência alimentar. O horário de alimentação, por exemplo, deveria se basear no conhecimento biológico ou tecnológico, mas, contrariamente, costuma se basear no horário de trabalho das equipes das pisciculturas (KOTANI e FUSHIMI, 2011).

Embora o ritmo dos níveis de glicose pareça estar associado à alimentação e ao horário da alimentação (LÓPEZ-OLMEDA et al. 2009b; MONTOYA et al. 2010), seu metabolismo é considerado um tema oportuno de investigação para várias espécies aquícolas nas suas diversas fases de vida (GONG et al., 2015; LI et al., 2016; XIA et al., 2015; REN et al., 2015), com estudos escassos, sendo os lipídios e as proteínas mais bem explorados (ROCHA et al., 2016). A glicose exerce um papel importante ao suprir a demanda de energia dos peixes (POLAKOF et al., 2007) e se destaca como relevante

ferramenta na avaliação das funções fisiológicas como crescimento, bem-estar e estado de saúde da tilápia. Além disso, os carboidratos são ingredientes de dietas práticas eficientemente utilizados na alimentação de onívoros e/ou herbívoros de águas tropicais, como a tilápia, representando fontes de energia de mais baixo custo (ZHAO et al., 2011).

Segundo López-Olmeda et al. (2012), o horário de alimentação parece ser um fator importante na determinação da atividade rítmica das enzimas digestivas em peixes. Algumas espécies de peixes marinhos têm mostrado que essas enzimas apresentam oscilação rítmica diária de sua atividade. Pesquisa com Gilthead seabream (*Sparus aurata*) evidenciou uma variação rítmica da atividade da amilase e da protease alcalina (MONTROYA et al., 2010). O peixe eel (*Anguilla anguilla*) exibiu variação da atividade da protease alcalina em estudos de López-Olmeda et al. (2012). Poucos estudos, até o momento, consideraram peixes de água doce na avaliação do ritmo diário e suas respostas metabólicas. Este estudo se faz necessário devido à grande diferença nos itens alimentares dos peixes de água doce (LI et al., 2016b) e água marinha (PÉREZ-JIMENEZ et al., 2015; CASTRO et al., 2015) e ao processo de digestão e absorção de carboidratos (KROGDAHL et al., 2005).

O objetivo dessa pesquisa foi investigar a sincronização dos ritmos diários comportamentais (atividade locomotora), metabólico (glicose sanguínea) e enzimático (amilase, protease alcalina) ao horário de alimentação fixa em tilápia (*Oreochromis niloticus*).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

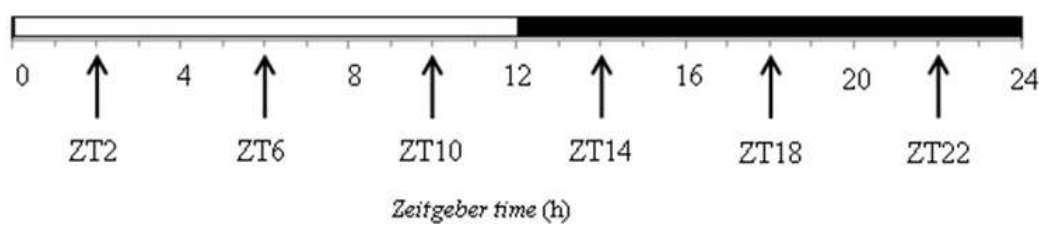
### **2.1 Instalações Experimentais**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição e Comportamento Alimentar de Organismos Aquáticos (AQUAUFRB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Os peixes foram mantidos em sistema de recirculação de água composto por filtros mecânicos, filtros biológicos e luz UV (60W) e controle de temperatura da água ( $27 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ ). O experimento foi conduzido de junho a agosto de 2015, no município de Cruz das Almas/BA, na região do Recôncavo da Bahia, a uma

altitude de 220 metros, tendo como coordenadas geográficas 12° 40' 12" de latitude sul e 39° 06' 07" longitude oeste de Greenwich (BRASIL, 1992).

A intensidade luminosa era medida durante o dia e à noite, usando um luxímetro (Lux medidor, São Paulo, Brasil) colocado por cima dos tanques. Os peixes receberam cerca de 12h de luz e 12h de escuro. O período de luz começou às 5h, quando os peixes receberam uma intensidade de luz a partir de 1 lx e o período escuro se iniciou às 17h, quando a marcação do luxímetro indicava 0 lx. Por convenção, em estudos de ritmos circadianos, quando as luzes são acesas, esse período é denominado tempo *Zeitgeber* (sincronizador) (ZT), correspondendo a ZT0; e quando as luzes são apagadas, esse período corresponde a ZT12 (Figura 3) (LÓPEZ-OLMEDA, et al., 2016).

Figura 3 - Representação dos horários circadianos



Os peixes permaneceram nestas condições por uma semana para aclimação. Cada tanque foi equipado com um alimentador automático (EHEIM, model 3581, Germany) para o calendário de alimentação (Figura 3). Os peixes foram alimentados a 2% da biomassa, com ração comercial para tilápia com 35% de proteína.

Os parâmetros de qualidade de água foram mensurados diariamente com valores de temperatura em  $27 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ , pH com níveis de  $6.50 \pm 0.5$  e oxigênio de  $7.90 \pm 0.6$  mg/L, sendo estes valores considerados apropriados para esta espécie (ALAM e AL-HAFEDH, 2006).

## 2.2 Desenho Experimental

Juvenis de tilápia, num total de 120, com peso inicial médio de  $65,04 \pm 0,58$ g (média $\pm$ S.E.M.), obtidos da piscicultura Aquavale (Ituberá, Bahia-Brasil), foram mantidos em tanques de polietileno com capacidade 100L.

Os peixes foram distribuídos em 12 tanques, compreendendo 10 peixes por tanque, numa densidade de 650g/100L de água. Para os tratamentos experimentais, os animais foram divididos em 2 grupos. Um grupo recebeu alimentação fixa, uma vez ao dia, no horário claro do fotoperíodo, às 11h (ZT6), ou seja, na metade da fase de luz (grupo ML). O outro grupo, por sua vez, recebeu alimentação fixa, uma vez ao dia, porém às 23h (ZT18), na metade da fase de escuro (grupo MD) (Figura 3).

Para sincronização dos peixes ao horário da alimentação, uma dieta comercial para juvenis de tilápia foi utilizada no período experimental, durante 60 dias (35% proteína bruta, 5% extrato etéreo, 12% cinzas, 2mm de granulometria, Primor<sup>®</sup>, São Paulo-Brasil). Nos cinco dias finais do experimento, os peixes passaram a receber uma dieta purificada, contendo 41,53% (caseína5:1gelatina), 5% (óleo de soja), 42,65% (dextrina), formulada para tilápia de acordo com Fortes-Silva et al. (2011). Esta mudança na dieta se fez necessária para isolar fontes de variação que pudessem estar contidas em uma dieta comercial, bem como fatores indesejados de uma dieta padrão que pudessem influenciar o processo de digestão e absorção do carboidrato.

A atividade locomotora dos animais foi mensurada por meio de fotocélula (Omron, mod E3S-AD62, Kyoto, Japan). Estas foram fixadas em seis tanques a 5cm do fundo dos mesmos e também a 2cm da lâmina d'água. O registro da atividade acontecia toda vez que os peixes cruzavam o campo de captação do sensor infravermelho; os registros aconteciam a cada 10 minutos e eram transferidos automaticamente a um sistema computacional que armazenava os dados (DIO98USB, Universidade de Murcia, Murcia-Espanha).

Após o período de sincronização ao horário de alimentação, os peixes (n=88) foram capturados e anestesiados com 50 $\mu$ L/Lde eugenol (óleo de cravo, Biodinâmica<sup>®</sup>) (SIMÕES et al., 2011) para coleta de material para análise. A coleta ocorreu em um período de 24 horas, com intervalo regular de 4 horas, compreendendo seis pontos para cada grupo experimental. O primeiro ponto de coleta foi feito uma hora após o horário

da alimentação. Para o grupo ML, a coleta se processou nos seguintes horários: ZT7, ZT11, ZT15, ZT19, ZT23 e ZT3 (Figura 3). Para o grupo MD, a coleta obedeceu aos seguintes horários: ZT19, ZT23, ZT3, ZT7, ZT11 e ZT15) (Figura 3). Cada peixe foi submetido à coleta de uma alíquota de 0,5mL de sangue, por punção venocaudal, para posterior obtenção do soro. Foram utilizadas seringas estéreis de 3mL e agulha de 25x7. As alíquotas foram transferidas para microtubos de polietileno de 1,5mL, mantidas sob refrigeração e encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Veterinário da UFRB, onde foram processadas. Para a obtenção do soro, 0,5mL de sangue, colhidos sem anticoagulante, foi centrifugado a 400xg durante 10 minutos. O soro coletado foi armazenado em tubos estéreis a -20°C para posterior análise. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por secção medular. Foi aberta a cavidade celomática na região ventral para retirada dos órgãos. O intestino foi coletado para posterior análise das enzimas digestivas.

### **2.3 Análise das Atividades da Amilase e da Protease Alcalina**

As amostras do intestino médio foram destinadas à mensuração da atividade da amilase e da protease alcalina. A porção do intestino médio, disposta em placa de Petri, com o auxílio de pinça cirúrgica, teve o excesso do alimento removido, sendo mantida a -80°C até as análises. Os tecidos foram homogeneizados por meio de homogeneizador (Polytron PT 1200® Kinematica, Switzerland), com água destilada, na proporção de 250mg de tecido/mL a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000xg por 15min a 4°C e o sobrenadante coletado para uso no ensaio de análise da atividade enzimática. A concentração de proteína solúvel na amostra foi determinada pelo método de Lowry, usando albumina de soro bovino como padrão (LOWRY, 1976). A atividade da amilase foi determinada de acordo com o método Somogyi-Nelson, usando amido solúvel (2%), como substrato (ROBYT e WHELAN, 1968). A atividade da protease alcalina foi determinada pelo método da caseína, utilizando 1% de caseína como substrato (KUNITZ, 1947; WALTER, 1984). Uma unidade de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1mg de maltose por minuto e por mg de proteína. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de

enzima necessária para catalisar a formação de 1mg de tirosina, liberada por minuto e por mg de proteína (HILDAGO et al., 1999).

## 2.4 Análise de Glicose

A concentração de glicose sérica, para os diferentes horários de coleta, foi mensurada por meio de kit de análise de glicose comercial (Doles<sup>®</sup>).

## 2.5 Análises dos Dados

Os dados de atividade locomotora, bem como análise do Cosinor para os parâmetros de glicose, protease alcalina e amilase foram analisados pelo *software El Temps* (v.1, 179 Dr. Díez Noguera, Barcelona). Neste *software* os actogramas e as ondas médias foram duplamente plotados para melhor visualização. A análise de Cosinor foi utilizada para avaliar se as atividades rítmicas das enzimas e os níveis rítmicos de glicose se ajustavam à função Cosinor ( $Y=M+A * [\text{Cos}(\Omega t+\Phi)]$ ), onde M é mesor, A é amplitude,  $\Omega$  é frequência angular ( $360^\circ/24\text{h}$  para ritmos diários) e  $\Phi$  é a acrofase. Todos os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. e avaliados por ANOVA *one-way*, teste de Duncan. O nível de significância foi considerado  $p<0,05$ . Os dados foram analisados utilizando SPSS (versão 15.0).

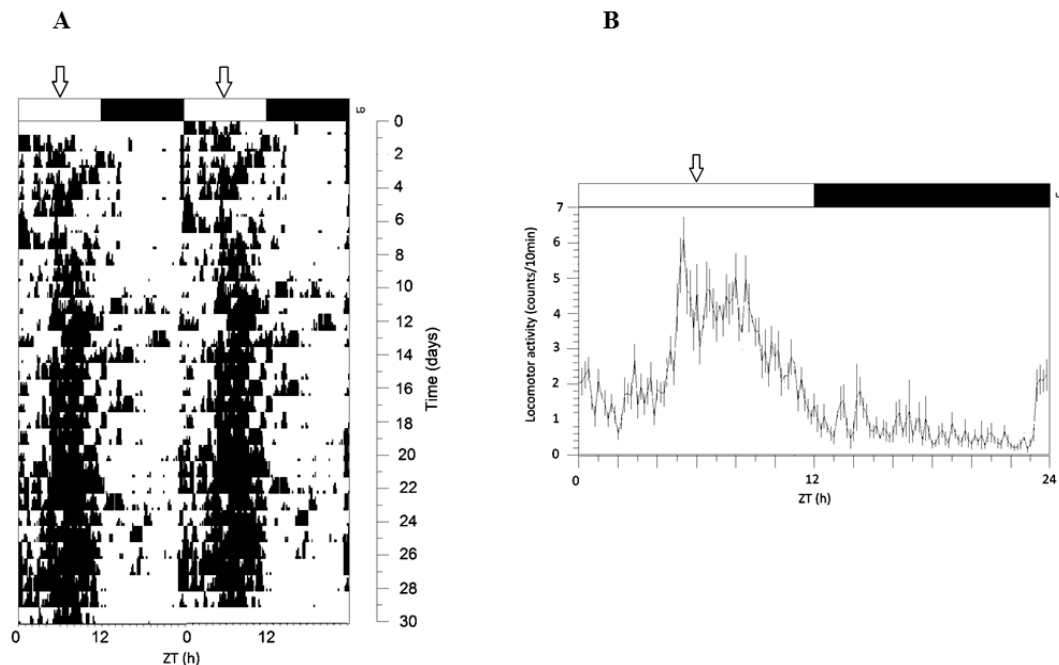
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho aborda a avaliação de um ritmo diário de parâmetros comportamentais, metabólicos e fisiológicos da tilápia do Nilo, espécie de grande importância na piscicultura mundial. Tal proposta fornece subsídios para as pesquisas na área, sobretudo pelo fato de que são poucos os estudos nessa perspectiva. Os nossos achados revelaram características importantes que podem ser discutidas para o desenvolvimento de um processo prático de alimentação na aquicultura.

### 3.1 Ritmos Diários da Atividade Locomotora

Os peixes alimentados em ML apresentaram uma atividade antecipatória alimentar (AAA), com um pico uma hora antes do fornecimento do alimento. Os peixes apresentaram atividade locomotora diurna e sincronização ao horário de alimentação representando 74,01% da atividade total (Figura 4AB). O ritmo de atividade locomotora diurno foi considerado maior que o ritmo de atividade locomotora noturno [ $F(1,238) = 111,159$ ,  $p < 0,05$ ]. Embora não seja estritamente diurna, a tilápia apresenta um comportamento locomotor mais ajustado com a fase de luz. Ressalte-se, contudo, sua habilidade de adaptação a outras condições, conforme comportamento do grupo MD.

Figura 4AB - Actograma e formas de onda média representantes da atividade da tilápia submetidas à alimentação fixa uma vez por dia no ML.

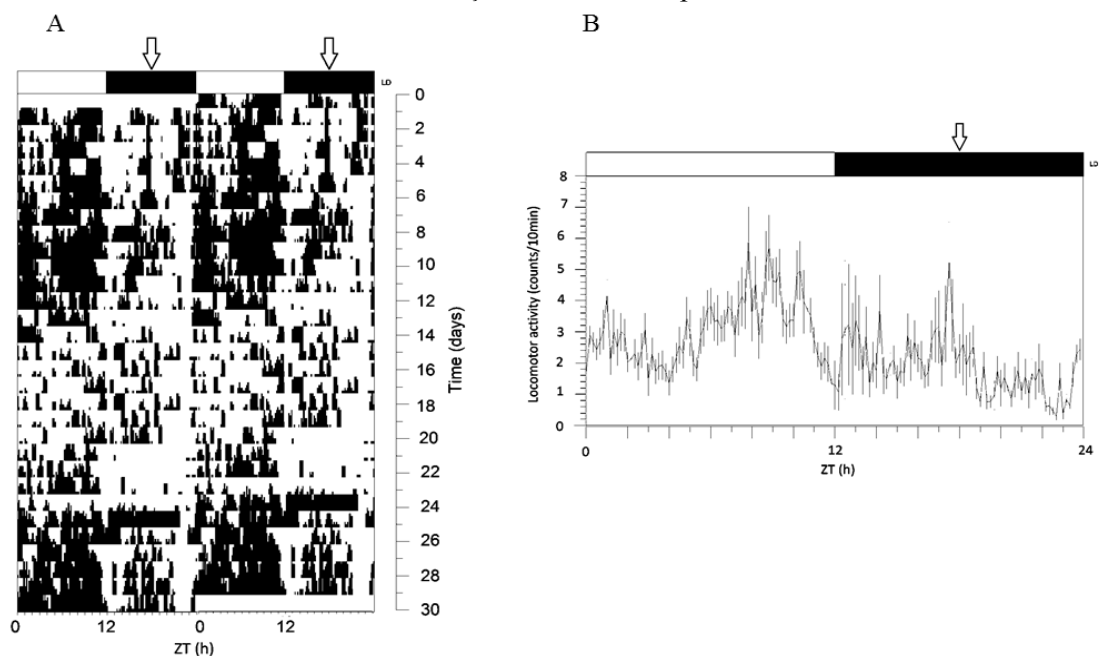


Fonte: Dados originados da pesquisa.

(A) Para uma visualização conveniente, os dados foram duplamente plotados. No eixo y está a progressão dos dias com cada dia plotado duas vezes (dia 1 do lado esquerdo é repetido no lado direito). A atividade foi registrada a cada 10 minutos e a altura de cada ponto representa o número de interrupções do feixe de luz. As barras acima de cada actograma representam o regime de luz; barras abertas e pretas representam a luz e a escuridão, respectivamente, do ciclo LD. As setas no topo dos actogramas indicam o horário de alimentação. (B) Formas de onda média da atividade locomotora da tilápia em um ciclo 12:12LD alimentados uma vez por dia no ML. Cada ponto foi calculado como a média  $\pm$  S.E.M. de 10 minutos dos dados registrados em todos os dias experimentais mostrados em cada actograma na Figura 4A. As barras acima das ondas médias representam as fases do ciclo LD luz (barra aberta) e escura (barra preta).

Essa habilidade adaptativa está claramente presente no comportamento do grupo MD, cuja resposta ao horário de alimentação demonstrou arrastamento do ritmo locomotor. Ao fixar o horário da alimentação no período noturno, foi possível observar um rompimento no padrão diário de atividade locomotora, quando esta passou a ser tanto no período de luz (58,94% da atividade total) quanto no período noturno (41,06%) (Figura 3AB), havendo diferença significativa para a atividade locomotora durante a fase de luz e de escuridão [F (1,238) =14,573,  $p < 0,05$ ]. Embora haja significância entre o período noturno e o diurno, o incremento da atividade noturna para animais em MD, se comparado a animais em ML (veja Figura 4AB e 5AB), mostra, de certa forma, um efeito sincronizador da alimentação noturna sobre o comportamento natural diurno.

Figura 5AB - Actograma e formas de onda média representantes da atividade da tilápia submetidas à alimentação fixa uma vez por dia no MD.



Fonte: Dados originados da pesquisa.

(A) Para uma visualização conveniente, os dados foram duplamente plotados. No eixo y está a progressão em dias com cada dia plotado duas vezes (dia 1 do lado esquerdo é repetido no lado direito). A atividade foi registrada a cada 10 minutos e a altura de cada ponto representa o número de interrupções do feixe de luz. As barras acima de cada actograma representam o regime de luz; barra aberta e preta representam a luz e a escuridão, respectivamente, do ciclo LD. As setas no topo dos actogramas indicam o horário de alimentação. (B) Formas de onda média de atividade locomotora das tilápias em um ciclo 12:12LD alimentadas uma vez por dia no MD. Cada ponto foi calculado como a média $\pm$ S.E.M. de 10 minutos dos dados registrados em todos os dias experimentais mostrados em cada actograma na Figura 5A. As barras acima das ondas médias representam as fases do ciclo LD luz (barra aberta) e escuro (barra preta).



A tilápia já foi descrita como um peixe de padrão locomotor caracterizado como estritamente diurno (TOGUYENI et al., 1997), mas pode apresentar flexibilidade no seu ritmo de atividade. Vera et al. (2009) registraram uma atividade diurna, como também um padrão arritmico nessa espécie, submetida a condições de luz e escuridão. Fortes-Silva et al. (2010a) demonstraram que tilápias, mantidas individualmente em tanques, possuíam intensa atividade locomotora durante o dia, mas com forte atividade alimentar noturna. Por outro lado, um comportamento crepuscular também foi observado em tilápias (FORTES-SILVA et al., 2010b). Os estudos que identificaram a flexibilidade no comportamento locomotor de tilápias corroboram os resultados obtidos nesta pesquisa. Assim sendo, é comum associarmos os animais como apenas diurnos ou noturnos, porém os peixes possuem uma plasticidade comportamental maior, se comparados a animais terrestres. Isso pode ser devido a fatores relacionados à época do ano, disponibilidade de alimento ou até mesmo presença de predadores (FORTES-SILVA et al., 2010b). Fatores individuais também colaboram com esta plasticidade rítmica, conforme verificado com a espécie Goldfish (*Carassius auratus*) que, quando mantidos em ciclo de 12:12LD, apresentaram ritmo diário da atividade locomotora em uns indivíduos para o período diurno, e, em outros, para o período noturno (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1996). A alimentação é considerada um potente sincronizador da atividade locomotora dos peixes (KITAGAWA et al., 2015; PAREDES et al., 2015). Talvez isso se explique pela flutuabilidade da oferta de alimentos no ambiente aquático se comparado ao ambiente terrestre. Os peixes estão sujeitos aos períodos de cheia dos rios, lagos com limite de alimentos e variações de luminosidade para a produção de alimentos ao longo do ano, o que os leva a se adaptarem a estas condições para a sobrevivência (ABELHA et al., 2001).

As tilápias deste estudo apresentaram comportamento diurno com 74% da atividade registrada nessa fase do dia, na qual lhes era fornecida a alimentação, demonstrando sincronização com o horário de oferta do alimento (ML). O pico de atividade exibido pelos peixes em ML, uma hora antes da alimentação, revelou uma atividade antecipatória da atividade locomotora. Os animais previam o fornecimento futuro da alimentação e se preparavam para receber o alimento assim que este fosse fornecido. Pode-se inferir que este comportamento tenha implicado em uma melhor aquisição e aproveitamento dos nutrientes presentes nos alimentos, fatos que

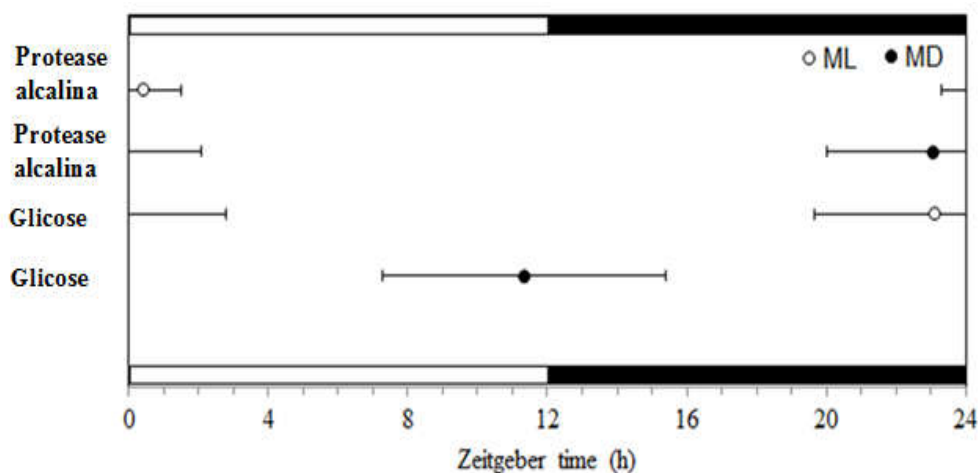
contribuem para a melhoria do desempenho do peixe. O resultado da atividade antecipada de protease alcalina corrobora este argumento, conforme se discutirá adiante.

### 3.2 Ritmos Diários dos Parâmetros Fisiológicos

#### 3.2.1 Enzimas Digestivas

O resultado geral do ritmo diário para as enzimas se encontra na Figura 6 e Figura 7AB. A atividade de protease alcalina no intestino médio dos animais dos dois grupos ML e MD demonstrou um padrão rítmico diário pela análise Cosinor,  $p < 0,05$ .

Figura 6 - Mapa de fase da protease alcalina e da glicose.

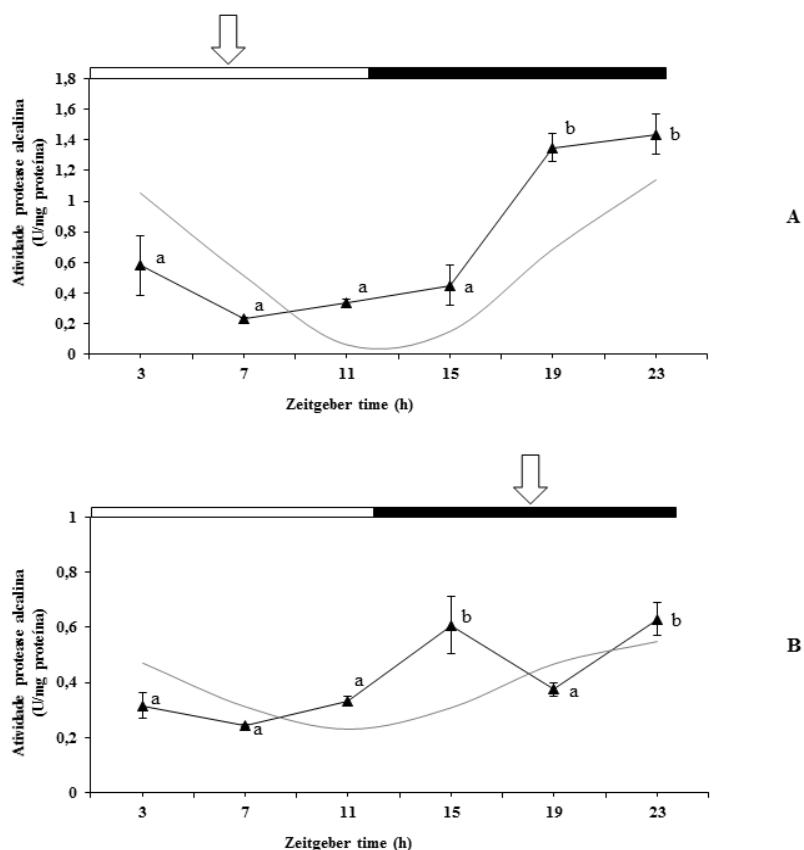


Fonte: Dados originados da pesquisa.

A acrofase é indicada por símbolos diferentes de acordo com o grupo experimental: círculos brancos para o grupo ML, círculos pretos para o grupo MD. Os limites de confiança (95%) são indicados pelas barras laterais. O nome de cada fator analisado está indicado do lado esquerdo do gráfico. As barras brancas e pretas acima do gráfico representam o período de luz e o período escuro, respectivamente.

A protease alcalina para o grupo ML apresentou uma acrofase em  $00:43 \pm 01:06$  (final da fase escura e início da fase de luz) e para o grupo MD, a acrofase foi em  $23:04 \pm 03:05$ , também considerado final da fase escura. Da mesma forma, a protease alcalina apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os grupos ML e MD, com as maiores atividades das enzimas na fase escura (Figura 7AB).

Figura 7AB - Perfis diários de protease alcalina em tilápias submetidas à alimentação periódica, ML (A) e MD (B).



Fonte: Dados originados da pesquisa.

Os valores representam a média±S.E.M. (N = 6/ponto de tempo). As barras brancas e pretas acima do gráfico representam a luz e a escuridão, respectivamente. As setas acima das barras indicam o horário da alimentação. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os momentos do dia (*one-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Desta forma, foi possível observar que o grupo submetido à condição de alimentação em ML demonstrou uma atividade mais duradoura, várias horas após a ingestão do alimento. Por outro lado, o grupo de alimentação fixo em MD apresentou antecipação da secreção de protease alcalina com um pico 4 horas antes do horário da alimentação ( $0,608 \pm 0,106$  U/mg proteína) e outro 4 horas depois ( $0,630 \pm 0,061$  U/mg proteína). A AAA observada nos animais está relacionada, possivelmente, a um efeito de adaptação e de maximização do processo de digestão à noite. O fenômeno de antecipação da atividade alimentar também revela a vantagem de, ao receber o alimento, o animal estar com sua capacidade digestiva potencializada para melhor aproveitar e

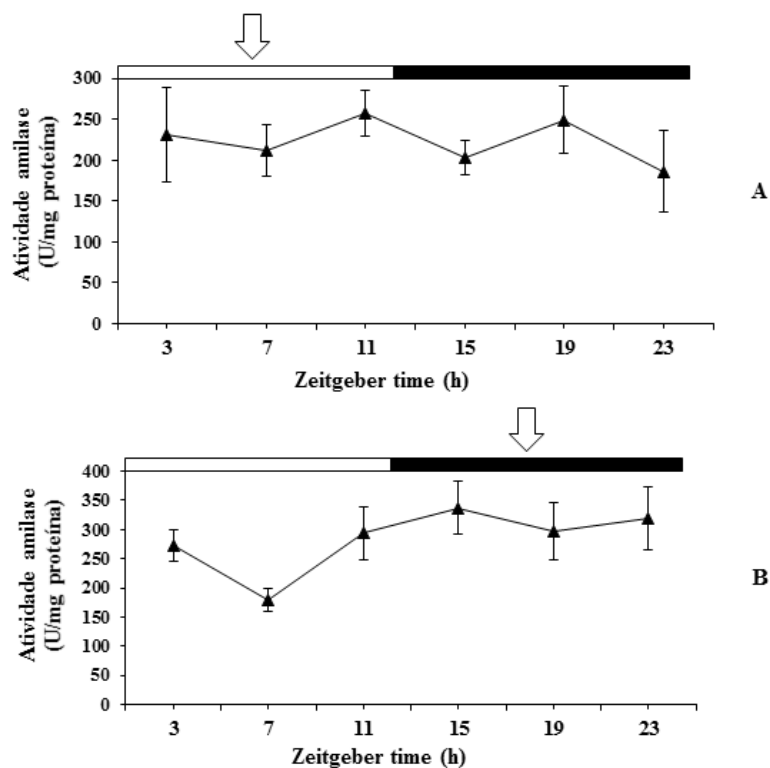
digerir as proteínas nele existentes, assegurando-lhe crescimento e sobrevivência. Os animais previam um evento futuro de oferta de alimento em um horário atípico de alimentação, já que pelas características comportamentais observadas neste trabalho as tilápias mostraram uma atividade locomotora predominantemente diurna, mas sincronizada com a alimentação noturna.

Em estudos com *Sparus aurata* alimentados em horário fixo, Montoya et al. (2010) demonstraram uma antecipação da secreção da protease alcalina, com maior atividade observada 4 horas antes do horário da alimentação (ML), sugerindo que o horário fixo de alimentação favoreceu uma interação temporal e arrastou a atividade da protease alcalina. Nos nossos estudos, os grupos de peixes em ML e MD demonstraram alta atividade da protease alcalina várias horas após o horário de alimentação.

Para López-Olmeda et al. (2012), trabalhando com uma espécie carnívora (*Anguilla anguilla*), tal fato pode ser explicado pelo tempo prolongado da atividade digestiva até mesmo em nível intestinal. Caruso et al. (2008), em outro estudo com a *Anguilla anguilla*, analisaram o ciclo de 24h de enzimas digestivas e concluíram que as atividades no estômago decresceram após a ingestão do alimento, enquanto que a atividade no intestino aumentou com a progressão do tempo.

Por outro lado, a atividade de amilase não apresentou diferença estatística ( $p>0,05$ ) para os valores absolutos entre os diferentes pontos de coleta (Figura 8AB). Após a análise para detectar um possível ritmo diário (COSINOR,  $p>0,05$ ), a atividade da amilase no intestino médio da tilápia demonstrou um padrão arritmico para os dois grupos estudados.

Figura 8AB - Atividade da amilase no intestino médio de tilápias submetidas à alimentação periódica, ML (A) e MD (B).



Fonte: Dados originados da pesquisa.

Os dados são representados como média  $\pm$  SEM. As barras brancas e pretas acima da figura indicam a fase clara e escura, respectivamente. As setas acima das barras indicam o horário da alimentação. O eixo vertical mostra a atividade de amilase por U/mg de proteína, enquanto que o eixo horizontal mostra o tempo em horas *zeitgeber* (ANOVA *one-way*,  $p < 0,05$ ).

O fato de a atividade de amilase ter se mostrado invariável no tempo, tanto para o grupo ML quanto para o grupo MD, pode ser explicado pelo prolongado processo digestivo intestinal das tilápias ou pela base alimentar predominantemente de carboidratos. Nos peixes carnívoros ou nas fases larvais da maioria das espécies, em que a dieta é predominantemente composta por proteínas e lipídios, a maior parte dos carboidratos encontrados é provavelmente produzida no próprio organismo, a partir de dois ou três carbonos remanescentes de aminoácidos e lipídios (NRC, 1993). Isso poderia facilitar a detecção de algum possível ritmo diário. Por outro lado, a tilápia, por ser onívora, se alimenta normalmente de forma constante de altos níveis de carboidratos (ZHAO et al., 2011), possuindo estrutura digestiva adaptada a este tipo de alimento (AWAAD et al., 2014), por isso, possivelmente necessita de uma atividade constante da

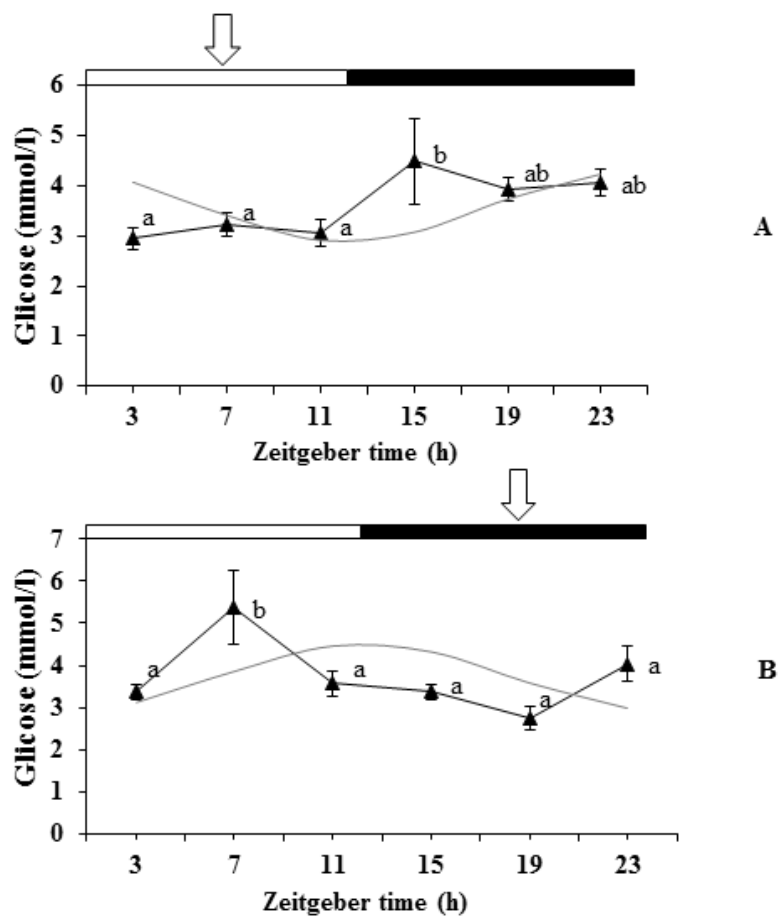
enzima. Peixes onívoros se alimentam de diferentes itens alimentares e de forma aleatória. Chakrabarti et al. (1995) relataram que durante a evolução do sistema digestivo dos vertebrados os peixes das comunidades lênticos não exibiram um foco na estratégia digestiva, pois as opções alimentares eram reduzidas, então ocorreu o desenvolvimento da plasticidade nutricional aliada com a atividade enzimática e digestiva.

### **3.2.2 Glicose**

O resultado geral do ritmo diário para glicose se encontra na Figura 9AB. Os resultados demonstraram variação rítmica diária para a glicose plasmática, com acrofase para os peixes alimentados em ML (23:11±03:46 ZT) e para o grupo alimentado em MD (11:33±04:07 ZT). A variação diária para este parâmetro também foi significativamente diferente comprovada após as análises ( $p < 0,05$ ).

Os valores máximos de glicose foram registrados na fase escura (ZT15) para o grupo ML e na fase clara (ZT7) para o grupo MD (Figura 9AB). Ritmos diários de tolerância à glicose têm sido relatados em mamíferos e parecem estar associadas a fatores tais como os hábitos alimentares e os ritmos diários de resistência à insulina. (KALSBECK et al., 2014; JHAA et al., 2015). Os processos que envolvem o controle no ritmo diário da glicemia e de vários outros produtos do metabolismo parecem estar mais claramente identificados em seres humanos e estão relacionados ao hipotálamo. Esta ritmicidade diária de funções metabólicas, incluindo a liberação de hormônio, é regida por um sistema circadiano que consiste em um relógio central no núcleo supraquiasmático do hipotálamo e muitos relógios secundários no cérebro e órgãos periféricos (JHAA et al., 2015).

Figura 9AB - Níveis diários de glicose no sangue de tilápias, submetidas a alimentação periódica, ML (A) e MD (B).



Fonte: Dados originados da pesquisa.

Os dados são apresentados como média  $\pm$  S.E.M. As barras brancas e pretas na parte superior mostram a fase clara e a fase escura do fotoperíodo, respectivamente. As setas acima das barras indicam o horário de alimentação. O eixo vertical representa os níveis de glicose no sangue em mmol/L, enquanto que o eixo horizontal mostra o tempo em horas *zeitgebers*. Diferentes letras denotam diferenças significativas entre pontos de tempo para cada condição de alimentação (ANOVA *one-way*,  $p < 0,05$ ).

As concentrações máximas ( $C_{max}$ ) de glicose encontradas neste estudo foram de  $4.49 \pm 0.86$  mmol/L, 9h após a alimentação, para animais alimentados em ML; e de  $5.36 \pm 0.88$  mmol/L, 13h após a alimentação, para os peixes alimentados em MD. López-Olmeda et. al. (2009b), estudando o peixe *Carassius auratus*, registraram concentração

elevada de glicose (8,22mmol/L) nos animais alimentados em ML e concentração baixa (3,46mmol/L) naqueles alimentados em MD. Perfis diários de glicose no sangue mostraram uma Cmax 8h após a alimentação, independentemente do horário das refeições para o Gilthead seabream (*Sparus aurata*) alimentado em ML e MD, 4,01 mmol/L e 3,45 mmol/L, respectivamente (MONTROYA et al., 2010). Estes resultados revelam, de uma forma geral, que os peixes possuem um relógio endógeno sincronizador do ritmo glicêmico para as diferentes espécies de peixes, que funciona de forma espécie-específico. Os níveis basais para animais alimentados em ML e MD voltaram ao normal 12h após o pico de glicose. Para peixes carnívoros, este tempo foi de 18h para Gilthead seabream (*Sparus aurata*) (MONTROYA et al 2010) e de 25h para juvenis de flounder (*Paralychtis olivaceus*) alimentados com uma dieta composta de dextrina (SANG-MIN et al., 2003). A magnitude e duração desse aumento nos níveis de glicose está relacionada com os hábitos alimentares das espécies de peixes. Assim, peixes onívoros demonstram uma capacidade mais apurada de voltar aos níveis de glicose basais após uma carga de glicose do que peixes carnívoros (MOON, 2001).

Este estudo atesta o forte efeito dos períodos de claro e escuro no ritmo circadiano da glicose. Uma hipótese a ser levantada seria as interações e efeitos dos processos digestivos avaliados neste trabalho, com a digestão, absorção e ritmo diário da glicose. Contudo, segundo López-Olmeda et al. (2009b), em peixes, diferenças na tolerância entre dextrina e glicose não estão associadas a fatores digestivos. Este comportamento do padrão de glicose diário em tilápia parece estar controlado por fatores já identificados em mamíferos e peixes que seria a interação entre os produtos do metabolismo e seus receptores. Para estes autores, diferenças de tolerância entre a dextrina e a glicose em Goldfish podem ser originadas por fatores como o metabolismo da glicose ou sua captação em órgãos periféricos.



#### **4 CONCLUSÃO**

Este estudo ressalta a relevância que o horário de alimentação assume sobre a atividade locomotora, os níveis de glicose sanguínea, a atividade da amilase e da protease alcalina da tilápia do Nilo, visto que os peixes sincronizam esses parâmetros ao horário de alimentação. Nossos resultados mostraram plasticidade do sistema circadiano com capacidade de controle do padrão de atividade locomotora, no momento em que a tilápia perdeu o ritmo diurno, sincronizando com a alimentação noturna. Esse fato ratifica a importância de determinar horários de alimentação que melhorem o desempenho da tilápia em cativeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELHA, M. C. F.; AGOSTINHO, A. A.; GOULART, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Sci.**, v. 23, n. 2, p. 425-434, 2001.

ALAM, A.; AL-HAFEDH, Y. S. J. Diurnal dynamics of water quality parameters in an aquaculture system based on recirculating green water technology. **Appl. Sci. Environ. Mgt.**, v. 10, n. 2, p. 19-21, June, 2006.

AWAAD, A. S.; MOAWAD, U. K.; TAWFIEK, M. G. Comparative histomorphological and histochemical studies on the oesophagus of Nile *Oreochromis niloticus* and African catfish *Clarias gariepinus*. **J. Histol.**, v. 2014, p. 1-10, Nov., 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas: 1961-1990**. Brasília: MARA, 1992.

CARUSO, G.; DENARO, M. G.; GENOVESE, L. Temporal changes in digestive enzyme activities in the gastrointestinal tract of European eel (*Anguilla anguilla*) (Linneo 1758) following feeding. **Mar. Freshw. Behav. Phys.**, v. 41, n. 4, p. 215-228, Dec., 2008.

CASTRO, C.; CORRAZE, G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; LARROQUET, L.; CLUZZEAUD, M.; PANSEMAT, S.; OLIVA-TELES, A. Dietary carbohydrate and lipid source affect cholesterol metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Br. J. Nutr.**, v. 114, n. 8, p. 1143-1156, Oct., 2015.

CHAKRABARTI, I.; GANI, M.A.; CHAKI, K.K.; SUR, R.; MISRA, K. K. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.**, v. 112, n. 1, p. 167-177, Sept., 1995.

DAVIDSON, A. J.; STEPHAN, F. K. Plasma glucagon, glucose, insulin and motilin in rats anticipating daily meals. **Physiol. Behav.**, v. 66, n. 2, p. 309-315, Apr., 1999.

FORTES-SILVA, R.; MARTÍNEZ, F. J.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Macronutrient selection in Nile tilapia fed gelatin capsules and challenged with protein dilution/restriction. **Physiol. Behav.**, v. 102, n. 3-4, p. 356-360, Mar., 2011.

FORTES-SILVA, R.; MARTÍNEZ, F. J.; VILLARROEL, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 156, n. 4, p. 445-450, Aug., 2010a.

FORTES-SILVA, R.; MARTÍNEZ, F. J.; VILLARROEL, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ F. J. Daily feeding patterns and self-selection of dietary oil in Nile tilapia. **Aquac. Res.**, v. 42, n. 1, p. 157-160, Dec., 2010b.

GONG, G.; XUE, M.; WANG, J.; WU, X. F.; ZHENG, Y. H.; HAN, F.; LIANG, X. F.; SU, X. O. The regulation of gluconeogenesis in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) affected later in life by a short-term high-glucose programming during early life. **Aquaculture**, v. 436, p.127-136, Jan., 2015.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, v. 170, n. 3-4, p. 267-283, Jan., 1999.

JHAA, P. K.; CHALLETB, E.; KALSBECK, A. Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 418, p. 74-88, Dec., 2015.

KALSBECK, A.; FLEUR, S.; FLIERS, E. Circadian control of glucose metabolism. **Mol. Metab.**, v. 3, n. 4, 372-383, July, 2014.

KITAGAWA, A. T.; COSTA, L. S.; PAULINO, R. R.; LUZ, R. K.; VIEIRA-ROSA, P.; GUERRA-SANTOS, B.; FORTES-SILVA, R. Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 171, p. 211-218, Oct., 2015.

KOTANI, T., FUSHIMI, H. Determination of appropriate feeding schedules from diel feeding rhythms in finfish larviculture. **Aquaculture**, v. 315, n. 1-2, p. 104-113, May., 2011.

KROGDAHL, A.; HEMRE, G.I.; MOMMSEN, T.P. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in post larval stages. **Aquacult. Nutr.**, n. 11, p.103-122, Apr., 2005.

KUUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II general properties. **J. Gen. Physiol.**, v. 30, n. 4, p.291-310, Mar., de 1947.

LI, X. F.; XU, C.; ZHANG, D. D.; JIANG, G. Z.; LIU, W. B. Molecular characterization and expression analysis of glucokinase from herbivorous fish *Megalobrama amblycephala* subjected to a glucose load after the adaptation to dietary carbohydrate levels. **Aquaculture**, v. 459, n. 1, p. 89-98, June, 2016a.

LI, X.; ZHU, X.; HAN, D.; YANG, Y.; JIN, J.; XIE, S. Carbohydrate utilization by herbivorous and omnivorous freshwater fish species: a comparative study on gibel carp (*Carassius auratus gibelio*. var CAS III) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Aquac. Res.**, v. 47, n. 1, p. 128-139, Jan., 2016b.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Feeding rhythms in fish: from behavioral to molecular approach In: KULCZYKOWSKA, E.; POPEK, W.; KAPOOR, B. G. (Eds.). **Biological clock in fish**. Enfield: Science Publishers, 2010, p. 155-184.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; EGEA-ÁLVAREZ, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? **Physiol. Behavior.**, v. 96, n. 4-5, p. 631-636, Mar., 2009b.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; SÁNCHEZ-MUROS, M. J.; BLANCO-VIVES, B.; APARICIO, R.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Daily rhythms of digestive physiology, metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquacult. Int.**, v. 20, n. 6, p. 1085-1096, May, 2012.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; MONTOYA, A.; OLIVEIRA, C.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Chronobiol. Int.**, v. 26, n. 7, p. 1389-1408, Oct., de 2009a.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; PUJANTE, I. M.; COSTA, L. S.; GALAL-KHALLAF, A.; MANCERA, J. M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Daily rhythms in the somatotrophic axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The time of day influences the response to GH administration. **Chronobiol. Int.**, v. 33, n. 3, p. 257-267, Mar., 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MATTOS, B. O.; NASCIMENTO-FILHO, E. C. T.; BARRETO, K. A.; BRAGA, L. G. T.; FORTES-SILVA, R. Self-feeder systems and infrared sensors to evaluate the daily feeding and locomotor rhythms of Pirarucu (*Arapaima gigas*) cultivated in outdoor tanks. **Aquaculture**, v. 457, p. 118-123, Feb., 2016.

MISTLBERGER, R. E. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 171-195, 1994.

MONTOYA, A.; LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; GARAYZAR, A. B. S.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma

glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under a light–dark cycle. **Physiol. Behav.**, v. 101, n. 1, 101-107, Aug., 2010.

MOON, T. W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 129, n. 2-3, p. 243-249, June, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NCR. **Nutrient requirements of fish/nutrient requirements of domestic animals.** Committee on animal nutrition, board on agriculture. National Academy Press, Washington, D.C., Estados Unidos, 1993.

PAREDES, J. F., LÓPEZ-OLMEDA, J. F., MARTÍNEZ, F. J., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Daily rhythms of lipid metabolic gene expression in zebra fish liver: response to light/dark and feeding cycles. **Chronobiol. Int.**, v. 32, n. 10, p. 1438-1448, Nov., 2015.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; ABELLÁN, E.; ARIZCUN, M.; CARDENETE, G.; MORALES, A. E.; HIDALGO, M. C. Nutritional and metabolic responses in common dentex (*Dentex dentex*) fed on different types and levels of carbohydrates. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 184, p. 56-64, June, 2015.

POLAKOF, S.; CEINOS, R. M.; FERNÁNDEZ-DURÁN, B.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence of feeding. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 146, n. 2, p. 265-273, Feb., 2007.

REN, M.; HABTE-TSION, H. M.; XIE, J.; LIU, B.; ZHOU, Q.; GE, X.; PAN, L.; CHEN, R. Effects of dietary carbohydrate source on growth performance, diet digestibility and liver glucose enzyme activity in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture**, v. 438, p. 75-81, Mar., 2015.

ROBYT, J. F.; WHELAN, W. J. Starch and its derivatives. In: RADLEY, J.A. (Ed.), **The  $\beta$ -amylases**. Academic Press, London, 1968, p. 477–497.

ROCHA, F.; DIAS, J.; GEURDEN, I.; DINIS, M. T.; PANSERAT, S.; ENGROLA, S. High-glucose feeding of Gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: effects on molecular and metabolic pathways. **Aquaculture**, v. 451, p. 241-253, Jan., 2016.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; MADRID, J. A.; ZAMORA, S.; IIGO, M.; TABATA, M. Demand-feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*, dual and independent phasing. **Physiol. Behav.**, v. 60, n. 2, p. 665-674, Aug., 1996.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J., ZAMORA, S., MADRID, J. A. Light–dark and food restriction cycles in European sea bass effect of conflicting zeitgebers on demand feeding rhythms. **Physiol. Behav.**, v. 58, n. 4, p. 705-714, Oct., 1995.

SANG-MIN, L.; KIOUNG-DUCK, K.; SANTOSH, P. L. Utilization of glucose, maltose, dextrin and cellulose by juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 427-438, May, 2003.

SIMÕES, L. N.; LOMBARDI, D. C.; GOMIDE, A. T. M.; GOMES, L. C. Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. **Zoologia**, v. 28, n. 3, p.285-290, June, 2011.

STEPHAN, F. K. The “other” circadian system: food as zeitgeber. **J. Biol. Rhythms.**, v. 17, n. 4, p. 284-292, Aug., 2002.

TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; BOUJARD, T.; FOSTIER, A.; KUHN, E. R.; MOL, K. A.; BAROILLER, J. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis Niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiol. Behav.**, v. 62, n. 2, p. 273-279, Aug., 1997.

VERA, L. M., CAIRNS, L., SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J., MIGAUD, H. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Chronobiol. Int.**, v. 26, n. 4, p. 666-681, May, 2009.

WALTER, H. E. Methods of enzymatic analysis, vol. V. In: BERGMAYER, H. U. (ed) **Proteinases**: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. Verlag Chemie, Weinheim, 1984, p. 270-277.

XIA, B.; GAO, Q. F.; WANG, J.; LI, P.; ZHANG, L.; ZHANG, Z. Effects of dietary carbohydrate level on growth, biochemical composition and glucose metabolism of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). **Aquaculture**, v. 448, p. 63-70, Nov., 2015.

ZHAO, H. X.; CAO, J. M.; LIU, X. H.; ZHU, X.; CHEN, S. C.; LAN, H. B.; WANG, A. L. Effect of supplemental dietary zinc sources on the growth and carbohydrate utilization of tilapia Smith 1840, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. **Aquacult. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 64-72, Feb., 2011.

## CAPÍTULO 2

---

### **Ritmos diários nas respostas imunes de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

## RESUMO

Os peixes exibem um padrão rítmico dos seus processos fisiológicos e comportamentais. O estudo avaliou as variações diárias nas respostas imunológicas e hematológicas de tilápia. Um total de 144 juvenis de tilápia do Nilo ( $38.06 \pm 0.42g$ ), foi distribuído em 12 tanques (60L)/12 peixes por tanque. Os peixes foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $28^{\circ}C$ ) e de fotoperíodo (12:12LD) e foram divididos em dois grupos. Um grupo foi vacinado contra *S. agalactiae* (T1) e outro grupo recebeu solução salina como controle (T2). O experimento foi desenvolvido em duas fases (fase 1: imunização dos peixes; fase 2: desafio com bactéria). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. Foram submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA) e teste de Duncan,  $p < 0,05$ . Para avaliar a presença de expressão rítmica dos genes e dos parâmetros imunológicos para um período definido de 24 horas, foi realizada análise de Cosinor (El Temps, v. 275, Díez-Noguera, Barcelona, Spain). A atividade de peroxidase demonstrou um ritmo diário (Cosinor,  $p < 0,05$ ), nos peixes do tratamento controle. Os níveis de IgM no soro dos peixes vacinados, demonstrou um padrão rítmico diário diurno, Cosinor ( $p < 0,05$ ) e diferença significativa entre os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ). Os peixes do grupo controle (T2), apresentaram expressões rítmica gênica para as citocinas TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ 3 e IL12 (COSINOR,  $p < 0,05$ ), todos com a acrofase no período diurno. Nos peixes do grupo controle, o VG e trombócitos demonstraram variação rítmica (COSINOR,  $p < 0,05$ ), como também o VG, o VCM e o CHCM demonstraram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Nos peixes vacinados houve diferença significativa para o VG, HCM e CHCM ( $p < 0,05$ ). Há evidências de variação diária das funções imunológicas e hematológica da tilápias, sincronizadas com o ciclo claro-escuro do dia. Isso reflete a importância da dimensão temporal na gestão do cultivo dessa espécie.

**Palavras-chave:** Expressão gênica, Rede imunológica rítmica, Relógio endógeno Rítmicos biológicos, Tilápia



## ABSTRACT

The fish exhibit a rhythmic pattern of their physiological, metabolic and behavioral processes. The study evaluated the daily changes in immunological and hematological responses of tilapia. A total of 144 juveniles of Nile tilapia ( $38.06 \pm 0.42\text{g}$ ) were distributed in 12 tanks (60)/12 fish per tank. The fish were kept under controlled temperature ( $28^\circ\text{C}$ ) and photoperiod (12: 12LD) and were divided into two groups. One group was vaccinated against *S. agalactiae* (T1) and another group received saline as control (T2). The experiment was conducted in two phases (phase 1: Fish immunization; Phase 2: challenge with bacteria). All results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. They were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan test,  $P < 0.05$ . To evaluate the presence of rhythmic expression of genes and immunological parameters for a set period of 24 hours was performed Cosinor analysis (Temps, v. 275, Diez-Noguera, Barcelona, Spain). Peroxidase activity showed a daily rhythm (COSINOR,  $P < 0.05$ ) in the control treatment of fish. IgM levels in fish serum vaccinated showed a diurnal daily rhythmic pattern, Cosinor ( $p < 0.05$ ) and significant difference between the collection points ( $p < 0.05$ ). The fish in the control group (T2), presented rhythmic gene expression for cytokines TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ 3 and IL12 (COSINOR,  $P < 0.05$ ), all with acrophase during the day. In fish the control group, GV and thrombocytes demonstrated rhythmic variation (COSINOR,  $p < 0.05$ ), as well as GV, MCV and MCHC showed statistical difference ( $p < 0.05$ ). In fish vaccinated significant difference to the GV, MCH and MCHC ( $p < 0.05$ ). There is evidence of daily variation of immunologic and hematologic functions of Tilapia, synchronized with the light-dark cycle of the day. This reflects the importance of the temporal dimension in this species cultivation management.

**Keywords:** Biological rhythms, Endogenous clock, Gene expression, Rhythmic immune network, Tilapia Nile

## 1 INTRODUÇÃO

As atividades do sistema imunológico se expressam de forma rítmica em várias espécies de animais. Pesquisas atestam essa ritmicidade na atividade do sistema imune inato de peixes como o European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) e o Gilthead seabream (*Sparus aurata*) (ESTEBAN et al., 2006), nos padrões oscilatórios de leucócitos, da lisozima e da peroxidase em tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (BINURAMESH e MICHAEL, 2011). Apesar do caráter endógeno (ASCHOFF, 1960), parte dos ritmos biológicos é influenciada pelo ciclo diário claro-escuro (BOEUF e BAIL, 1999). O fotoperíodo é um dos principais controladores dos organismos vivos e é um importante sincronizador de ritmos biológicos em peixes (LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2010).

Diversas variáveis imunológicas têm sido estudadas para o entendimento da resposta imune dos peixes e, dentre elas, estão: as peroxidases, enzimas relacionadas à eliminação de bactérias (ABBAS et al., 2008), contidas nos grânulos de células fagocíticas e liberadas após a fagocitose (ESTEBAN et al., 2013); as citocinas, polipeptídeos que agem como moléculas sinalizadoras do sistema imunológico (THOMPSON et al., 1994); o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), citocina que atua na indução da inflamação e estimula vários aspectos imunológicos (SAVAN e SAKAI, 2004); a interleucina 1 (IL-1), mediadora da resposta ao patógeno, agindo na imunidade natural e na inflamação (ABBAS et al., 2008); a interleucina 12 (IL-12), aumenta a secreção e a atividade do interferon gama (INF- $\gamma$ ) pelas células NK e pelos linfócitos T auxiliares (CD4+) e acentua a atividade citotóxica de células NK ativadas e linfócitos T citotóxicos (CD8+) (MARIE et al., 2006); o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), já identificado em teleósteos, tem função em seu sistema imune (ZHAN et al., 2015), e as imunoglobulinas (Ig), agentes mediadores da resposta humoral. Em peixes, a IgM é o principal anticorpo dessa resposta (BRADSHAW et al., 1971), estando presente no plasma, no muco e na bile (WANG et al., 2016).

Os ritmos diários de mediadores do sistema imune podem permitir que o hospedeiro perceba e evite a ação de ameaças microbianas de modo mais eficiente (SCHEIERMANN et al., 2013). Entretanto, o bem-estar do peixe está vinculado também a outros elementos rítmicos, como as variáveis hematológicas. O conhecimento

dessas variáveis são, também, essenciais ao diagnóstico de doenças e à identificação do estado fisiológico, nutricional e de estresse de peixes de cultivo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003). De Pedro et al. (2005) demonstraram variações diárias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de tenca (*Tinca tinca*) e Tavares-Dias e Morais (2004) revelaram aumento de leucócitos totais nos períodos de maior incidência de luz em bagre tropical (*Clarias lazera*).

A interrupção no ritmo circadiano de vertebrados e invertebrados exerce influência na resposta imune desses animais (DONGA et al., 2015). Assim, a ruptura dos ritmos diários pode deixar os peixes mais suscetíveis a doenças. A despeito da aquicultura ser uma possibilidade para atender a demanda por proteína animal, essa atividade ainda se depara com perdas por ação de patógenos (KNOW e KANG, 2016; MARTÍNEZ et al., 2016), o que torna a vacinação uma importante estratégia na prevenção de doenças em peixes de cultivo (TORANZO et al., 2009). Os parâmetros que alteram os ritmos diários das funções imunológicas e hematológicas têm implicação direta no estado de saúde do peixe e devem ser levados em consideração em um calendário de vacina, o que poderia influenciar seu efeito. Porém, existem poucos estudos voltados às variações diárias das respostas imunológicas e hematológicas dos peixes.

O presente estudo foi realizado para lançar luz sobre variações diárias nas respostas imunes em peixes, usando tilápia como modelo experimental, uma espécie importante na indústria da aquicultura mundial.

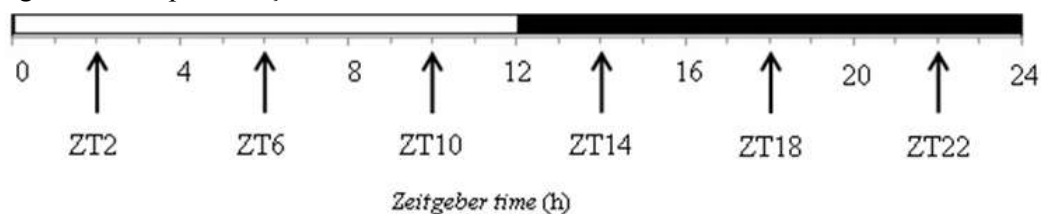
## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais e Instalações**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição e Comportamento Alimentar de Organismos Aquáticos, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)/Brasil no município de Cruz das Almas/Bahia, na região do Recôncavo da Bahia, a uma altitude de 220 metros, tendo como coordenadas geográficas 12° 40' 12" de latitude sul e 39° 06' 07" longitude oeste de Greenwich (BRASIL, 1992). Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de aclimação de duas

semanas. Um total de 144 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso inicial médio de  $38.06 \pm 0.42$ g, foi distribuído aleatoriamente, em 12 tanques (60L), perfazendo 12 peixes por tanque. Os peixes foram mantidos em condições controladas de temperatura (28°C) (Nice Automatic Thermostat, modelo 413-H, Korea) e de fotoperíodo 12:12LD controlado por um *timer* (Loud Advanced Technology, modelo TL-63A), com as luzes acesas às 6h. Por convenção, em estudos de ritmos circadianos, quando as luzes são acesas, esse período é denominado tempo *Zeitgeber* (sincronizador) (ZT), correspondendo a ZT0; e quando as luzes são apagadas, esse período corresponde a ZT12 (Figura 1).

Figura 10 - Representação dos horários circadianos.

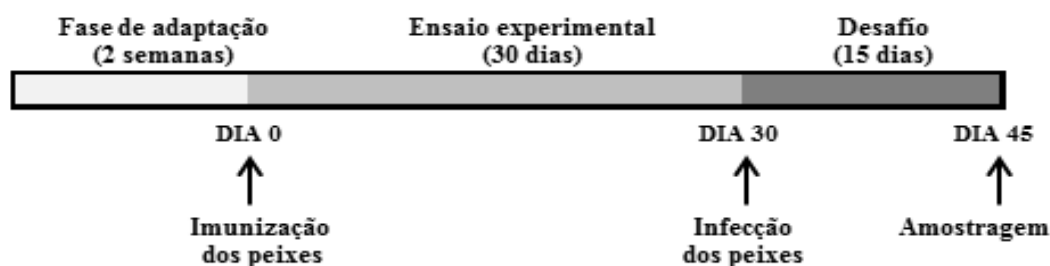


A fonte luminosa foi por meio de lâmpadas fluorescentes, 40W, usadas com intensidade de 475 lx (Instrutherm LD300, São Paulo, Brasil) durante o dia e 0 lx no período da noite. As coletas realizadas na fase escura eram feitas com auxílio de luz infravermelha. Todo o sistema foi isolado mantendo as boas práticas para o controle sanitário, conforme legislação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005). Os animais foram alimentados diariamente, à 9h, com ração comercial (35% de proteína), em 2% da biomassa.

## 2.2 Desenho Experimental

Após a fase de adaptação, os peixes foram divididos em dois grupos experimentais. Um grupo foi vacinado (T1) e outro grupo recebeu solução salina como controle (T2). O experimento foi desenvolvido em duas fases (fase 1: preparação imunológica dos peixes; fase 2: desafio com bactéria), conforme descrição a seguir e na Figura 11.

Figura 11 - Desenho Esquemático.



Fonte: Elaborada a partir de dados do delineamento da pesquisa

### 2.2.1 Fase 1: Imunização

Esta fase se fez necessária devido ao tempo para a completa resposta imunológica dos peixes que pode levar até 30 dias (YI et al., 2014; NUR-NAZIFAH et al., 2014) e também pela relação do tempo de exposição à determinada condição de luz-escuro com as repostas imunológicas (VALENZUELA et al., 2012). Assim, o grupo T1 (vacinados) recebeu 0,05mL da vacina por peixe, segundo recomendações do fabricante (Aquavac®StrepSA, cepas inativadas de *Streptococcus agalactiae*). A dose foi aplicada na região intraperitoneal, entre as nadadeiras pélvicas, enquanto o grupo T2 (controle) recebeu solução salina estéril. O procedimento foi feito durante 24 horas, em intervalos de 4 horas, compreendendo seis pontos de vacinação e de aplicação da solução salina (ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18 e ZT22).

Cada tanque, de cada tratamento (vacina ou solução salina), representou um ponto de aplicação, bem como coleta de amostras. Antes de cada tempo de vacinação, os peixes foram anestesiados com eugenol (óleo de cravo 50µL/L, Biodinâmica) (SIMÕES et al., 2011). Após 30 dias, deu-se por encerrada a fase 1 (período de

imunização), considerando os peixes aptos a receberem o desafio na fase 2. A mortalidade nesta fase foi quantificada para simples comparação com a fase posterior.

### ***2.2.2 Fase 2: Desafio (exposição dos peixes à cepa de *Streptococcus agalactiae*)***

Esta fase teve como objetivo avaliar o efeito da infecção pós-vacinação em diferentes momentos de um ciclo de 24 horas. Para o desafio bacteriano, o inóculo foi preparado utilizando uma cepa bacteriana de *Streptococcus agalactiae*, mantida no Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (UFRB), suspensa em 10mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubada a 37°C, por 24 horas, sendo a concentração utilizada de  $2,0 \times 10^7$  U.F.C/mL. A manipulação da cepa obedeceu às normas de biossegurança para laboratório nível 2. Esta concentração foi utilizada para estimular uma resposta imunológica sem que pudesse levar a uma infecção generalizada e alta mortalidade nos peixes (BAILONE et al., 2010; MARCUSSO et al., 2015; SILVA et al., 2009).

O desafio foi realizado nos mesmos horários de vacinação da fase 1, com intervalo de 4 horas, compreendendo seis pontos de desafio ZT2, ZT6, ZT10, ZT14, ZT18 e ZT22. A mortalidade dos peixes foi quantificada diariamente, até o final desta fase experimental de 15 dias, período considerado suficiente para haver uma completa reação ao desafio (LI et al., 2015; HUANG et al., 2014). O manejo da alimentação foi o mesmo nas duas fases do experimento.

## **2.3 Coleta de Amostras**

Após 30 dias da vacinação (fase 1) e 15 dias do desafio com *Streptococcus agalactiae* (fase 2), todos os peixes foram submetidos à coleta de sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos e imunológicos, bem como a coleta do rim cefálico para avaliação da expressão gênica de citocinas responsáveis pela resposta imunológica.

Os animais foram capturados e anestesiados com eugenol (50µL/L, óleo de cravo, Biodinâmica®), como mencionado em procedimento da etapa anterior. A coleta

sanguínea foi feita dentro do período de 24 horas, em intervalos regulares de 4 horas, compreendendo os mesmos 6 pontos de coleta das etapas experimentais. Para cada animal, foram colhidas duas alíquotas de sangue por meio da punção venocaudal. A primeira de 1mL, com seringas estéreis contendo 10 $\mu$ L do anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 10%, para obtenção de sangue total; e uma segunda alíquota de 0,5mL, com seringas sem anticoagulantes, para obtenção do soro. Ambas alíquotas foram transferidas para microtubos de polietileno de 1,5mL, e foram mantidas sob refrigeração, sendo encaminhadas para o Laboratório de Patologia e Análises Clínicas do Hospital Veterinário (UFRB), onde foram processadas. Para a obtenção do soro, as alíquotas sanguíneas coletadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 400xg durante 10 minutos. O soro coletado foi armazenado em tubos estéreis em -20°C para análises posteriores.

Após a coleta de sangue, os peixes foram submetidos à coleta do rim cefálico, correspondendo a seis pontos de coleta mencionados anteriormente. Após eutanásia, por secção medular, recolheu-se a cabeça de cada animal e, com auxílio de pinça cirúrgica, na região posterior desta, realizou-se a retirada da porção cranial (cefálica) do rim (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009a). As amostras de rim cefálico foram recolhidas em tubos de *ependorf*, conservadas em RNAlater (Sigma Aldrich) e mantidas a -21° C, até análises.

## 2.4 Análises Hematológicas

As análises foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)/Brasil. A contagem total de eritrócitos foi realizada na câmara de Neubauer ( $\times 10^6/\mu\text{L}^{-1}$ ) após diluição de 1:200 em solução de Natt & Herrick, segundo Ishikawa et al. (2008). A concentração de hemoglobina foi determinada de acordo com o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Bioplus 2000) com comprimento de onda igual de 540nm. O volume globular foi determinado pelo método de Goldenfarb (1971), em que 2/3 de microcapilares foram preenchidos com as amostras sanguíneas e depois centrifugados (Spin1000) a 12.000xg por 5 minutos. Os índices hematimétricos, como volume

corpúscular médio (VCM), hemoglobina corpúscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpúscular média (CHCM) foram calculados de acordo com o preconizado por Wintrobe (1934).

A contagem total e diferencial das células sanguíneas de defesa, leucócitos e trombócitos, foi realizada segundo metodologia indireta, proposta por Hrubec e Smith (1998), por assegurar maior grau de confiabilidade quanto à diferenciação entre os linfócitos e os trombócitos. Para tanto, foram confeccionadas extensões sanguíneas que foram coradas com May-Grunwald-Giemsa (ROSENFELD, 1947). Em seguida, para cada extensão foram quantificadas 2000 células, entre eritrócitos, leucócitos e trombócitos para obtenção do número total. Considerando o número total de células contadas na câmara de Neubauer, foi calculado o número total de leucócitos e de trombócitos (PITOMBEIRA e MARTINS, 1966; ROSENFELD, 1947) e aplicaram-se as fórmulas abaixo descritas:

$$\text{Leucócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Número de leucócitos X Número de eritrócitos/uL}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Número de trombócitos X Número de eritrócitos/uL}}{2000 \text{ eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

Foi determinada a concentração de proteína plasmática total pela técnica da refratometria (refratômetro), na qual o microcapilar, após centrifugação, foi quebrado, e uma gota do plasma foi utilizada.

## **2.5 Análises Imunológicas (Atividade da Peroxidase e IgM)**

As análises foram realizadas no Laboratório de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia (UM)/Espanha. A atividade da peroxidase no soro foi mensurada de acordo com (QUADE e ROTH, 1997). Para isso, 5 $\mu$ L de soro foi diluído em 45 $\mu$ L de HBSS (solução salina balanceada de HANKS), sem Ca<sup>+2</sup> ou Mg<sup>+2</sup> em placa de 96 poços de fundo chato. Foram adicionados a esta mistura 100 $\mu$ L da solução TMB



(tetrametilbenzidina 3,3',5,5'-di-hidrocloro) e  $5\mu\text{LH}_2\text{O}_2$ . A reação de mudança de cor foi interrompida após 2 minutos por adição de  $50\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico (2M) e a densidade ótica (OD) foi lida a 450nm em leitor de placa. Amostra padrão sem soro foi usada como branco.

Os níveis IgM do soro total foram analisados por meio de ensaio imunoenzimático ELISA (CUESTA et al., 2004). Assim,  $20\mu\text{L}$  de soro, diluído em 1:100 foram adicionados em placa de 96 poços de fundo chato em triplicata. As proteínas foram fixadas por incubação da placa a  $4\text{C}^\circ$  por toda a noite, com  $200\mu\text{L}$  de tampão carbonato-bicarbonato ( $35\text{mM NaHCO}_3$  e  $15\text{mM Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.6). Após três lavagens com PBT ( $20\text{mM Tris-HCl}$ ,  $150\text{mM NaCl}$  e  $0.05\%$  Tween 20, em pH 7.3) as placas foram bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente com tampão de bloqueio, contendo 3% de albumina de soro bovino (Sigma, Spain) em PBT e seguida de três lavagens com PBT. As placas foram incubadas por 1 hora com  $100\mu\text{L}/\text{poço}$  do anticorpo anti-IgM de tilápia (Aquatic Diagnostics Ltd., UK) (1:100 em tampão de bloqueio), lavadas e incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo-HRP (1:1000 em tampão de bloqueio, Sigma, Spain). Após lavagens com PBT, as placas foram reveladas usando  $100\mu\text{L}$  de uma solução  $0.42\text{mM}$  de TMB em solução tampão de  $100\text{mM}$  de ácido cítrico/acetato de sódio (pH 5.4), contendo  $0.01\%$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A reação foi deixada prosseguir durante 10 minutos e foi parada pela adição de  $50\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4(2\text{M})$ ; as placas foram lidas a 450nm. Os controles negativos consistiam em amostras sem soro ou sem anticorpo primário cujos valores de OD foram subtraídos para cada valor de amostra.

## 2.6 Expressão Gênica

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular del Centro de Apoyo a la Investigación y Desarrollo (CAID) de la Universidad de Murcia (UM)/Espanha. As amostras de rim cefálico foram submetidas à extração do RNA, à síntese de cDNA e à quantificação deste por meio da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), para avaliação da expressão gênica do fator de necrose tumoral ( $\text{TNF-}\alpha$ ), do fator de crescimento transformador ( $\text{TGF}\beta$ 1) e das interleucinas 1 beta ( $\text{IL-1}\beta$ ) e 12

(IL-12) nos diferentes horários de coleta. Para isso, as amostras de tecido foram homogeneizadas em Trizol<sup>®</sup>, em homogenizador (Polytron PT 1200<sup>®</sup> Kinematica Switzerland). Para extração do RNA total, o tecido homogeneizado foi misturado com clorofórmio por centrifugação. O RNA foi precipitado da fase aquosa com isopropanol por centrifugação. Sua concentração total foi determinada por Nanodrop (NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer), usando o ND-1000 v.3.5.2. *software*. O cDNA foi sintetizado por Super Script III Transcriptase reversa (Invitrogen) e Oligo (dT) primer (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

### **2.6.1 Primer e qPCR.**

Para a execução do PCR em tempo real, PCR SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) foi usado o aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Este foi programado para realizar ciclos de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A amplificação foi realizada para uma reação com volume total de 20µL, compreendendo cDNA, *primers (forward/reverse)* e qPCR Master mix, de acordo como as instruções do fabricante. Todo o qPCR foi processado em duplicata para cada amostra de cDNA. Para cada amostra de cDNA de tilápia foi incluído *primer* como um controle interno para normalizar a variação na quantidade de cDNA. A expressão relativa dos genes IL1 $\beta$ , IL12, TNF $\alpha$ 3 e TGF1 $\beta$  foi calculada por método CT com eficiência correlação, usando o fator de elongação 1 (EF1) como gene referência. Os *primers* dos oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na análise quantitativa de qPCR.

GENE	SEQUÊNCIA 5'→3' ( <i>Forward/Reverse</i> )	REFERÊNCIA
TGFβ1	Fw – TCCCTGCCAACTTGCTAT Rv – GAGATGACTTTGGGCTTGT	Zhan et al., 2015
TNFα3	Fw3 – GCTGGAGGCCAATAAAATCA Rv3 – CTCTGAGTAGCGCCAGATCC	Chen et al., 2016
IL12	Fw – GCAAAAGGCGGAAGATACTG Rv – TGAGCGCTGACAAATGCTAC	Primer3Plus
IL1β	Fw – TGGGCATCAAAGGCACAAAC Rv – AATCGCACCATGTGCTTTC	Primer3Plus
EF1α	Fw – GCACGCTCTGCTGGCCTTT Rv – GCGCTCAATCTCCATCCC	Primer3Plus

Sequência gênica dos *primer* 5'→3' (Fw=*forward*, Rv=*reverse*) do TGFβ1 (fator de crescimento transformador beta 1), TNFα3 (fator de necrose tumoral alfa 3), IL1β (interleucina 1 beta), IL12 (interleucina 12) e EF1α (fator de alongação 1 alfa)

## 2.7 Análises Estatísticas

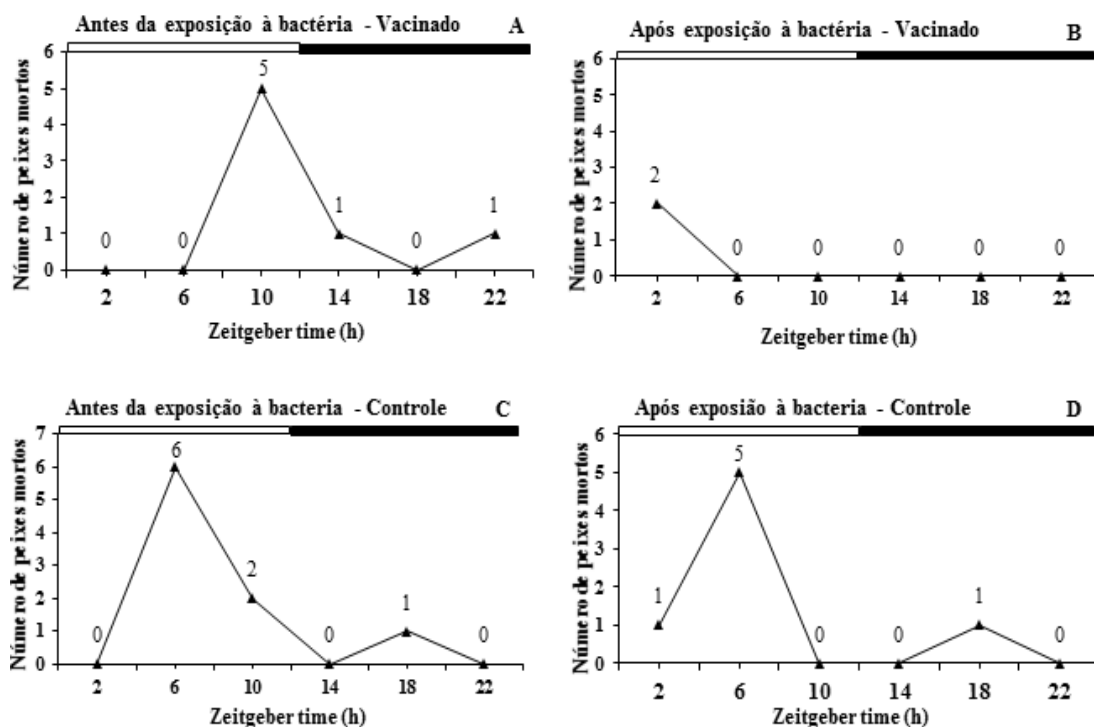
Todos os resultados foram expressos como média ± S.E.M. Foram submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA) e teste de Duncan,  $p < 0,05$ , usando o programa SPSS 19 (SPSS Inc., USA). Para avaliar a presença de expressão rítmica dos genes e dos parâmetros imunológicos para um período definido de 24 horas, foi realizada análise de Cosinor (*El Temps*, v. 275, Díez-Noguera, University of Barcelona, Spain) segundo procedimento descrito por (LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009; LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009a; LÓPEZ-OLMEDA et al., 2010). A análise foi feita para avaliar se a expressão circadiana dos genes, da atividade de peroxidase e dos níveis de IgM se ajustavam à função Cosinor ( $Y = M + A * [\text{Cos}(\Omega t + \Phi)]$ ), em que M é o mesor, A é a amplitude,  $\Omega$  é a frequência angular ( $360^\circ/24\text{h}$  para ritmos circadiano) e  $\Phi$  é a acrofase. Os níveis de significância estatística foram considerados para  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Mortalidade

Os resultados estão apresentados na figura 12ABCD.

Figura 12ABCD - Mortalidade dos peixes no período experimental antes da exposição (A-vacina, C-controle) e após a exposição à bactéria (B-vacina, D-controle).



Fonte: Elaborada a partir de dados originados da pesquisa. As barras brancas e pretas acima de cada gráfico representam o período de luz e o período de escuridão, respectivamente. Fig. AB (n=63), Fig. CD (n=56).

Na fase 1, previamente ao desafio (A e C), os animais do tratamento controle (C) (T2) tiveram um valor absoluto de mortalidade em ZT6. Já o grupo vacinado (A), apresentou mortalidade absoluta em ZT10. Esta mortalidade foi considerada normal, não havendo indício de doenças. Após o desafio (B e D) nos diferentes horários (fase 2)

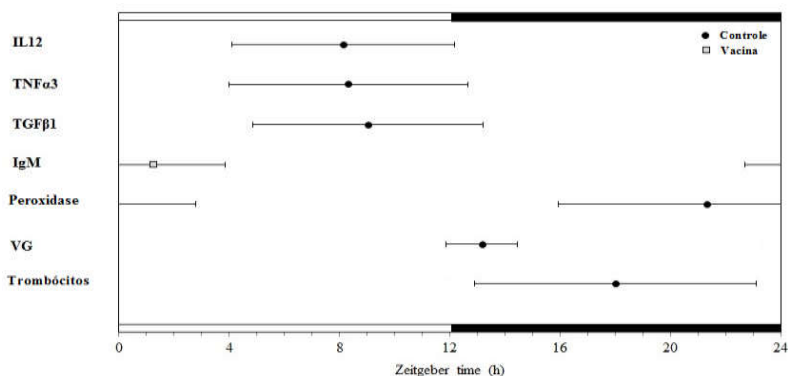
foi observado um padrão parecido de mortalidade semelhante para o grupo controle (D) em ZT6. Para o grupo vacinado (T1) este padrão não foi observado (B), após o desafio.

Estes resultados podem ser considerados como uma resposta rítmica diária à infecção e um efeito constante da vacina sobre a mortalidade. Uma variação diária da mortalidade foi observada em truta arco-íris (MCLEAY et al., 1979), atribuída a um ritmo circadiano sobre a tolerância a um agente tóxico (zinco). Valenzuela et al. (2012) observaram uma maior mortalidade relacionada a períodos com mais luz em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Fortes-Silva et al. (2016), ao estudarem o ritmo diário de bactérias intestinais moduladas por sinais ambientais (ciclo claro-escuro), concluíram que é possível a existência de uma janela circadiana que favorece as infecções e mortalidade em tambaquis (*Colossoma macropomum*), quando a homeostase não é mantida.

### 3.2 Variáveis Imunológicas

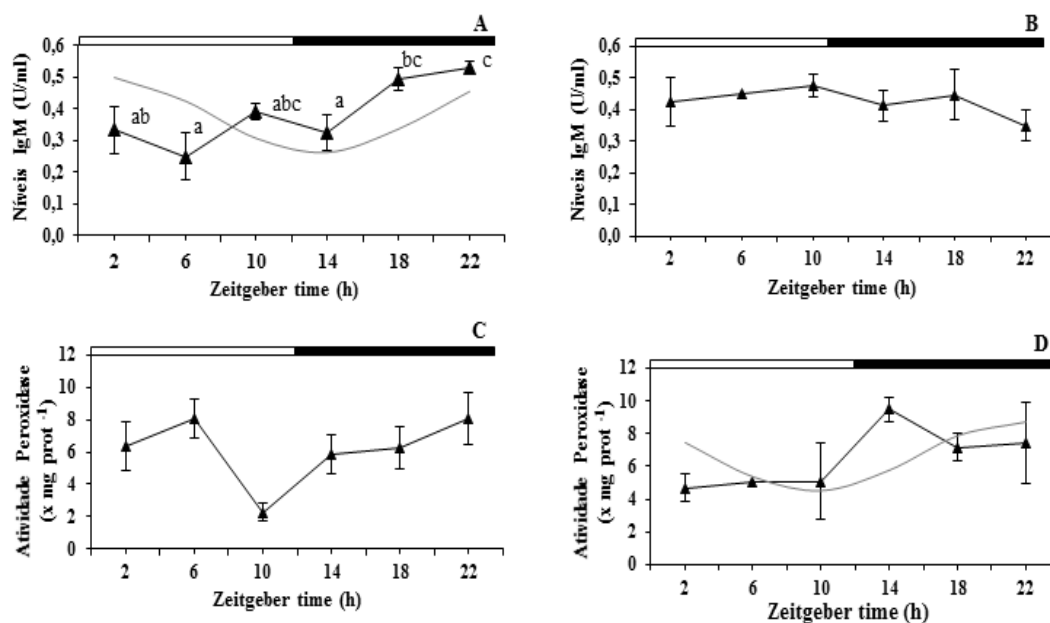
A atividade de peroxidase demonstrou um ritmo diário ( $p = 0,048$ ), com acrofase no período noturno ( $\Phi 21:34 \pm 05:40$  ZT) para o tratamento controle, sem vacinação (Figura 13 e Figura 14CD).

Figura 13 - Mapa de fase das variáveis IL-12, TNF $\alpha$ 3, TGF $\beta$ 1, peroxidase, IgM, VG e trombócitos.



Fonte: Elaborada a partir de dados originados do qPCR, ELISA, eritrograma e leucograma da tilápia. A acrofase é indicada por símbolos de acordo com o grupo experimental: quadrado branco, grupo vacina e círculos pretos, grupo controle. Os limites de confiança (95%) são indicados pelas barras laterais. O nome de cada fator analisado está indicado no lado esquerdo do gráfico. As barras brancas e pretas acima e abaixo do gráfico representam o período de luz e o período escuro, respectivamente.

Figura 14 ABCD - Valores dos níveis de IgM em peixes vacinados (A) e controle (B) e da atividade de peroxidase em peixes vacinados (C) e controle (D).



Fonte: Elaborada a partir dos dados originados da pesquisa. As barras brancas e pretas acima de cada gráfico representam o período de luz e o período escuro, respectivamente. A linha sinusoidal representa o ajustamento para um ritmo calculada pela análise de Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa identificada pelo teste de post hoc de Duncan (*one-way* ANOVA,  $p < 0,05$ ).

A acrofase ( $\Phi$ ) é a hora do dia em que aparece o máximo valor do ritmo (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009a). Ao se analisar os peixes vacinados, não foi observado ritmo diário ( $p > 0,05$ ) para esta variável pela análise do Cosinor. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos diferentes horários de coleta de sangue nos dois tratamentos. Os poucos resultados disponíveis acerca da influência do fotoperíodo sobre os níveis séricos de peroxidase sugerem que sua secreção depende das espécies de peixes (ESTEBAN et al., 2013). Os resultados mostraram que a peroxidase variou no grupo controle, durante as fases do dia, diminuindo com a luz e aumentando na fase escura. Isso pode ser o reflexo da sincronização com os níveis de melatonina, que é produzida em maior quantidade na fase noturna (FALCÓN, 2007). Esteban et al. (2006) demonstraram um claro ritmo diário da peroxidase com maior atividade às 8 horas (horário em que a luz era ligada), para Gilthead seabream (*Sparus aurata*). Para os autores, tal comportamento na atividade da peroxidase, nessa espécie, foi influenciado pelos níveis de melatonina. Enquanto, para o European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

não foi observado um padrão claro. Binuramesh e Michael (2011) em estudo com tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), também descreveram a atividade rítmica noturna da peroxidase relacionando este ritmo aos níveis de corticosteroides.

As principais diferenças na resposta imune humoral dos peixes em relação aos mamíferos são encontradas nos componentes de adaptação conhecidos como imunoglobulinas (Ig) (ESTEBAN et al., 2013). Os peixes do tratamento controle “sem vacina” não apresentaram ritmo diário ( $p > 0,05$ ) nos níveis de IgM do soro, não sendo também observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nos diferentes horários de coleta de sangue (Figura 14B). Entretanto, quando se analisaram os níveis de IgM no soro dos peixes vacinados, pôde-se observar um padrão de ritmo diário ( $p = 0,004$ ) para esta variável com uma acrofase em  $01:26 \pm 02:58$ , no início da fase de luz, quando começa a reduzir os níveis, voltando a subir na fase escura do dia. Foi registrado também diferença significativa entre os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostram também um aumento progressivo da IgM na fase escura, com maior valor no ZT22 (Figura 14A).

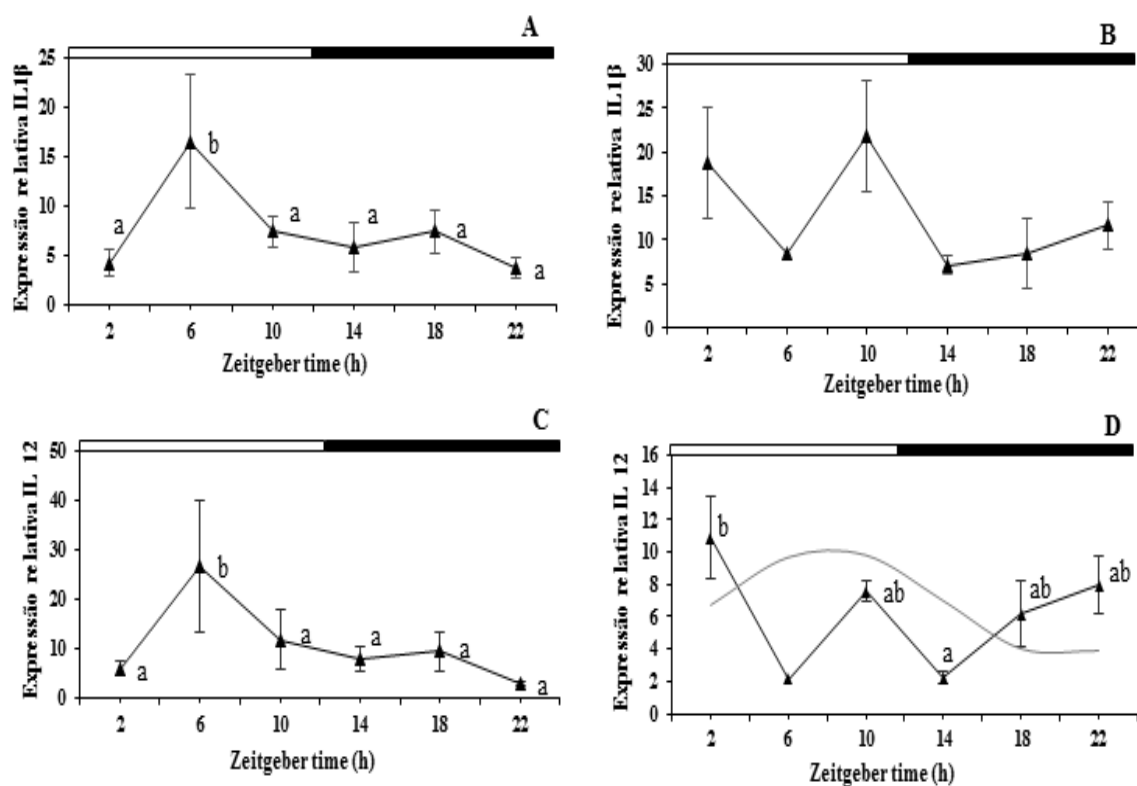
Em mamíferos, é reconhecido o efeito do fotoperíodo sobre o sistema imunológico, sendo demonstrada a ação que este exerce sobre a resposta adaptativa (KAPLAN et al., 2008; BILBO et al., 2003; SILVER et al., 2011). Portanto, a resposta imunitária em peixes parece ser alterada em ciclos anuais e diários (ESTEBAN et al., 2013). Tem sido sugerida uma relação entre níveis de melatonina para desempenhar um papel imunomodulador (BILBO et al., 2003; ESTEBAN et al., 2006). É possível que os resultados de IgM encontrados nesse estudo tenham uma relação de sincronização com os níveis de melatonina expressos nos diversos momentos do ciclo do dia. A resposta do IgM perante o processo de vacinação é uma resposta específica e a peroxidase é uma resposta inata.

### 3.2 Expressão Gênica

Os resultados podem ser vistos nas figuras 15ABCD e 16ABCD. Os peixes do grupo controle (T2) apresentaram as seguintes expressões gênicas:  $TGF\beta 1$  ( $\Phi = 09:03 \pm 4:18$  ZT),  $TNF\alpha 3$  ( $\Phi = 8:33 \pm 04:33$  ZT) e  $IL12$  ( $\Phi = 8:14 \pm 4:04$  ZT), todos com a

acrofase claramente no período diurno, exceto para o gene  $IL1\beta$  (Figuras 13, 15ABCDE e 16ABCD). Já para o grupo vacinado, não foi observado ritmo diário pela análise Cosinor ( $p>0,05$ ). Provavelmente isso se explique devido a um efeito da vacina produzindo respostas mais constantes dos parâmetros avaliados, implicando em menor variação das respostas à infecção. Por outro lado, a ritmicidade da expressão dos genes para o grupo controle, provavelmente foi devida à resposta espontânea e natural dos peixes. A ativação de TGF- $\beta$ 1 promove a indução da transcrição de *Bmal1*, um ativador transcricional da rede de autorregulação do relógio molecular, com um efeito de ritmo circadiano (DONG et al., 2016).

Figura 15 ABCD - Valores de expressão relativa de genes  $IL1\beta$  e  $IL12$  na tilápia no tratamento vacina (A, C) e controle (B, D), respectivamente.

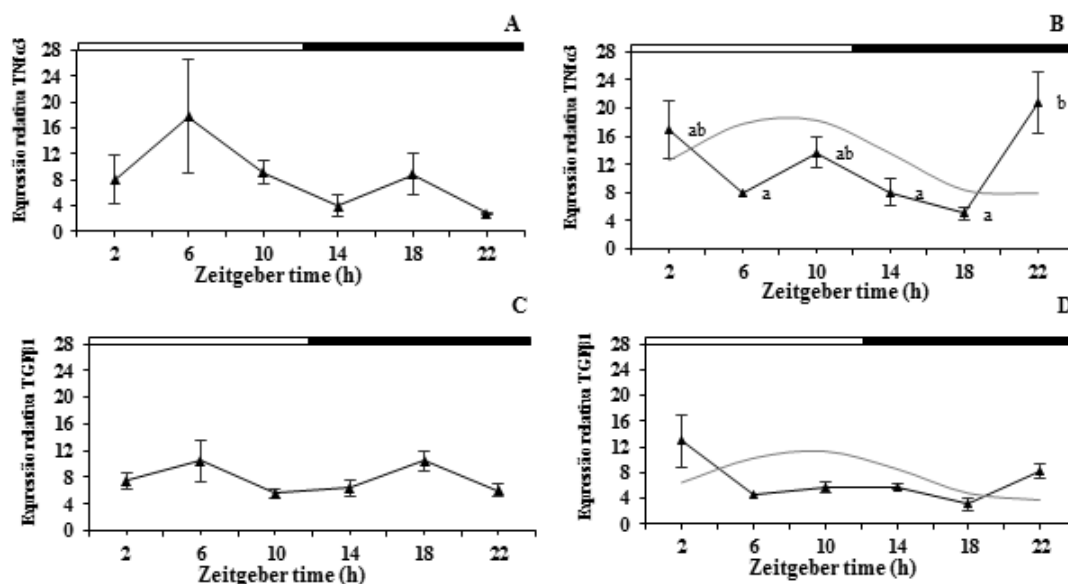


Fonte: Elaborada a partir dos dados originados da pesquisa.

As barras brancas e pretas acima de cada gráfico representam o período de luz e o período escuro, respectivamente. A linha sinusoidal representa o ajustamento para um ritmo calculado pela análise de Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa identificado pelo teste de *post hoc* de Duncan (*one-way* ANOVA,  $p<0,05$ ).



Figura 16 ABCD - Valores de expressão relativa de genes TNF $\alpha$ 3 e TGF $\beta$ 1 na tilápia no tratamento vacina (A, C) e controle (B, D), respectivamente.



Fonte: Elaborada a partir dos dados originados da pesquisa.

As barras brancas e pretas acima de cada gráfico representam o período de luz e o período escuro, respectivamente. A linha sinusoidal representa o ajustamento para um ritmo calculado pela análise de Cosinor sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa identificado pelo teste de *post hoc* de Duncan (*one-way* ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Os resultados revelaram uma acrofase para IL12 (T2) durante a fase de luz, com pico da expressão relativa de IL1 $\beta$  e IL12 também para a fase de luz (Figura 15AC).

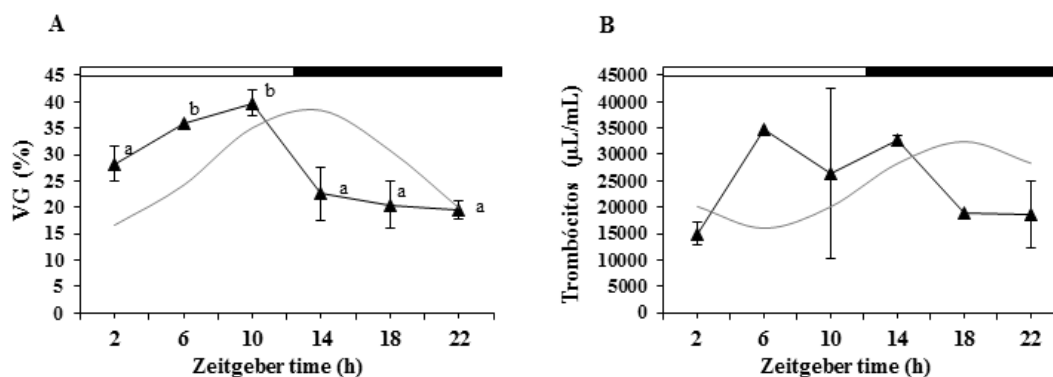
Em geral, nos mamíferos, a melatonina induz níveis mais elevados da expressão de genes imuno-competentes como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IFN- $\gamma$ , complexo de histocompatibilidade principal de classe II, factor de necrose tumoral-alfa, fator estimulador de colônias de macrófagos, fator de crescimento transformador-beta (GUERRERO e REITER, 2002). Contudo, em peixes parece existir uma maior variabilidade destes parâmetros considerados espécie-específico (ESTEBAN et al., 2013). É possível que esta plasticidade se deva a uma resposta inata à alta variabilidade da condição aquática, se comparado a animais terrestres, como temperatura e luminosidade. Por outro lado, o meio aquático é considerado de fácil disseminação de doenças (KARVONEN et al., 2010), o que poderia explicar a maior variação e adaptação dos peixes às adversidades.

A resposta imune inata nos animais era considerada como constante, isenta de variações sazonais (ELLIS, 2001). Entretanto, estudos têm mostrado uma forte influência da sazonalidade sobre tais respostas em variadas condições ambientais (MORGAN et al., 2008; VALERO et al. 2014). Em Gilthead seabream e em European sea bass foi possível observar uma ritmicidade circadiana para variáveis imunes, como peroxidase, complemento e lisozima (ESTEBAN et al., 2006). Contudo, segundo Esteban et al. (2013), mais estudos são necessários para esclarecer o papel da regulação da expressão dos genes pela ação da melatonina em peixes.

### 3.3 Variáveis Hematológicas

Os resultados mostraram que o percentual do volume globular sofreu variação significativa no tempo para o grupo controle, apresentando os maiores valores em ZT6 e ZT10 ( $p < 0,05$ ) (Figura 17AB).

Figura 17 AB - Valores médios de VG (A) e Trombócitos totais (B) no tratamento controle nos diferentes horários de coletas.



Fonte: Elaborada a partir dos dados originados da pesquisa.

As barras brancas e pretas acima de cada gráfico representam o período de luz e o período escuro, respectivamente. A linha sinusoidal representa o ajustamento para um ritmo calculado pela análise de Cosinor, sempre que esta análise foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam diferença significativa, identificada pelo teste de *post hoc* de Duncan (*one-way ANOVA*,  $p < 0,05$ ).

O volume globular (VG) é considerado um indicador dos efeitos de diversos fatores ambientais aos quais os peixes estão sujeitos (TAVARES-DIAS e FAUSTINO, 1998).

O VG apresentou ritmicidade circadiana pela análise Cosinor para o grupo controle com acrofase em 13:16±01:30 ZT (Figura 13), entre o final da fase claro e o início da fase escura. O ritmo diário encontrado para o grupo controle poderia explicar, em parte, um efeito estressor da infecção em animais não vacinados. Segundo os autores Wang et al. (1994) e Pierson et al. (2004) o volume globular pode ter seu percentual elevado em condições de estresse. A variação desse parâmetro pode ser resultante do aumento da atividade dos peixes. De Pedro et al. (2005), ao avaliarem os parâmetros hematológicos de tenca (*Tinca tinca*) observaram um aumento no percentual do volume globular em função da estação do ano, esse aumento foi registrado nas estações quentes quando a atividade dos peixes era maior.

O VG no grupo vacinado não apresentou variação rítmica diária, mas demonstrou diferença significativa ( $p<0,05$ ). Possivelmente, exista uma relação entre o aumento do VG e o horário de maior atividade dos peixes. Segundo Gallagher e Farrell (1998), o aumento da atividade dos animais pode induzir maior liberação no número de eritrócitos pelo baço, resultando no aumento do volume globular. Entretanto, o valor do volume globular também pode ser influenciado pelo aumento no tamanho dessas células (JENSEN, 1987; WANG et al., 1994).

Os animais do grupo controle também apresentaram aumento significativo ( $p<0,05$ ) nos valores de VCM e CHCM, enquanto que os animais do grupo vacinado apresentaram aumento significativo no CHCM (Tabela 2). Os resultados dos índices hematimétricos podem explicar o aumento observado no percentual do volume globular sem que tenha ocorrido, necessariamente, o aumento no número de eritrócitos, visto que o aumento nos valores desses índices pode representar o aumento no tamanho dos eritrócitos e na concentração de hemoglobina, respectivamente. Segundo Pierson et al (2004) o aumento nos valores desses parâmetros vem sendo relatado como resultantes de condições de estresse.

Os valores obtidos para trombócitos não apresentaram diferença estatística em um período de 24 horas em termos de valores absolutos (Figura 17B). Por outro lado, foi detectado pela análise Cosinor um ritmo circadiano claro com acrofase em ZT 18:01

± 05:11 (Figuras 13 e 17B). Este resultado foi observado apenas para animais do grupo controle. É possível considerar estes resultados como uma resposta natural dos animais ao desafio, já que os valores obtidos para o grupo vacinado não apresentaram ritmicidade. Em humanos, os ritmos diários da produção de células sanguíneas estão mais explorados. Em conformidade com Haus (1996), o número de células sanguíneas e suas funções em circulação: expressão da fagocitose, a resposta a mitógenos ou pela atividade de células NK, assim como a formação de células sanguíneas na medula óssea demonstram ritmos biológicos em várias frequências.

Tabela 2 - Médias ±S.E.M. do eritrograma de tilápias do Nilo dos grupos controle e vacinado nos diferentes fotoperíodos.

Variáveis	Zeitgeber (time h)						Valor F	P valor
	ZT2	ZT6	ZT10	ZT14	ZT18	ZT22		
<b>Controle</b>								
Hb <sup>1</sup> (g/dL)	5.228±0.431	6.470±0.001	4.817±0.925	5.480±0.224	4.730±0.750	5.278±0.435	0.605	p=0.698
VG <sup>2</sup> (%)	28.250±3.198	36.000±0.001	39.667±4.055	22.600±1.249	20.500±4.500	19.600±1.661	8.068	p=0.001
RBC <sup>3</sup> (x10 <sup>6</sup> /μL)	0.917±0.102	1.480±0.001	1.143±0.158	1.408±0.096	1.375±0.005	1.352±0.138	2.452	p=0.085
PPT <sup>4</sup> (mg/dL)	3.850±0.419	4.000±0.001	3.400±0.115	3.800±0.261	3.600±0.001	4.180±0.332	0.636	p=0.676
VCM <sup>5</sup> (fL/μL)	3.232±0.527	2.432±0.001	3.509±0.220	1.630±0.137	1.492±0.333	1.470±0.082	9.490	p<0.001
HCM <sup>6</sup> (pg/μL)	0.595±0.086	0.437±0.001	0.429±0.093	0.398±0.037	0.344±0.056	0.403±0.047	1.680	p=0.204
CHCM <sup>7</sup> (g/dL)	18.849±1.312	17.972±0.001	12.482±3.046	24.689±2.239	23.398±1.478	27.557±3.167	3.831	p=0.021
<b>Vacinados</b>								
Variáveis	ZT2	ZT6	ZT10	ZT14	ZT18	ZT22	Valor F	P valor
Hb <sup>1</sup> (g/dL)	4.980±0.274	5.103±0.655	3.980±0.500	5.810±0.879	5.480±0.001	6.307±0.163	1.930	p=0.157
VG <sup>2</sup> (%)	19.600±1.720	37.250±5.935	30.667±2.603	20.333±1.453	33.000±0.001	24.333±0.667	4.458	p=0.014
RBC <sup>3</sup> (x10 <sup>6</sup> /μL)	1.354±0.074	1.340±0.118	1.350±0.282	1.463±0.096	1.490±0.001	1.253±0.174	0.223	p=0.946
PPT <sup>4</sup> (mg/dL)	3.480±0.215	4.300±0.173	4.267±0.240	3.667±0.333	4.000±0.001	3.667±0.240	2.196	p=0.118
VCM <sup>5</sup> (fL/μL)	1.443±0.085	2.849±0.573	2.524±0.655	1.407±0.156	2.215±0.001	2.038±0.355	2.181	p=0.120
HCM <sup>6</sup> (pg/μL)	0.369±0.016	0.377±0.015	0.316±0.059	0.393±0.033	0.368±0.001	0.522±0.068	2.988	p=0.052
CHCM <sup>7</sup> (g/dL)	25.831±1.401	14.633±2.315	12.946±0.894	29.242±6.143	16.606±0.001	25.977±1.216	5.794	p=0.005

Fonte: Construída a partir dos dados originados do eritrograma das tilápias do Nilo. <sup>1</sup>Hemoglobina; <sup>2</sup>Volume globular; <sup>3</sup>Eritrócitos; <sup>4</sup>Proteína plasmática total; <sup>5</sup>Volume corpuscular médio; <sup>6</sup>Hemoglobina corpuscular média; <sup>7</sup>Concentração de hemoglobina corpuscular média; Médias ±S.E.M. ANOVA; Nível de significância P<0,05.

Variações de alguns parâmetros sanguíneos, diárias ou não, podem ser explicadas por fatores relacionados à transcrição e tradução da informação da característica analisada, levando à expressão desta. Os modelos atuais do mecanismo de

relógio circadiano molecular em células eucarióticas são baseados no *feedback* de transcrição-tradução (O'NEILL e REDDY, 2011). Nos estudos de Chen et al. (2000), os padrões de expressão dos genes (PER1 e PER2) em células totais de medula óssea exibiram dois picos ao longo de um período de 24 horas. De acordo com os autores, esses resultados indicam que existe um sistema de relógio na medula óssea. Embora as variações circadianas da hematopoiese já tenham sido bem documentadas em mamíferos, os estudos em peixes carecem de elucidação.

As variáveis que registraram um ritmo diário, tiveram suas acrofases relacionadas ao período noturno, evidenciando uma ligação com essa fase do período. Estudos recentes têm demonstrado que alguns parâmetros imunes de peixes seguem um ritmo circadiano e que estes são afetados pelo fotoperíodo e, provavelmente, por níveis de melatonina (ESTEBAN et al., 2013). Por outro lado, o presente estudo mostrou que os linfócitos imaturos tiveram o menor valor em ZT22, tanto para o grupo controle quanto para animais vacinados. Já os monócitos também tiveram variações diárias com uma predominância dos maiores valores no período noturno (Tabela 3). Contudo, ambos os parâmetros não apresentaram um ritmo diário após análise Cosinor. Estes valores corroboram De Pedro et al. (2005) que também mostraram valores diários significativamente flutuantes dos leucócitos totais e diferenciais em tenca (*Tinca tinca*). Da mesma forma, os trombócitos mostraram um ritmo diário, com acrofase noturna. Essas células desempenham um importante papel na homeostase, mas também exercem um papel relevante nos mecanismos de defesa, atuando nos processos inflamatórios e na atividade fagocítica (TAVARES-DIAS et al., 2000; MARTINS et al., 2001).

Tabela 3 - Médias do Leucograma de tilápias do Nilo dos grupos controle e vacinado, em diferentes fotoperíodos.

Parâmetros	Zeitgeber (time h)						Valor F	P valor
	ZT2	ZT6	ZT10	ZT14	ZT18	ZT22		
<b>Controle</b>								
Tromb. <sup>1</sup> (x10 <sup>3</sup> µL)	14.915±2.148	34.659±0.001	26.406±16.015	32.763±0.888	18.988±0.001	18.651±6.317	2.025	p=0.153
LT <sup>2</sup> (x10 <sup>3</sup> µL)	91.432±10.581	160.020±0.001	127.596±30.777	143.465±8.980	136.983±0.001	144.596±15.886	2.421	p=0.103
Lf. <sup>3</sup> (µL)	73.204±15234	135.685±0.001	90.902±41311	124.695±6976	75.273±0.001	120.811±7925	2.555	p=0.091
Lf. <sup>4</sup> Imat. (µL)	5.686±797	14.748±0.001	11.442±837	5.576±1004	15.597±0.001	6.636±3697	1.930	p=0.176
Nt. <sup>5</sup> (µL)	5.446±2905	4.424±0.001	9.680±8266	5.909±1906	25.769±0.001	5.105±1547	2.357	p=0.116
Mn. <sup>6</sup> (µL)	7.337±1241	2.950±0.001	13.684±957	7.851±1178	19.666±0.001	11.584±5019	1.445	p=0.283
Es. <sup>7</sup> (µL)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-
Bs. <sup>8</sup> (µL)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-
<b>Vacinados</b>								
Parâmetros	ZT2	ZT6	ZT10	ZT14	ZT18	ZT22	Valor p	P valor
Tromb. <sup>1</sup> (x10 <sup>3</sup> µL)	19.663±3.110	43.367±11.990	27.070±7.784	19669±9.035	13.121±0.001	25.533±3.645	1.545	p=0.243
LT <sup>2</sup> (x10 <sup>3</sup> µL)	136.602±7.643	134.251±11.899	136.118±25.958	145.495±8.538	151.624±0.001	128.526±18.819	0.186	p=0.963
Linf. <sup>3</sup> (µL)	119303±6889	114657±8895	94179±15920	115390±5508	110.802±0.001	98555±14670	0.31	p=0.493
Lf. <sup>4</sup> Imat. (µL)	9638±1227	9094±2262	14063±4619	8909±2323	14.579±0.001	6665±690	1.134	p=0.391
Nf. <sup>5</sup> (µL)	1.542±124	1905±384	18951±8748	18740±10327	10.934±0.001	12436±2859	1.538	p=0.263
Mn. <sup>6</sup> (µL)	6137±1940	7638±2269	8145±4342	3373±1513	15.308±0.001	10333±1989	1.111	p=0.405
Es. <sup>7</sup> (µL)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-
Bs. <sup>8</sup> (µL)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	-

Fonte: Construída a partir dos dados originados do leucograma da tilápia do Nilo. <sup>1</sup>Trombócitos; <sup>2</sup>Leucócitos totais; <sup>3</sup>Linfócitos; <sup>4</sup>Linfócitos imaturos; <sup>5</sup>Neutrófilos; <sup>6</sup>Monócitos; <sup>7</sup>Eosinófilos; <sup>8</sup>Basófilos; Médias ±S.E.M. ANOVA, nível de significância p<0,05.

De forma geral, algumas variáveis apresentaram um ritmo definido, porém outros permaneceram constantes, o que é aceitável quando se leva em consideração a complexidade do sistema imunológico e hematológico e o metabolismo de cada célula de defesa. Muitas células do sistema imunológico são dependentes de respostas bioquímicas para seu funcionamento diário. Células nucleadas, por exemplo, precisam de glicose para seu funcionamento. Neste caso, a disponibilidade de glicose também poderia ser rítmica e influenciar diretamente o metabolismo celular, provocando ou não um efeito rítmico diário. As células vermelhas do sangue são dependentes da glicólise para a síntese de ATP, sendo já observado dois ciclos de oscilação de ATP circadiano em humanos (O'NEIL e REDDY, 2011), o que corrobora a ideia de que os ciclos identificados são de origem metabólica. Quando a glicose foi administrada através de

injeção intraperitoneal em peixe-dourado (*Carassius auratus*), a cinética da glicose no sangue variou de acordo com o horário das refeições ao longo do dia, com a administração MD mostrando concentrações mais elevadas do que ML (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2009b). Isto, de certa forma, mostra a complexidade do sistema hematológico.

#### **4 CONCLUSÃO**

Tilápias do Nilo, submetidas a um fotoperíodo de 12:12LD, apresentaram expressão rítmica diária nas funções do sistema imunológico que consistiram em variação da expressão gênica, da peroxidase e de anticorpo, tanto entre os animais vacinados quanto entre os animais do grupo controle. Essa variação foi sincronizada com o ciclo claro-escuro do dia. Houve variação, também, nas funções do sistema hematológico, cujas evidências foram marcadas pelas variações rítmicas de células de defesa. Essas sincronizações destacam a dimensão temporal como um aspecto a ser considerado na gestão do cultivo dessa espécie.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAL

Considerando que as funções fisiológicas, metabólicas e comportamentais da tilápia do Nilo operam de forma rítmica, sincronizadas com as fases do dia; que são controladas por genes do relógio biológico e que as variáveis desses sistemas são utilizadas como indicadores de crescimento e de bem-estar dos peixes, estes resultados devem ser levados em consideração na aquicultura de tilápia. Ampliar o conhecimento dos efeitos específicos do gene relógio é de extrema importância nas respostas rítmicas metabólicas e fisiológicas, bem como os estudos de adaptação para as diferentes espécies de peixes e seus hábitos poderá fornecer um entendimento dos efeitos do tempo de alimentação na gestão de aquicultura.

Uma pesquisa mais aprofundada nesta área vai contribuir para a transposição de descobertas em práticas de aquicultura mais eficientes, que auxiliarão no gerenciamento de infecções e doenças, o que redundará em aumento da produção.

Ainda são raras as informações sobre a influência exercida pelo ciclo claro-escuro nas respostas imunológicas, hematológicas e sobre a homeostase dos peixes, principalmente quanto ao possível desencadeamento de enfermidades. Dessa forma, diante do constante e rápido crescimento da aquicultura e da intensificação dos sistemas intensivos de produção, são necessários estudos que abordem o efeito da dimensão temporal sobre o desenvolvimento dos peixes, avaliando horários de alimentação e a vacinação dos mesmos nas diversas fases de cultivo. Recomendações práticas que contemplem o ciclo claro-escuro podem representar uma abordagem que aprimore o bem-estar dos peixes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** v. 25, p. 11-28, 1960.

BAILONE, R.L.; MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N.; PEDROTTI, F.S.; NUNES, G.C.; SILVA, B.C. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) **Arch. Med. Vet.** n. 42, p. 221-227, 2010.

BILBO, S.D.; DHABHAR, F.S.; VISWANATHAN, K.; SAUL, A.; NELSON, R.J. Photoperiod affects the expression of sex and species differences in leukocyte number and leukocyte trafficking in congeneric hamsters **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 8, p. 1027-1043, Nov., 2003.

BINURAMESH, C. R.; MICHAEL, D. Diel variations in the selected serum immune parameters in *Oreochromis mossambicus*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 30, n. 3, p. 824-829, Mar., 2011.

BOEUF, G.; BAIL, P.Y.L. Does light have an influence on fish growth? **Aquaculture**, v. 177, n. 1-4, p.129–152, July, 1999.

BRADSHAW, C.M.; RICHARD, A.S.; SIGEL, M.M. IgM antibodies in fish mucus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 136, n. 4, p. 1122-1124, Apr., 1971.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas: 1961-1990**. Brasília: MARA, 1992. 84 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Procedimento para manipulação de microrganismos patogênicos e/ou recombinante**. Rio de Janeiro, 2005. 219p.

CHEN, C.; SUN, B.; GUAN, W.; BI, Y.; LI, P.; MA, J.; CHEN, F.; PAN, Q.; XIE Q. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of linolenic acid on non-specific immunity and anti-inflammatory responses in juvenile fish.

**Aquaculture**, v. 450, n.1, p. 250-257, Jan., 2016.

CHEN, Y.G.; MANTALARIS, A.; BOURNE, P.; KENG, P.; WU, J.H.D. Expression of mPer1 and mPer2, Two Mammalian Clock Genes, in Murine Bone Marrow. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, n. 2, p. 724-728, Sept., 2000.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Assoc. J.** v. 50, n. 6, p. 550-552, June, 1944.

CUESTA, A.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 101, n. 3-4, p. 203-210, Oct., 2004.

DE PEDRO, N.; GUIJARRO, A.I.; LÓPEZ-PATIÑO, M.A.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; DELGADO, M.J. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical, Aug., 2005.

DONG, C.; BAI, S.; DU, L. Temperature regulates circadian rhythms of immune responses in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 45, n. 2, p. 641-647, Aug., 2015.

DONG, C.; GONGORA, R.; SOSULSKI, M.L.; LUO, F.; SANCHEZ, C.G. Regulation of transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1)-induced pro-fibrotic activities by circadian clock gene BMAL1. **Respir. Res.**, v. 17. n. 4, 2016. In press.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 25, n. 8-9, p. 827-839, Oct.-Dec., 2001.

ESTEBAN, M.A.; CUESTA, A.; CHAVES-POZO, E.; MESEGUER, J. Influence of melatonin on the immune system of fish: a review int. **J. Mol. Sci.** v. 14, n. 4, p. 7979-7999, Apr., 2013.

ESTEBAN, M.A.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; MESEGUER, J. Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. **J. Pineal Res.**, v. 41, n. 3, p. 261-266, Oct., 2006.

FALCÓN, J. Nocturnal melatonin synthesis: How to stop it. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1473-1474, Apr., 2007.

FORTES-SILVA, R.; VIEIRA, V.P.; WINKALER, E.U.; GUERRA-SANTOS, B.; CERQUEIRA, R.B. Daily rhythms of locomotor activity and the influence of a light and dark cycle on gut microbiota species in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Biol. Rh. Res.**, v. 47, n. 2, p. 183-190, Oct., 2016.

GALLAUGHER, P.; FARREL, A. P. Hematocrit e blood oxygen-carrying capacity In: PERY, S.F.; TUFTS, B. **Fish respiration**. New York: Academic Press. Cap. 6, p. 185-227, June, 1998.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALLE, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 56, n. 1, p. 35-39, July, 1971.

GUERRERO, J.M.; REITER, R.J. Melatonin-immune system relationships. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, n. 2, p. 167-179, Feb., 2002.

HAUS, E. Biologic rhythms in hematology. **Pathol. Biol.**, v. 44, n. 7, p. 618-630, Sept., 1996.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Sydney: W.W. Lippincott, 1998, p. 1120-1125.

HUANG, L.Y.; WANG, K.Y.; XIAO, D.; CHEN, D.F.; GENG, Y.; WANG, J.; HE, Y.; WANG, E.L.; HUANG, J.L.; XIAO, G.Y. Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium* **Fish. Shellfish. Immunol.** v. 38, n. 1, p. 34-41, May., 2014.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixes *Oreochromis niloticus*. **Arch. Vet. Sci.**, v. 13, n. 1, p. 54-63, 2008.

JENSEN, F.B. Influences of exercise-stress and adrenaline upon intra- and extracellular acid-base status, electrolyte composition and respiratory properties of blood in tench (*Tinca tinca*) at different seasons. **J. Comp. Physiol. B.**, v. 157, n. 1, p. 51-60, 1987.

KAPLAN, J.E.; CHRENEK, R.D.; MORASH, J.G.; RUKSZNIS, C.M.; HANNUM, L.G. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes. **Comp. Biochem. Physiol. Part A – Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, n. 4 p. 726-730, Aug., 2008.

KARVONEN, A.; RINTAMÄKI, P.; JOKELA, J.; VALTONEN, E.T. Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n.13, p. 1483-1488, May., 2010.

KWON, H.C.; KANG, Y.J. Effects of a subunit vaccine (FlaA) and immunostimulant (CpG-ODN 1668) against *Vibrio anguillarum* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 454, n. 1, p. 125-129, Mar., 2016.

LI, L.P.; WANG, R.; LIANG, W.W.; HUANG, T.; HUANG, Y.; LUO, F.G.; LEI, A.Y.; CHEN, M.; GAN, X. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage in vitro. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 45, n. 2, p. 955-963, June, 2015.

LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. In: KULCZYKOWSKA, E.; POPEK, W.; KAPOOR, B.G. (Eds.). Feeding rhythms in fish: from behavioral to molecular approach. **Biological clock in fish**. Enfield: Science Publishers, 2010. p. 155-184.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; TARTAGLIONE, E. V.; IGLESIA, H. O.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Feeding entrainment of food-anticipatory activity and per1 expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions. **Chronobiol. Int.**, v. 27, n. 7, p.1380-1400, Aug., 2010.

LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; OLIVEIRA, C.; KALAMARZ, H.; KULCZYKOWSKA, E.; DELGADO, M.J.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Effects of water salinity on melatonin levels in plasma and peripheral tissues and on melatonin binding sites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) **Comp. Biochem. Physiol. A – Mol. Integr. Physiol.**, v. 152, p. 486-490, Apr., 2009a.

LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; EGEA-ÁLVAREZ, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? **Physiol. Behav.**, v. 5, n. 4-5, p. 631-636, Mar., 2009b.

LÓPEZ-OLMEDA, J.F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. Zebrafish temperature selection and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to ahemeral cycles of light and temperature. **Chronobiol. Int.**, v. 26, n. 2, p. 200-218, Feb., 2009.

MARCUSSO, P. F.; AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MELLO, H.; MARINHO NETO, F. A.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 52, n. 1, p. 57-62, 2015.

MARIE, J. C.; LIGGITT, D.; RUDENSKY, A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the t cell-specific targeting of transforming growth factor- $\beta$  receptor. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 441-454, Sept., 2006.

MARTINEZ, R.; CARPIO, Y.; MORALES, A.; LUGO, J. M.; HERRERA, F.; ZALDÍVAR, C.; CARRILLO, O.; ARENAL, A.; PIMENTEL, E.; ESTRADA, M. P. Oral administration of the growth hormone secretagogue-6 (GHRP-6) enhances growth and non-specific immune responses in tilapia (*Oreochromis* sp.) **Aquaculture**, v. 452, n. 1, p. 304-310, 2016.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, M.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substância irritantes na bexiga natatória. **Rev. Ictiol.**, v. 9, n. 1-2, p. 25-31, 2001.

MCLEAY, D. J.; MUNRO, J. R. Photoperiodic acclimation and circadian variation in tolerance of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to zinc. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.** v. 23, n. 1, p. 552-557, 1979.

MORGAN, A.L.; THOMPSON, K.D.; AUCHINACHIE, N.A.; MIGAUD, H. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 25, n. 6 p. 791-799, Dez., 2008.

NUR-NAZIFAH, M.; SABRI, M.Y.; SITI-ZAHRAH, A. Development and efficacy of feed-based recombinant vaccine encoding the cell wall surface anchor family protein of *Streptococcus agalactiae* against streptococcosis in *Oreochromis* sp. **Fish Shellfish Immunol.** v. 37, n. 1, p. 193-200, Mar., 2014.

O'NEILL J. S., REDDY, A. B. Circadian clocks in human red blood cells. **Nature**, v. 469, 498-503, Jan., 2011.

PIERSON, P. M.; LAMERS, A.; FLIK, G.; MAYER-GOSTAN, N. The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 137, n. 3, p. 665-678, July, 2004.

PITOMBEIRA, M. S. MARTINS, J. M. A direct method for white blood count in fishes. **Arquivo de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 6, n.2, p. 205, dez. 1966.

QUADE, M.J., ROTH J.A., A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v 58, p. 239-248, 1997.

ROSENFELD, G. Método de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

SAVAN, R.; SAKAI, M.; Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio* L): genomic and expression. analysis. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 87-94, July, 2004.

SCHEIERMANN, C.; KUNISAKU, Y.; FRENETTE, P. S. Circadian control of the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 190-198, Mar., 2013.

SILVA, B.C.; MARTINS, M.L.; JATOBÁ, A.; NETO, C.C.B.; VIEIRA, F.N.; PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q.; MOURIÑO, J.L.P. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 11, p. 874-880, Nov., 2009.

SILVER, A.C.; ARJONA, A.; WALKER, W. E.; FIKRIG, E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. **Immunity**, v. 36, n. 2, p. 251-261, Feb., 2011.

SIMÕES, L. N.; LOMBARDI, D. C.; GOMIDE, A. T. M.; GOMES, L. C. Efficacy of clove oil as anesthetic in handling and transportation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Actinopterygii: Cichlidae) juveniles. **Zoologia**, v. 28, n. 3, p. 285-290, June, 2011.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*, Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars. Vet.**, v. 14, n. 3, p. 254-263, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 107-114, jan-abr. 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Editora Eletrônica e Arte Final, 2004. 144p.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae). **Ver. Bras. Zool.**, v. 17, n. 4: p. 899-926, Dec., 2000.



THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORANZO, A.E.; ROMALDE, J.L.; MAGARIÑOS, B.; BARJA, J.L. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. **The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture.** Options Méditerranéennes, A, n. 86, p. 155-176, 2009.

VALENZUELA, A.; CAMPOS, V.; YANEZ, F.; ALVEAL, K.; GUTIERREZ, P.; RIVAS, M.; CONTRERAS, N.; KLEMPAU, A.; FERNANDEZ, I.; OYARZUN, C, Application of artificial photoperiod in fish: a factor that increases susceptibility to infectious diseases? **Fish. Physiol. Biochem.**, v. 38, n. 4, p. 943-950, Dez., 2012.

VALERO, Y.; GARCÍA-ALCAZAR, A.; ESTEBAN M.A.; CUESTA, A.; CHAVES-POZO, E. Seasonal variations of the humoral immune parameters of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) **Fish Shellfish Immunol.**, v. 39, n. 2, p. 185-187, Aug., 2014.

WANG, R. H.; XIAO, T.Y.; ZENG, L.B.; LIU, X.Y.; ZHOU, Y.; MA, J. Generation and use of *Edwardsiella ictaluri* ghosts as a vaccine against enteric septicemia of catfish (ESC). **Aquaculture**, v. 456, p. 9-15, 2016.

WANG, Y.; HEIGENHAUSER, G.J.; WOOD, C.M. Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. **J. Exp. Biol.**, v. 195: p. 227-258, Oct., 1994.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. **Fol. Haematol.**, v. 51, p. 32-49, 1934.

YI, T.; LI, Y.W.; LIU, L.; XIAO, X.X.; LI, A.X. Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase **Aquaculture**, v. 428-429, p. 35-40, 2014.

ZHAN, X.L.; MA, T.A.Y.; WU, J.Y.; YI, L.Y.; WANG, J.Y.; GAO, X.K.; LI, W.S. Cloning and primary immunological study of TGF- $\beta$ 1 and its receptors T $\beta$ RI/T $\beta$ R II in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Dev. Comp. Immunol.** v. 51, n. 1, p.134-140, June, 2015.

ZHAN, Y.; JIMMY, K. Molecular isolation and characterization of carp transforming growth factor  $\beta$ 1 from activated leucocytes. **Fish Selfish Immunol.**, v. 10, n. 4, p. 309-318, May., 2000.