

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Exposição à salinidade induz alteração na
expressão de genes relacionados à regulação do
apetite e danos oxidativos na tilápia-do-Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**

Amanda Weege da Silveira Martins

Pelota

2021

Amanda Weege da Silveira Martins

Exposição à salinidade induz alteração na expressão de genes relacionados à regulação do apetite e danos oxidativos na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Vinicius Farias Campos

Pelotas
2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M379 Martins, Amanda Weege da Silveira

Exposição à salinidade induz alteração na expressão de genes relacionados à regulação do apetite e danos oxidativos na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Amanda Weege da Silveira Martins ; Vinicius Farias Campos, orientador. — Pelotas, 2021.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Tilápia-do-Nilo. 2. *npv*. 3. *cart*. 4. *cck*. 5. Ingestão de alimentos. I. Campos, Vinicius Farias, orient. II. Título.

CDD : 597.0929

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Danillo Pinhal

Doutor em Genética e Livre-Docência em Genética e Evolução pela Universidade Estadual Paulista

Dr. Tony Leandro Rezende da Silveira

Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Dr. William Borges Domingues

Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Idelena e José Antônio e ao meu padrasto, Antônio pelo incentivo, força e amor incondicional nessa minha trajetória acadêmica. Sem vocês essa realização não seria possível, portanto, sou eternamente grata. Também gostaria de agradecer à minha irmã Bruna pela amizade e companheirismo durante essa jornada.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Vinicius por ter me recebido no Laboratório de Genômica Estrutural, ainda no primeiro semestre da graduação, e por toda ajuda, confiança e ensinamentos durante esses seis anos. Agradeço também à banca examinadora, Dr. Tony Silveira e Dr. William B. Domingues, por acreditarem no meu potencial desde o início da minha trajetória na Biotecnologia. Vocês são exemplos de profissionais e me inspiram.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Genômica Estrutural, principalmente Eduardo D. e Eduardo B., que não mediram esforços para me auxiliar em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ainda agradeço imensamente a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que me apoiaram nesse período.

Gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudos concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

"We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something"

Marie Curie

Resumo

MARTINS, Amanda Weege da Silveira. **Exposição à salinidade induz alteração na expressão de genes relacionados à regulação do apetite e danos oxidativos na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2021.54f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A tilápia é uma das espécies mais importantes da aquicultura e uma fonte primária de proteína em muitos países em desenvolvimento. Nos últimos anos, estudos estão sendo realizados a fim de desenvolver, de forma eficiente, a produção dessa espécie em água salobra. Em peixes, variações ambientais como flutuações na salinidade podem induzir mudanças no comportamento alimentar e no crescimento. Atualmente, pouco se sabe sobre a influência de altas salinidades na modulação de genes relacionados fatores endócrinos reguladores de apetite em peixes, mais especificamente na espécie *Oreochromis niloticus*. No contexto da piscicultura, um melhor conhecimento destes fatores gênicos pode levar ao aprimoramento das medidas de manejo da espécie, acarretando o aumento da capacidade produtiva em ambientes de água salobra. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar os genes marcadores da regulação do apetite em tilápias expostas a diferentes salinidades. Além disso, o estudo teve como objetivo sequenciar e caracterizar os genes *cart*, *cck* e *pyy* e quantificar suas expressões no cérebro e intestino dos peixes por meio da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa. Os animais foram expostos a 6 e 12ppt de sal por 21 dias. Parâmetros oxidativos como a peroxidação lipídica, produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e fragmentação do DNA genômico e a fluidez da membrana das células sanguíneas foram quantificados por citometria de fluxo. Os resultados indicaram um aumento da expressão dos genes *cart*, *pyy* e *cck* e uma diminuição da expressão de *npv* no cérebro dos peixes expostos à maior concentração de sal, enquanto *cck* teve sua expressão regulada positivamente e *npv* foi regulado negativamente no intestino. Estes resultados juntamente com outras respostas adaptativas podem ter causado a diminuição significativa no peso corporal final, crescimento específico e ganho de peso observado. Além disso, foi demonstrada a ocorrência de dano oxidativo nas células sanguíneas, uma vez que a peroxidação lipídica, EROs e os danos ao DNA tiveram seus níveis elevados nos peixes expostos à 12ppt. Assim, esse estudo gerou dados importantes para o desenvolvimento de biotecnologias que auxiliem na melhora da produção de peixes de cultivo.

Palavras-chave: tilápia-do-Nilo; *cart*; *npv*; *cck*; ingestão de alimentos

Abstract

WEEGE DA SILVEIRA MARTINS, Amanda. **Exposure to salinity induces changes in the expression of genes related to appetite regulation and oxidative damage in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2021. 54f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Tilapia is one of the most important species in aquaculture and a primary source of protein in many developing countries. In recent years, studies have been carried out to efficiently develop the production of this species in brackish water. In fish, environmental variations such as fluctuations in salinity can induce changes in feeding behavior and growth. Currently, little is known about the influence of high salinities on genetic variations related to endocrine factors that regulate appetite in fish, more specifically in the species *Oreochromis niloticus*. In the context of fish farming, a better understanding of these variations can lead to the improvement of the species and increasing the quality of production of farmed fish. Therefore, the objective of this study was to identify the marker genes of appetite regulation in tilapia exposed to different salinities. In addition, the study aimed to sequence and characterize the genes *cart*, *cck* and *pyy* and quantify their expression in the brain and intestine of fish through the quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The animals were exposed to 6 and 12ppt of salt for 21 days. Oxidative parameters such as lipid peroxidation, reactive oxygen species (ROS), DNA damage, and blood cell membrane fluidity were quantified by flow cytometry. The results indicated an increase in the expression of genes *cart*, *pyy* and *cck* and a decrease in the expression of *npv* in the brain of fish exposed to higher salt concentration, while *cck* had its expression up-regulated and *npv* was down-regulated in the intestine. These results together with other adaptive responses may have caused the significant decrease in final body weight, specific growth, and observed weight gain. In addition, we show oxidative damage in blood cells, since lipid peroxidation, ROS, DNA damage had its high levels in fish exposed to 12ppt. Thus, this study generated important data for the development of biotechnologies that help to improve the production of farmed fish.

Keywords: Nile tilapia; *cart*; *npv*; *cck*; gene expression; food intake

Lista de Abreviaturas

CART	Fator de Transcrição Regulada por Cocaína e Anfetamina
CCK	Colecistoquinina
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of The United Nations</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mRNA	RNA Mensageiro
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Do Inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PYY	Peptídeo YY
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato Gastrointestinal

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Piscicultura.....	6
2.2 Fatores endócrinos reguladores de apetite.....	8
2.3 Marcadores genéticos em peixes	10
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	12
3.1 Hipótese	12
3.2 Objetivo Geral	12
3.3 Objetivos Específicos	12
4 CAPÍTULO	12
4.1 Manuscrito 1 – Exposure to salinity induces oxidative damage and changes in the expression of genes related to appetite regulation in Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	13
6 CONCLUSÃO GERAL.....	39
7 REFERÊNCIAS.....	40
8 ANEXOS	45
Anexo A – Comissão de Ética em Experimentação Animal	45

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil destaca-se entre os países que apresentam um grande potencial para a produção aquícola. Características como clima favorável, vasta disponibilidade hídrica, ocorrência natural de espécies aquáticas além da capacidade de aprimoramento e desenvolvimento tecnologias de produção de espécies com potencial de mercado são responsáveis por evidenciar o país nesse ramo de produção (BRABO et al., 2016; ROCHA et al., 2013). Apenas em 2020, o Brasil produziu mais de 802 mil toneladas de peixes de cultivo, representando um crescimento de 5,93% sobre o ano anterior (CRIVELENTI et al., 2006; LOPES et al., 2021). Com isso, o aprimoramento da produção de peixes cresce com apoio das pesquisas desenvolvidas no país (LOPES et al., 2021).

Das principais espécies de peixes produzidas na aquicultura mundial, evidencia-se a produção de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma espécie da família Cichlidae, nativa de lagos e rios de água doce africanos (RONKIN et al., 2015). De acordo com a Associação Brasileira de piscicultura, a tilápia representou 60,6% (cerca de 486 mil toneladas) de toda piscicultura brasileira em 2020, produção essa que mantém o país na 4ª posição entre os maiores produtores da espécie em termos globais. Além disso, a tilápia mantém posição de liderança no ranking de exportações, respondendo por 88,17% das vendas externas e gerando uma receita de US\$10,3 milhões (LOPES et al., 2021). Essa expressiva produção deve-se as características favoráveis da tilápia, como adaptabilidade a diversos sistemas de cultivo; reprodução fácil e alta fecundidade; aceitação ao alimento artificial e rápido crescimento (SANTOS et al., 2015).

Por conta da escassez de água doce em muitos países e a competição por ela com outras atividades urbanas, nos últimos anos estudos estão sendo realizados a fim de desenvolver, de forma eficiente, a produção dessa espécie em água salobra e água do mar (EL-SAYED, 2006; MOHAMED et al., 2021). Os peixes são capazes de se aclimatar a diferentes salinidades através da osmorregulação, entretanto, altos níveis de salinidade se tornam condições estressantes uma vez que alteram as funções fisiológicas importantes, como a alimentação (QIN et al., 2020; VAN DOAN et al., 2019).

A alimentação é extremamente importante para a produção de peixes, uma vez que é responsável por fornecer a energia química utilizada para a manutenção basal do organismo, locomoção, crescimento somático ou reprodução

(RØNNESTAD et al., 2017). Pesquisadores já observaram que o aumento da salinidade afetou negativamente o crescimento da tilápia do Nilo, assim como o crescimento, ingestão alimentar e taxa de conversão alimentar em *Carassius auratus* (GAN et al., 2016; LUZ et al., 2008). Yan e colaboradores (2004) sugeriram que a diminuição do crescimento com o aumento da salinidade em *Fugu obscurus* está relacionada à diminuição do consumo alimentar (apetite) (YAN et al., 2004).

Sabe-se que a alimentação em vertebrados é regulada por diversos fatores, entre eles estão uma ampla gama de hormônios estimuladores (orexigênicos) ou inibidores (anorexigênicos) de apetite, os quais são produzidos pelo cérebro e pelos órgãos periféricos (GORISSEN; FLIK; HUISING, 2006). Entre os principais hormônios envolvidos na regulação do apetite estão o, neuropeptídeo Y (Npy), o fator de transcrição regulada por cocaína e anfetamina (Cart), a colecistoquinina (Cck), o peptídeo YY (Pyy), produzidos nos órgãos periféricos (principalmente fígado e intestino) e cérebro de peixes (VOLKOFF, 2016). A mudança no comportamento dos peixes pode induzir alterações na expressão de mRNAs ligados a estes fatores (VOLKOFF; HOSKINS; TUZIAK, 2010).

Atualmente, pouco se sabe sobre a influência de altas salinidades nas variações genéticas relacionadas aos fatores endócrinos reguladores de apetite em peixes, mais especificamente na espécie *Oreochromis niloticus*. No contexto da piscicultura, um melhor conhecimento dessas variações pode levar ao melhoramento genético por seleção de características, como uma melhor eficiência alimentar e crescimento mais rápido, acarretando na melhora da produção dos peixes cultivados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Piscicultura

Os desenvolvimentos científicos dos últimos 50 anos conduziram a uma melhor compreensão do funcionamento dos ecossistemas aquáticos e à melhora de sistemas de cultivo resultando no aumento da produção mundial de pescado. A disponibilidade de organismos aquáticos através da aquicultura revelou importância social e econômica no ramo agropecuário, podendo auxiliar na geração de emprego e renda contribuindo no desenvolvimento rural (CRIVELENTI et al., 2006; IGARASHI, 2021). A piscicultura é o setor de produção animal com maior taxa de crescimento nos últimos 20 anos no Brasil (LOPES et al., 2021; RORIZ et al., 2017) e esse crescimento se deu devido aos recursos hídricos do país, as dimensões continentais, ao empreendedorismo dos produtores e ao aprimoramento da produção de peixe com apoio das pesquisas desenvolvidas no país (LOPES et al., 2021). A década de 70 foi marcada pela intensificação das pesquisas na área da aquicultura no País, ocorrendo a constituição de equipes de caráter multidisciplinar, demandando pesquisadores nas mais diversas áreas das ciências biológicas, saúde e administração (IGARASHI, 2021). A introdução de novas técnicas de produção, com custos acessíveis em 1980 promoveu ganhos significativos de produtividade e qualidade e, conseqüentemente, uma rápida expansão da aquicultura no país (DE SIQUEIRA, 2018).

Em 2019, a produção mundial da pesca e da aquicultura atingiu 177,8 milhões de toneladas (peso vivo) com um valor total de primeira venda estimado em US\$ 401 bilhões. Dados divulgados pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) mostram que o Brasil se encontra entre os 14 maiores produtores mundiais de pescado (FAO, 2020). Nos últimos anos, o censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstrou a força da aquicultura no país, uma vez que a atividade está presente em todo o território nacional de maneira forte e consolidada e apenas em 2020 a produção aquícola brasileira atingiu a marca de 802.930 toneladas (t) de peixes de cultivo, 5,2% a mais que o ano anterior (LOPES et al., 2021). Estes dados indicam que a piscicultura no Brasil pode apresentar tendência à intensificação dos cultivos, demandando maiores quantidades de técnicos, alevinos e alimentos (IGARASHI, 2021).

Peixes nativos como tambaqui, tambacu, pirarucu e surubim representam um segmento importante da piscicultura brasileira, atingindo 278.671 t em 2020. Outras

espécies (carpa, truta e pangasius) também mostraram bom desempenho, com crescimento de 10,9% em relação a 2019, somando 38.104 t em 2020 (LOPES et al., 2021). A tilápia, por sua vez, é uma das espécies mais importantes da aquicultura e uma fonte primária de proteína em muitos países em desenvolvimento. A produção brasileira cresceu 12,5%, atingindo 486.155 t em 2020. Com esse excelente desempenho, a espécie consolidou-se no cenário nacional e sua participação na produção total de peixes de cultivo chegou a 60.6% (IGARASHI, 2021; LOPES et al., 2021).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie da família Cichlidae, nativa de lagos e rios de água doce africanos, que foi introduzida no Brasil na década de 70 pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Na década de 1980, foram produzidas grandes quantidades de alevinos principalmente em São Paulo e Minas Gerais, posteriormente a espécie foi introduzida em outros corpos hídricos do Nordeste, Sudeste e região Sul (SCHULTER; FILHO, 2017). A partir de então, a tilapicultura tornou-se uma das atividades mais produtivas e crescentes no país, uma vez que a espécie possui características extremamente favoráveis para produção, como adaptabilidade a diversos sistemas de cultivo; reprodução fácil e alta fecundidade; aceitação ao alimento artificial e rápido crescimento; boa aceitação pelo mercado consumidor e alto valor econômico (SANTOS et al., 2015).

Por conta da escassez de água doce em muitos países e a competição por ela com outras atividades urbanas, nos últimos anos estudos estão sendo realizados a fim de desenvolver, de forma eficiente, a produção dessa espécie em água salobra e água do mar (EL-SAYED, 2006; MOHAMED et al., 2021). Apesar de serem peixes de água doce, acredita-se que as tilápias tenham ancestrais marinhos (BEVERIDGE; MCANDREW, 2012) e, por isso, a maioria das espécies é capaz de tolerar uma certa faixa de salinidade da água. A taxa de mortalidade torna-se considerável a partir de 23 g/L, sendo atribuída ao estresse hiperosmótico, que torna o animal suscetível a enfermidades (EL-SAYED; MANSOUR; EZZAT, 2005; FONTAÍNHAS-FERNANDES et al., 2002). A tolerância à salinidade depende principalmente da espécie, do tamanho, do tempo/método de aclimação e de fatores ambientais, sendo que *O. niloticus*, por exemplo, atinge tolerância máxima à salinidade com 5,17 cm de comprimento corporal e um maior crescimento não altera sua tolerância. Dentre as espécies de tilápia, a tilápia-do-Nilo é a menos tolerante a

altas salinidades. Consequentemente estas condições se tornam estressantes e desencadeiam respostas negativas, afetando a alimentação, reprodução, o crescimento e sistema imune (MOHAMED et al., 2021; VAN DOAN et al., 2019). Já é comprovado que o aumento da salinidade provoca danos histopatológicos nas brânquias, fígado e tecidos renais, promove uma disbiose da microbiota intestinal, diminui o ganho de peso, aumenta atividades de enzimas antioxidantes e conteúdo de malondialdeído (MDA), indicando uma série de distúrbios fisiológicos da tilápia do Nilo (GAN et al., 2016; MOHAMED et al., 2021; ZHANG et al., 2016).

Para impulsionar ainda mais a piscicultura, é necessário aperfeiçoar as técnicas de produção no que se diz respeito às áreas de melhoramento genético, nutrição, manejo, sanidade e bem-estar animal, mediante a necessidade de se produzir mais em espaços cada vez menores com duração do ciclo de produção o mais reduzido possível (BRITO et al., 2019). Portanto, adequar a criação das espécies diferentes ambientes é de extrema importância para melhorar a produção e evitar problemas no desenvolvimento destes animais.

2.2 Fatores endócrinos reguladores de apetite

O controle da alimentação e consequentemente do metabolismo energético é fundamental para a sobrevivência de um organismo. Estes processos são responsáveis por manter a distribuição dos recursos energéticos para a manutenção básica do metabolismo, do sistema imunológico, crescimento somático, reprodução, estoques de energia e de outras atividades diárias como forrageamento (RØNNESTAD et al., 2017). A regulação da ingestão de alimentos pode ser afetada por fatores internos, como genética, fases de desenvolvimento ou conteúdo intestinal ou por fatores externos como condições ambientais, como temperatura e salinidade, predadores ou fotoperíodo (VOLKOFF; HOSKINS; TUZIAK, 2010). Essa regulação é realizada pelo sistema endócrino, responsável por secretar hormônios e regular a atividade das células por meio da transferência de informação entre os órgãos. Os mecanismos fisiológicos que controlam o apetite são conservados entre os vertebrados e muitos neuropeptídeos e hormônios envolvidos na regulação central do apetite em mamíferos também são observados em peixes (VOLKOFF, 2016). Entretanto podem ser encontradas divergências nos sistemas de controle do apetite em espécies de teleósteos devido à diversidade nos seus hábitos alimentares, e o mecanismo dessas adaptações permanecem inexplorados.

Os principais órgãos envolvidos na regulação do apetite são o cérebro e os tecidos gastrointestinais que produzirão fatores orexigênicos (estimulantes do apetite) e anorexigênicos (inibidores do apetite). Entre os principais hormônios e neuropeptídeos que apresentam envolvimento na regulação do apetite estão o neuropeptídeo Y (Npy), o transcrito relacionado ao peptídeo cocaína-anfetamina (Cart), a colecistoquinina (Cck) e o peptídeo YY (Pyy) (BERTUCCI et al., 2019; SOENGAS; CERDÁ-REVERTER; DELGADO, 2018; VOLKOFF et al., 2005).

O Npy é uma proteína de 36 kDa e pertence à família de peptídeos Npy. É secretado principalmente pelas células neurosecretores no hipotálamo e é abundantemente expresso no cérebro, hipófise, baço, trato gastrointestinal, rim, testículos e músculos lisos. Em teleósteos, o Npy demonstrou desempenhar um papel essencial na estimulação da alimentação (ASSAN et al., 2021). A Cart foi primeiramente isolada no cérebro de ratos como uma transcrição regulada pela administração aguda de cocaína ou anfetamina. Foi relatado que os precursores do *cart* são expressos abundantemente no cérebro, hipófise e em outros tecidos periféricos em peixes-dourados. A Cart exerce múltiplas funções fisiológicas em peixes, incluindo a inibição do apetite, regulação da resposta ao estresse e balanço energético (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; VOLKOFF, 2006).

O controle do apetite é um processo evolutivamente conservado resultante de uma interação entre sinais neuronais e periféricos que são integrados no hipotálamo e processados em uma ordem espacial e temporal específicas para regular a fome e saciedade. Os RNAs mensageiros (mRNAs) de vários sinais de apetite foram detectados no cérebro de diferentes peixes em áreas extra-hipotalâmicas análogas às caracterizadas em mamíferos, sugerindo uma relação funcional entre elas (WYNNE et al., 2005). É, entretanto, importante salientar que os genes do apetite (por exemplo, *npy* e *cart*) em mamíferos são modulados por muitos fatores e sua ampla distribuição cerebral pode refletir vários papéis fisiológicos e respostas às mudanças nas condições ambientais. A totalidade desses mecanismos ainda não é amplamente conhecida em peixes (RØNNESTAD et al., 2017).

O trato gastrointestinal (TGI) é o maior órgão endócrino dos vertebrados. Os hormônios e neuropeptídeos produzidos por ele agem em diferentes tecidos como o próprio TGI, glândulas exócrinas e o Sistema Nervoso Central (SNC). A maioria dos peptídeos produzidos no TGI são sensíveis ao conteúdo de nutrientes do intestino e

estão envolvidos na digestão, coordenando o controle do apetite com sinais de fome e saciedade (VOLKOFF, 2006).

A Cck é um peptídeo caracterizado por uma sequência de tetrapeptídeo C-terminal. A Cck é secretada pelo intestino e atua principalmente como um fator de saciedade de curto prazo, ao mesmo tempo que promove a digestão por meio de suas várias ações no sistema digestivo dos vertebrados. Todos os genes cck identificados em teleósteos são predominantemente expressos no TGI e no cérebro (VOLKOFF et al., 2005). O Pyy é um membro da família Npy e, semelhante ao Npy, desempenha um papel essencial na sinalização entre o sistema nervoso entérico e o SNC em peixes. Entretanto, enquanto o NPY é bem conhecido por ter uma função orexigênica forte no SNC, o PYY periférico inibe a ingestão de alimentos em mamíferos. Até o momento, os padrões de expressão deste gene são semelhantes entre as espécies de peixes estudadas, sendo predominantemente expressos no cérebro e no TGI (ASSAN et al., 2021; VOLKOFF et al., 2005).

2.3 Marcadores genéticos em peixes

A piscicultura é uma fonte essencial de alimento visto a importância da carne de peixe para alimentação humana. O processo de domesticação das espécies, quando os peixes selvagens são transferidos para o ambiente de cativeiro, provoca pressões seletivas que passam a ter influência sobre a frequência dos genes. Assim como em várias espécies de interesse econômico, este processo somado ao melhoramento genético de peixes tem obtido resultados positivos na produção de fenótipos mais produtivos (HILSDORF; ORFÃO, 2011).

Características fenotípicas, induzidas ou não pelo ambiente, são marcadores utilizados há muitos anos para distinguir populações ou até mesmo indivíduos, favorecendo assim o manejo de diferentes populações de peixes no meio ambiente. O uso de marcadores moleculares para avaliar a variabilidade genética dentro de populações e espécies inicia a partir da década de 1980 (HILSDORF, 2014). Avanços tecnológicos como o desenvolvimento de técnicas de amplificações específicas (PCR) e sequenciamento automático de DNA proporcionaram uma base para o estudo de diferentes tipos de marcadores baseados nas variabilidades encontradas no DNA e na expressão de RNA. Desde então, tecnologias genômicas como a PCR, qPCR, *microarrays* e abordagens de sequenciamento de DNA e RNA tem desempenhado um papel importante nessas pesquisas, contribuindo para

avanços no conhecimento sobre a fisiologia e biologia evolutiva dos organismos (ALVAREZ; SCHREY; RICHARDS, 2015; MACCONAILL, 2013).

A introdução dessas abordagens em pesquisas fisiológicas fornecem percepções importantes sobre a evolução dos fenótipos adaptativos em populações, além de uma compreensão de respostas fisiológicas a vários estressores ambientais (DAYAN; CRAWFORD; OLEKSIK, 2015; VELOTTA et al., 2017).

Com o sucesso na seleção assistida por marcadores em diversos organismos para características comercialmente importantes, os marcadores moleculares emergem como a ferramenta útil na pesquisa genética de peixes. Estudos anteriores demonstraram que alguns genes relacionados ao sistema imunológico respondem a mudanças de salinidade e podem desencadear vias de sinalização, confirmando os impactos das mudanças de salinidade ambiental na resposta imune adaptativa em células de guelras de enguias japonesas (*Anguilla japonica*) (GU et al., 2018). Pesquisadores também já identificaram e caracterizaram dois genes *kcnk3* (*kcnk3a* e *kcnk3b*) em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), por clonagem molecular e demonstraram seu potencial envolvimento na osmorregulação dessa espécie (WEN et al., 2020). Além disso já existem patentes de invenção referentes à utilização de marcadores para identificação de linhagens de peixes mais resistentes a ambientes salinos (EP2038421A2). A mudança no ambiente e no comportamento dos peixes pode induzir alterações na expressão de mRNAs ligados a possíveis adaptações. Uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos que regulam a alimentação e o crescimento da tilápia-do-Nilo em ambientes com maior salinidade pode promover um melhor manejo destes animais e conseqüentemente o aumento da qualidade de produção dos peixes cultivados.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A hipótese deste estudo é que a salinidade provoca modulações na expressão dos fatores endócrinos reguladores de apetite, provocando a diminuição do apetite e consequentemente diminuição do ganho de peso em *O. niloticus*.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar se a exposição a diferentes salinidades provoca modulação da expressão de genes relacionados a regulação de apetite e afeta as taxas de crescimento e fisiologia sistemática da tilápia.

3.3 Objetivos Específicos

- Expor tilápias-do-Nilo a diferentes salinidades (6 e 12 ppt);
- Clonar os genes do transcrito relacionado ao peptídeo cocaína-anfetamina (*cart*), a colecistoquinina (*cck*) e o peptídeo YY (*pyy*), expressos no trato gastrointestinal e cérebro de tilápias;
- Avaliar a expressão dos genes responsáveis pela regulação do apetite, bem como genes relacionados aos ajustes metabólicos e fisiológicos da tilápia-do-Nilo exposta a diferentes salinidades utilizando a técnica de qPCR.
- Avaliar parâmetros oxidativos nas células sanguíneas da tilápia-do-Nilo exposta a diferentes salinidades;
- Avaliar a performance de crescimento da tilápia-do-Nilo exposta a diferentes salinidades;

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito 1 – Exposure to salinity induces oxidative damage and changes in the expression of genes related to appetite regulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Manuscrito a ser submetido ao periódico General and Comparative Endocrinology (fator de impacto: 2.822 e qualis B1 na área de Biotecnologia)

Exposure to salinity induces oxidative damage and changes in the expression of genes related to appetite regulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Amanda Weege da Silveira Martins^a, collaborators To Be Defined, Vinicius Farias Campos^b

^aLaboratório de Genômica Estrutural, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

^bLaboratório de Genômica Estrutural, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Electronic address: campos.vinicius@ufpel.edu.br.

Highlights

- The fish were exposed to 6 and 12 ppt of salt for 21 days
- The salinity induced an increase in expression of genes *cart*, *pyy*, and *cck*
- Oxidative damage increased in the blood cells of fish
- The salinity promoted a decrease in weight gain and specific growth rate
- 12 ppt salinity caused decreased fish survival

Abstract

In fish, variations in several extrinsic factors, such as water salinity have been shown to induce changes in feeding rhythms and growth, but it is not known if appetite-related hormones mediate these changes on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), a species with high economic value. The aim of this study was identify marker genes of appetite regulation, as well as genes related to metabolic and physiological adjustments in tilapia exposed to different salinities. Moreover, the study aimed to sequence and characterize *cart*, *cck* and *pyy* genes and to quantify their expression in brain and intestine of the fish by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The animals were exposed to 6 and 12 parts per thousand (ppt) of salt for 21 days. Furthermore, lipid peroxidation, reactive oxygen species, DNA damage, and membrane fluidity in blood cells were quantified by flow cytometry. The results indicated an increase expression of genes *cart*, *pyy*, and *cck* and a decrease expression of *npv* in brain, and *cck* and *npv* in the intestine of fish treated with 12 ppt, which together with other adaptive responses may have caused the significant decrease in final body weight, specific growth, and weight gain observed. In addition, we showed the occurrence of oxidative damage in blood cell was caused by the tested salinity concentrations. These results provide important data on the physiology of the *O. niloticus* species when exposed to high salinities that have never been described before, and generated knowledge necessary for the development of biotechnologies that help to improve the production of economically important farmed fish.

Keywords: Nile tilapia; *cart*; *npv*; *cck*; gene expression; food intake

1. Introduction

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a fish species native to African freshwater lakes and rivers and is currently one of the most widely farmed freshwater fish around the world, mainly due to its favorable production characteristics and high economic value. Considering the scarcity of fresh water in many countries, studies are being carried out in order to develop the production of this species in brackish and seawater (EL-SAYED, 2006; MOHAMED et al., 2021).

Changes in environmental salt content modify the homeostasis and biological processes of an organism, and may even lead to death (RAHMAH et al., 2020). Depending on tilapia species, salinity exposure is known to affect growth performance (GAN et al., 2016; NINH et al., 2014), digestive capacity (TRAN-NGOC et al., 2017), blood parameters (VERDEGEM; HILBRANDS; BOON, 1997), reproductive capacity (CRUZ VIEIRA et al., 2019), histopathology and behaviour (HASSAN et al., 2013), antioxidant status (GAN et al., 2016), and metabolic rate (IWAMA; TAKEMURA; TAKANO, 1997).

The homeostatic regulation of food intake depends on a complex network involving signals that are integrated in the hypothalamus, which, in turn, responds with the release of neuropeptides that are able to modulate appetite (CONDE-SIEIRA et al., 2018; RØNNESTAD et al., 2017a). It is known that food intake in vertebrates is regulated by several factors, including a wide range of hormones that stimulate (orexigenic) or inhibit (anorexigenic) appetite that are produced by the brain and peripheral organs (GORISSEN; FLIK; HUISING, 2006; RØNNESTAD et al., 2017a). Among the main hormones involved in appetite regulation are neuropeptide Y (Npy), cocaine and amphetamine regulated transcription factor (Cart), cholecystokinin (Cck) and peptide YY (Pyy) produced in peripheral organs (mainly liver and intestine) and the brain (RØNNESTAD et al., 2017a).

Living in a marine or freshwater environment, with direct contact with water for gas exchange and secretion of metabolic waste, teleost fish face constant osmotic stress that requires physiological compensation (MOHAMED et al., 2021). Under stress conditions, the mechanisms that control food intake in fish are unregulated. Therefore understanding the factors underlying the responses to environmental stress observed among species is of great interest, having agricultural and productive implications for cultivated species. Currently, little is known about the influence of high salinities on genetic variations related to endocrine factors that regulate appetite in fish, more specifically in *O. niloticus*. Therefore, the aim of this study was to evaluate if exposure to different salinities causes modulation of the expression of genes related to appetite regulation and affects growth rates and systematic physiology of tilapia.

Materials and methods

2.1 Animals and conditions

The fish used in this study were obtained from the Laboratory of Pisciculture of the Barragem do Chasqueiro Fish Farming (Arroio Grande, Brazil-32°14'15 "S/53°05'13" W). The specimens, with initial mean weight and length of 200 ± 8.3 g and 18.5 ± 5.3 cm respectively, were fed twice a day with commercial feed (Supra, 38% crude protein) until satiety. The fish were kept in plastic tanks with a nominal capacity of 1000 L and a working volume of 650 L. The tanks used were opaque to reduce visual stress. Approximately 2/3 of the water in each tank was renewed once a week. The water parameters of acclimation period were as follows: the temperature of 24.0 ± 0.34 °C; dissolved oxygen level of 9.85 ± 0.1 mg L⁻¹; the salinity of 0 ± 0.21 ppt; pH of 7.04 ± 0.19 ; and ammonia level lower than 0.3 mg.L⁻¹.

2.2 Experimental design and sample collection

After an acclimation period of four weeks, the specimens were randomly categorized into three groups: two experimental groups exposed to different at the nominal concentrations of 6

and 12 parts per thousand (ppt) of salt and a control group with fresh water (0 ppt). The experimental salinity levels were obtained by adding 3 ppt gradually per day until 6 and 12 ppt were reached. The above-mentioned salinity levels were maintained throughout the experimental period by regular applications of salt followed by its measurement by a salinometer (Kasvi, BR) to ensure the required salinity level daily. The chosen concentrations are within the minimum mortality range according to El-Leithy, Ahmed AA et al (2019). The experimental groups were exposed for 21 days, and the exposition of all the groups was performed in plastic tanks in triplicate (totaling 9 tanks) with ten animals in each tank (totaling 90 animals) maintained under the same conditions. At the end of the experiment, all the animals were anesthetized by submersion into 50 mg.L⁻¹ benzocaine and euthanized by cranial spinal section. The brain and intestine of all the animals were collected and were used for sequencing, molecular characterization, and gene expression analysis of target genes. The tissues were preserved in liquid nitrogen until use for molecular biology processing and analyses. Blood samples were collected from the branchial branch artery using 26G heparinized syringe. For flow-cytometry analysis, 20uL of the sample was added to 1 mL of fetal bovine serum (FBS) and stored at 4 °C in the dark until use and the glucose measurement was performed with the Accu-Chek Active Kit (Roche, CH), using 5uL of the sample. The use of animals and all these handling practices were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas (process no 23110.014105/2020-56).

2.3 Performance

Fish were individually weighed at the beginning and end of the experimental period. The weight was used to calculate the following:

Survival (%) = (final number of fish - initial number of fish)/initial number of fish x 100

Weight gain (g) (AWG) = FW- IW

Specific growth rate (%/day) (SGR) = $100 (\ln FW - \ln IW) / \Delta t$

Where IW is the initial weight, FW is the final weight and Δt is the number of days between samplings.

2.4 RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from tissue samples was extracted using TRI Reagent (Sigma, USA), following the manufacturer's instructions with few modifications. RNA concentration and purity were measured by UV-light spectrophotometry using the NanoVue™ equipment (GE Healthcare Life Sciences, USA), and the samples were then standardized by concentration, and only the samples presenting high purity ($OD_{260/280} \geq 2.0$ nm) were used in the following procedures. RNA samples were treated with DNase using DNA-free™ Kit (Invitrogen™, USA) according to the manufacturer's recommendation. First-strand cDNA synthesis was performed with 2 µg of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. The cDNA samples were stored at -20°C until further use.

2.5 Target genes in appetite regulation and osmoregulation process

The target genes related to main hormones that play a critical role in appetite regulation were as follows: Neuropeptide Y; Peptide YY; Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript; Cholecystokinin. Genes related to osmotic stress were also analyzed: Sodium-Potassium ATPase and Co-transporter $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+} / 2\text{Cl}^{-}$. Their functions are listed in Table 1.

2.6 Sequencing and molecular characterization of target genes

The gene fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers designed by the PriFi online tool (<https://services.birc.au.dk/prifi/>) after the alignment of known sequences deposited for each gene in GenBank. The PCR parameters were as follows: an initial denaturation step for 1 min at 94°C , followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 55.2 to 65.5°C (depending on the primer sequence) for 30 s, and 72°C for 1 min, with a final

extension of 5 min at 72 °C. The fragments were sequenced using the Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer[®] automatic sequencer (Life Technologies, USA).

2.7 Sequence analysis

The partial sequences of *cart*, *cck*, and *pyy* genes identified in this study were deposited in GenBank. The translation of sequenced nucleotides to amino acid sequences as well as the identification of open-reading frame (ORF) were performed using the ExPASy bioinformatics resource portal (<https://www.expasy.org/>). The conserved domains and sites were mapped using the UniProt database (<https://www.uniprot.org/>).

2.8 Gene expression analysis

Gene expression was analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and the primers used in this study (Table 1) were designed using the Primer3 online tool (<https://primer3.ut.ee/http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) and the sequences of the identified fragments. The qPCR assay was performed using CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) and GoTaq[®] RT-qPCR Master Mix (Promega, USA). The amplification conditions were 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s, and 60 °C for 60 s, followed by the conditions needed to calculate the melting curve. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to normalize the fold change in gene expression using β -actin as a reference gene for normalization as described previously (YANG et al., 2013).

Table 1. Target genes in appetite regulation and osmoregulation process and primer sequences used in this study.

Gene symbol	Function	Primer sequence 5'→ 3'	Efficiency (%)	Objective	Reference
pyy	Anorexigenic factor	GGACAGTGCTGGTGGCCTTAGTG	-	Clonning	
		TCTCTGGTCTCTGTTGTTATCGCC			
		AACACTGGCTGATGCCTACC	100,6	qRT-PCR	
		TTCCATACCTCTGCCTGGTG			
cart	Anorexigenic factor	TGGTCTAYCTGTCCGTCTGTCTG	-	Clonning	

cck	Anorexigenic factor	TAGCAGCGCAGGAAGAAGG	98,6	qRT-PCR	
		TGCTGACATCACTCTGTCAAGG			
		AGCCAGCTCACTGGTTGTG			
		TCTCACTCTCACACACTCC	-	Clonning	
		AGGAGTACTCATACTCCTCTG			
		AGAAACTCCACGGCAAACAG	92,5	qRT-PCR	
ACTCATACTCCTCTGCACTGC					
npy	Orexigenic factor	ACAAGACAGAGGTATGGGAAGA	-	qRT-PCR	YAN, Peipei et al. (2017)
		GGCAGCATCACCACATTG			
nka	Transport of ions and absorption of water	GCTCCAGAGAGGATTTTGGAC	-	qRT-PCR	VELAN, Ariel et al. (2011)
		CTCCAAGACCTCCCAACTCA			
nkcc	Transport of ions and absorption of water	GAGGCAAGATCAACAGGATTG	-	qRT-PCR	VELAN, Ariel et al. (2011)
		AATGTCCGAAAAGTCTATCCTGAACT			
actb	Reference gene	TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG	-	qRT-PCR	YANG, Chang Geng et al. (2013)
		CTGTTGGCTTTGGGGTTCA			

2.9 Flow-cytometry analysis

Flow-cytometry analysis were performed using Attune[®] Acoustic Focusing Flow Cytometer (Applied Biosystems, USA) to evaluate the effect different salinities exposure on the systemic physiology of *O. niloticus* by analyzing erythrocytes. The blood cells were washed with 500 μ L of FBS. Erythrocytes were assayed for reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO), membrane fluidity, and DNA fragmentation index (DFI) using a flow cytometer equipped with violet laser (UV 405 nm-450/40, VL-1). Erythrocytes were stained with Hoechst 33342 (16.2 mM) (MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012). Cell debris was discarded by scatter plots of forward scatter $\times$ side scatter and negative fluorescence of Hoechst 33342. To read all parameters, the fluorophore-stained cells were added into calcium- and magnesium-free phosphate-buffered saline (80 g L⁻¹ of NaCl, 11.5 g L⁻¹ of KCl, 24 g L⁻¹ of Na₂HPO₄, 2 g L⁻¹ of KH₂PO₄ dissolved in deionized water). A total of 20,000 cells were measured during each analysis.

2.9.1 ROS evaluation

For the evaluation of ROS produced by the blood cells, 10 μL of previously collected and stored blood sample was added to 20 μL of saline solution containing 2 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate and 5 μM propidium iodide (PI) fluorescent probes (Sigma-Aldrich Co., USA). The samples were analyzed after incubation for 60 min at 22 $^{\circ}\text{C}$ in the dark. Only live cells (PI negative) were selected and measured for ROS production by the median intensity of the emitted green fluorescence.

2.9.2 LPO evaluation

The LPO was quantified using the final concentration of 1 μM of the lipid peroxidation sensor 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid (C11-BODIPY) in 100 μL of sample. It was incubated for 2 h at room temperature (20 $^{\circ}\text{C}$). The rate of lipoperoxidation was calculated by the median intensity of green fluorescence (peroxidized lipid)/median green fluorescence intensity + median red fluorescence (non-peroxidized lipid) $\times 100$.

2.9.3 Membrane fluidity evaluation

Erythrocyte membrane fluidity was analyzed by hydrophobic merocyanine 540 dye (M540) at final concentration of 2.7 μM (Sigma-Aldrich, USA) and YO-PRO, which fluoresces green, at final concentration of 0.1 μM (Invitrogen, USA). Only live cells (YO-PRO negative) were selected and classified into high fluidity cells (high M540 concentration) and low fluidity cells (low M540 concentration) (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

2.9.4 DNA damage evaluation

To evaluate DNA damage in erythrocytes, 10 μL of blood sample was added to 5 μL of 0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, and 0.001 M EDTA (pH 7.2) and to 10 μL of Triton 1X (Triton X-100, 1%, v/v) 30 s later. Then, 50 μL of acridine orange dye (2 mg. mL^{-1} , #A6014,

Sigma-Aldrich, USA) was added to the sample, followed by incubation from 30 s up to 2 min before each reading. The DNA of erythrocytes was classified as undamaged (green fluorescence emission) or damaged (orange/red fluorescence emission). The percentage of DNA fragmentation index (DFI) was obtained by the median of red fluorescence intensity/ (median of the red + green fluorescence intensities) $\times$ 100.

2.10 Statistical analysis

The evaluated parameters, which presented normal distribution and homogeneous variance with or without transformations, were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test with a significance level of 5%. The results from gene expression, ROS, LPO, membrane fluidity and, DFI were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Effects of 24 days of different salinity exposure on Nile tilapia growth performance

The final weight, weight gain, and specific growth rate was lower ($p < 0.05$) in the group exposed to 6 and 12 ppt compared to the control group as shown in Table 2. Furthermore, the blood glucose showed an increase ($p < 0.05$) in the fish exposed to 12 ppt compared to fish from the control and 6 ppt groups. The survival was significantly lower in the group exposed to 12 ppt compared to the other groups.

Table 2. Effects of salinity exposure on Nile tilapia growth performance

	Control	6 ppt	12 ppt
Final weight (g)	295,5 $\pm$ 11.42 ^a	240,8 $\pm$ 14.69 ^b	230.9 $\pm$ 13.56 ^b
Specific growth rate (%/day)	1.70 $\pm$ 0.38 ^a	0.01 $\pm$ 0.14 ^b	-0.16 $\pm$ 0.47 ^b

Weight gain (g)	72.56 ± 12.1 ^a	-5,84 ± 2.68 ^b	9 ± 8.021 ^b
Glucose	60.50 ± 9.13 ^a	62.17 ± 5.41 ^a	147.3 ± 15.87 ^b
Survival (%)	100	100	50

Data are expressed as means ± standard error of the mean. Specific growth rates (%/day), were calculated as $SGR = 100 (\ln FW - \ln IW)/\Delta t$, where IW is the initial weight, FW is the final weight and Δt is the number of days between samplings. The weight gain (in grams, g) was calculated as $WG = \text{final weight} - \text{initial weight}$; and survival (%) = $(\text{final number of fish} - \text{initial number of fish})/\text{initial number of fish} \times 100$. Different letters indicate significant differences between the experimental groups (one-way analysis of variance; $n = 12$; $p < 0.05$).

3.2. Sequencing and molecular characterization

The length of *cart*, *cck*, and *pyy* amplified fragments from *O. niloticus* was 306, 453, and 237 bp, respectively. They were sequenced and deposited under the GenBank accession numbers MW556307.1, MW556308.1, and MW556314.1 respectively.

The partial sequence of *cck* cDNA codes for 136 amino acids on ORF + 1. The fragment belongs to the gastrin/cholecystokinin family and has a signal peptide between amino acids 1 and 19 and has a gastrin domain between amino acids 4 and 136. The partial sequence of *cart* cDNA codes for 102 amino acids on ORF + 1. The fragment belongs to the *cart* family and has a signal peptide between amino acids 1 and 15. The partial sequence of *pyy* cDNA codes for 79 amino acids on ORF +. The fragment belongs to the NPY family and has a signal peptide between amino acids 1 and 18.

3.3. Gene expression Analysis

3.3.1. Brain

The mRNA expression of *cart* and *cck* in the brain of the fish exposed to 6 ppt and 12 ppt was higher ($p < 0.05$) than that in the fish from control group (Fig. 1A, D). The mRNA expression of *npv* in the brain of the fish exposed to 12 ppt was significantly lower than that in the fish

from the control group and those exposed to 6 ppt (Fig. 1B). Furthermore, the *pyy* mRNA expression in the brain of the fish exposed to 12 ppt showed an increase ($p < 0.05$) compared to that in the fish from the control and 6 ppt groups (Fig. 1C).

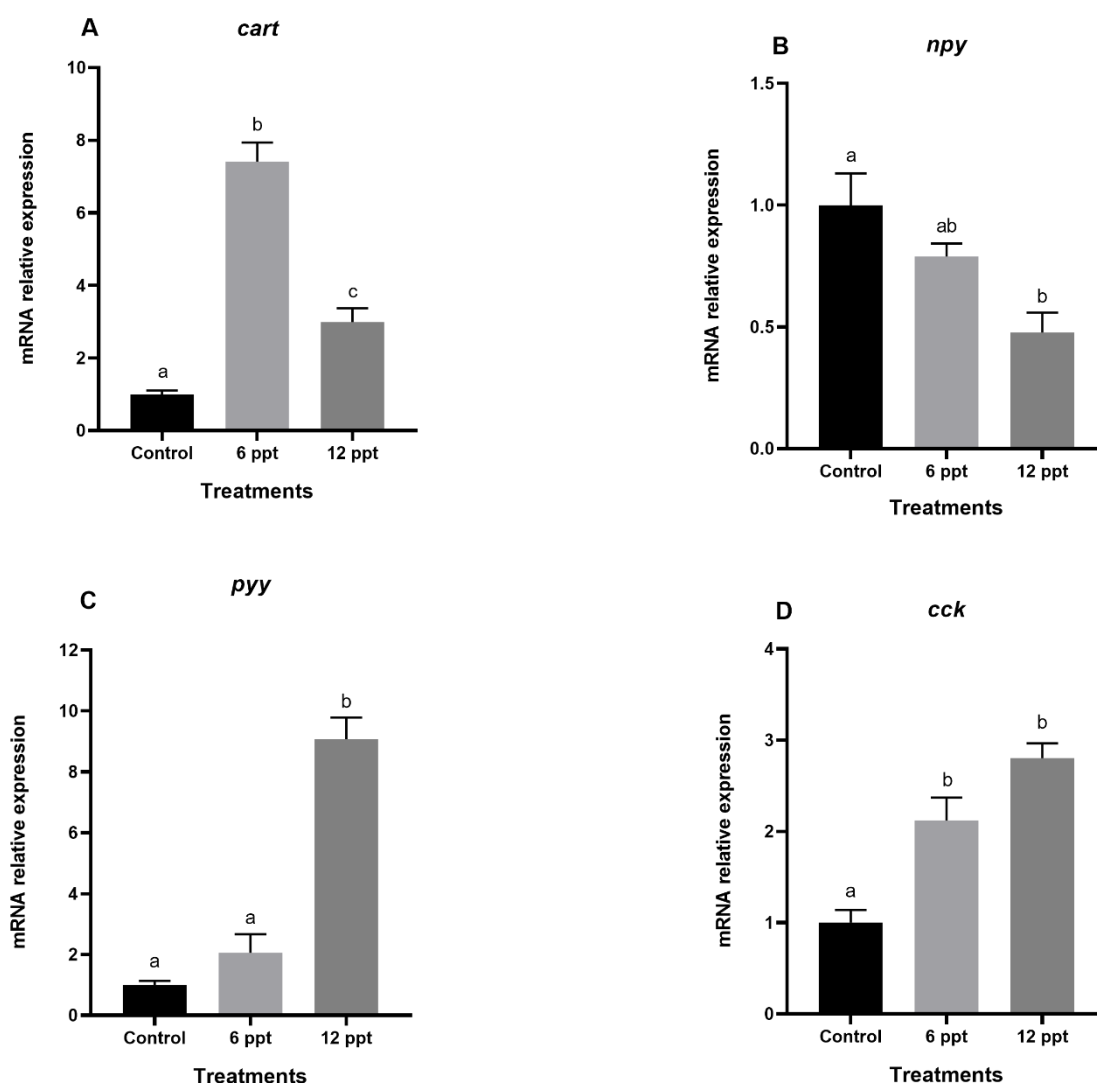


Fig. 1 - Gene expression in the brain of *Oreochromis niloticus* in the control group and those exposed to 6 and 12 parts per thousand (ppt) of salt for 21 days. The relative expression of *cart* (A), *npy* (B), *pyy* (C), and *cck* (D) mRNA was evaluated by quantitative polymerase chain reaction and normalized using the *actb* gene. The values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between the experimental groups (one-way analysis of variance; $n = 12$; $p < 0.05$)

3.2.2. Intestine

In the intestine, the mRNA expression of *cck* of the fish exposed to 6 ppt was higher ($p < 0.05$) than that in the fish from another group (Fig. 2A). The mRNA expression of *npy* in the intestine of the fish exposed to 12 ppt was significantly lower than that in the fish from the control group and those exposed to 6 ppt (Fig. 2B).

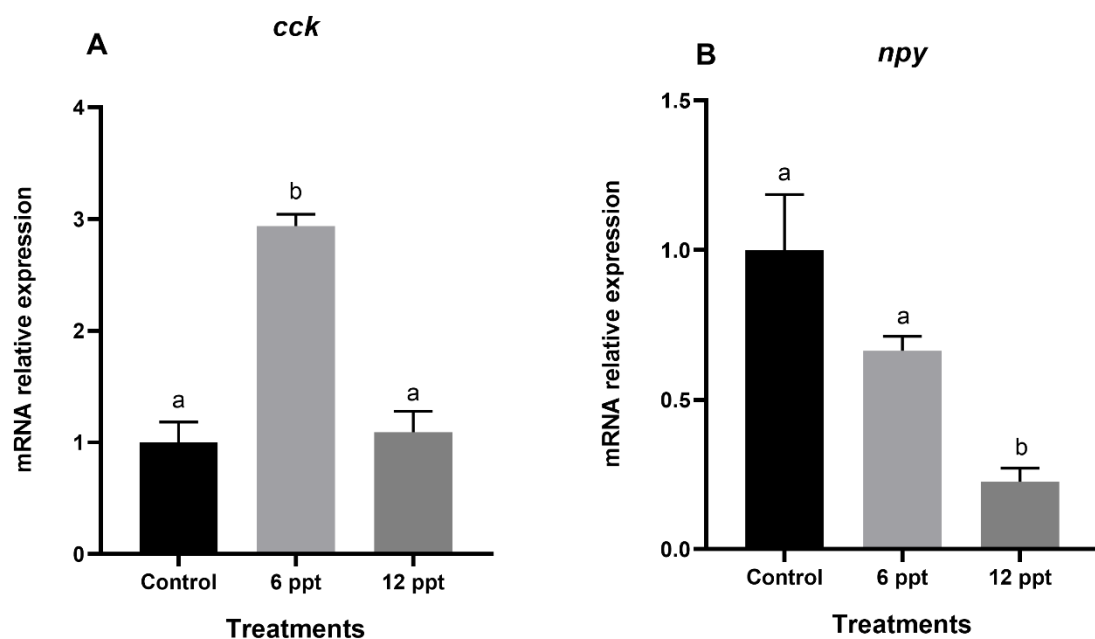


Fig. 2 - Gene expression in the intestine of *Oreochromis niloticus* in the control group and those exposed to 6 and 12 parts per thousand (ppt) of salt for 21 days. The relative expression of *cck* (A), and *npy* (B) mRNA was evaluated by quantitative polymerase chain reaction and normalized using the *actb* gene. The values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between the experimental groups (one-way analysis of variance; $n = 12$; $p < 0.05$)

The mRNA expression of *nka* and *nkcc* in the intestine of the fish exposed to 12 ppt was higher ($p < 0.05$) than that in the fish from another group (Fig. 3A, B).

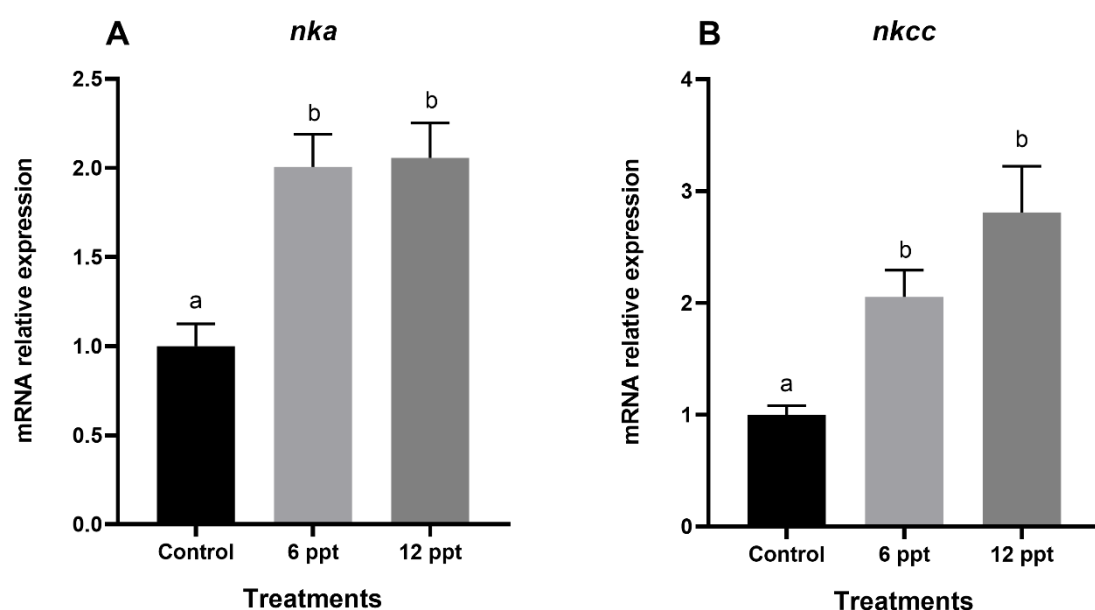


Fig. 3 - Gene expression in the intestine of *Oreochromis niloticus* in the control group and those exposed to 6 and 12 parts per thousand (ppt) of salt for 21 days. The relative expression of *nka* (A), and *nkcc* (B) mRNA was evaluated by quantitative polymerase chain reaction and normalized using the *actb* gene. The values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between the experimental groups (one-way analysis of variance; $n = 12$; $p < 0.05$).

3.4. Flow-cytometry analysis

The exposure of Nile tilapia for 21 days to 12 ppt increased ($p < 0.05$) the ROS levels (Fig. 4A) and LPO levels in erythrocytes (Fig. 4B). The membrane fluidity levels in the erythrocytes of fish exposed to 12 ppt showed a significant decrease (Fig. 4C). Further, both the concentrations of salinity induced a significant increase ($p < 0.05$) in the DFI of erythrocytes compared with the control group (Fig. 4D).

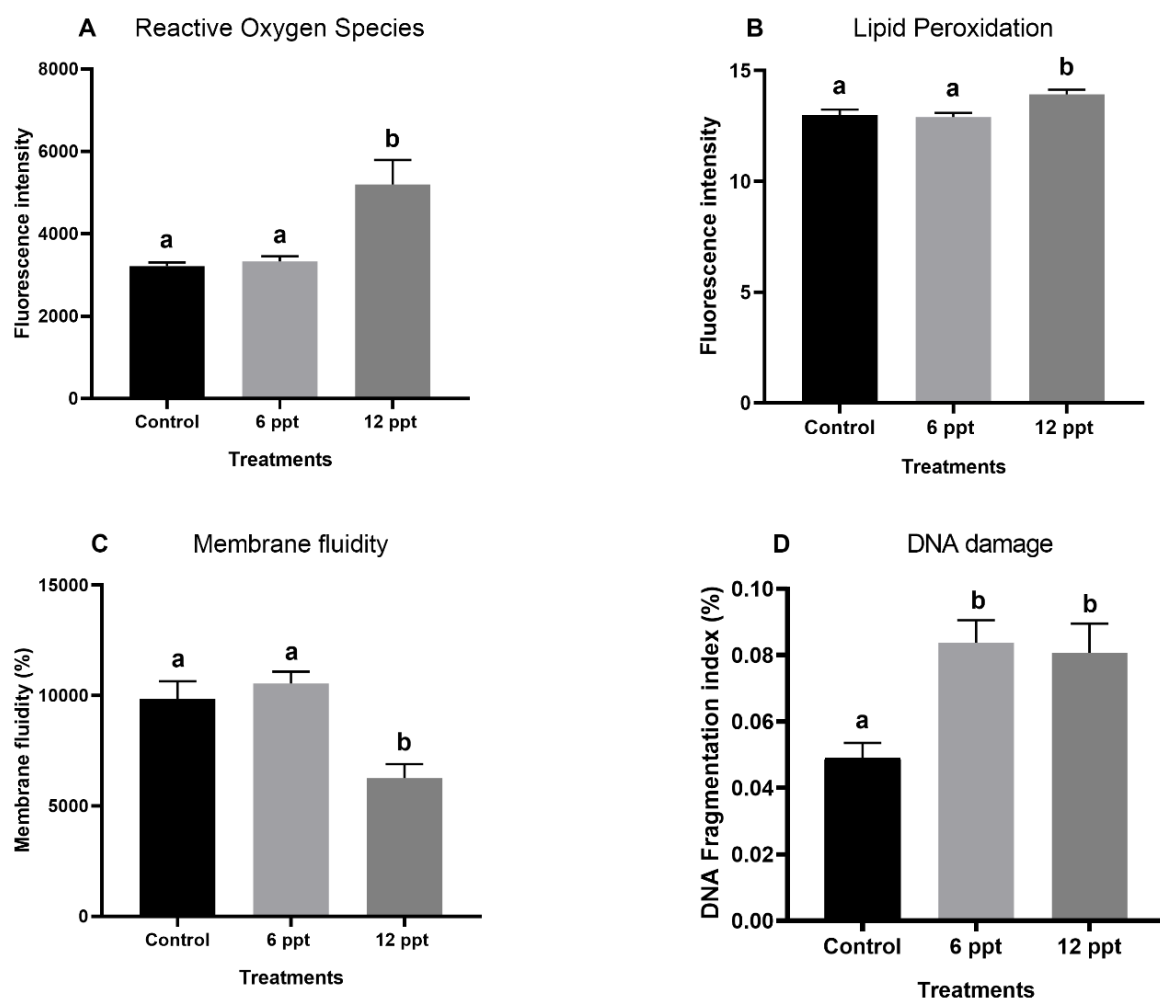


Fig. 4 The oxidative effects in terms of the production of reactive oxygen species (A), lipid peroxidation (B), membrane fluidity (C) and DNA fragmentation index (%) (C), apoptotic cells (%) (D) in the erythrocytes of *Oreochromis niloticus* in the control group and those exposed to 6 and 12 parts per thousand (ppt) of salt, as evaluated by flow cytometry. The values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Different letters indicate significant differences between the experimental groups (one-way analysis of variance; $n = 12$; $p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, the mRNA partial sequences of *cart*, *cck*, and *pyy* in *O. niloticus* were identified and characterized successfully. Furthermore, this was the first study to evaluate the effects of different salinities on the expression of genes related to appetite in Nile tilapia.

We believe that the decreased appetite in *O. niloticus* through increased expression of genes *cart*, *pyy*, and *cck* (anorexigenic) and decreased expression of *npv* (orexogenic) in the brain, and *cck* and *npv* the in intestine. Cart is a peptide found in the brain, intestine, and pancreas. This peptide has a wide number of physiological functions, including appetite inhibition, stress response regulation and energy balance (AHMADIAN-MOGHADAM; SADAT-SHIRAZI; ZARRINDAST, 2018; BERTUCCI et al., 2019). Central administration of Cart inhibits food intake in mice (KRISTENSEN et al., 1998), rats (STANLEY et al., 2001) and fish (VOLKOFF; PETER, 2000).

Both Npy and Pyy have been extensively studied in several species because of their roles in the mechanism of feeding behavior (one playing the role of a feed inducer, while the other is a feed inhibitor) (ASSAN et al., 2021). Npy is mainly secreted by neurosecretory cells in the hypothalamus and is abundantly expressed in the brain, pituitary, spleen, gastrointestinal tract. It plays a key role in regulating food intake and body weight. Npy injections increase feeding in goldfish (NARNAWARE; PETER, 2001) and zebrafish (YOKOBORI et al., 2012). Moreover, Npy treatments have also been shown to stimulate fish growth/growth hormone (GH) secretion both *in vitro* and *in vivo* (ASSAN et al., 2021). Pyy is known to be a brain-intestinal peptide, recent studies show its effect similar to that described in mammals. Moreover, is known to function as an anorexigenic indicator and has been recognized in several fish species including Atlantic salmon (*Salmo salar*) and goldfish (*Carassius auratus*) (GONZALEZ; UNNIAPPAN, 2010; MURASHITA et al., 2009). Cck plays an essential role in food regulation, influences digestion, and activates satiety signals. Oral Cck administration

inhibits feed intake in sea bass (RUBIO; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ; MADRID, 2008). The single *cck* gene has been cloned in several teleost species, including Atlantic herring (*Clupea harengus*) and pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (KAMISAKA et al., 2005; VOLKOFF, 2015). These results may explain the significant decrease in final body weight, specific growth, and weight gain observed after exposure to different salinities.

Also, an increase in blood glucose levels in groups exposed to 12 ppt group was observed in the present study. This result corroborates with Fiess et al. 2007, who evaluated the effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability in *Oreochromis mossambicus*. Overall, published data suggest that the fish neural system involved in controlling food intake also responds to stressful situations, increasing plasma glucose and cortisol levels (CONDE-SIEIRA et al., 2018). It is known that distinct regions of the brain integrate endocrine and metabolic information to elaborate a coordinated response using neural effector pathways that modulate food intake (MARTY; DALLAPORTA; THORENS, 2007). These areas contain specialized neurons that use glucose as a signaling molecule, therefore, glucose-stimulated (GE) neurons increase, while glucose-inhibited (GI) neurons decrease their firing rate as glucose levels increase (MARTY; DALLAPORTA; THORENS, 2007). It is already known that neurons in glucose detection areas produce peptides involved in the control of food intake in mammals. Thus, for example, the arcuate nucleus neurons in the hypothalamus that produce NPY appear to be GI, while the neurons that produce the CART appear to be GE, resulting in increased CART expression and decreased NPY expression when glucose levels increase (CONDE-SIEIRA et al., 2018; DUNN-MEYNELL et al., 2002; MOBBS et al., 2005).

Mohamad et al. 2021 observed that blood cortisol levels were increased in fish exposed to salinity while investigating the physiological effects of salt stress on Nile tilapia. In fish, one of the responses to stress caused by high salinities involves activation of the hypothalamic-

pituitary-interrenal (HPI) axis, which starts with the production of corticotropin releasing factor (CRF) and culminates in the production of cortisol. Previous studies suggest that this responsiveness to stressors is maintained under chronic stress (GORISSEN; FLIK, 2016), and that higher doses of cortisol profoundly inhibit the feeding behavior of goldfish (BERNIER; BEDARD; PETER, 2004), and sea bass (LEAL et al., 2011).

To prove the damage caused by high salinity in this study, some oxidative parameters of the blood were analyzed. This was the first study that evaluated ROS, lipid peroxidation, membrane fluidity, and DNA fragmentation in blood cells of *O. niloticus* exposed to different salinities using a flow cytometer.

Oxidative parameters in the blood are frequently used to assess fish health (BOJARSKI; WITESKA, 2020). It was possible to observe an increase in ROS levels in the higher salinity group. In normal physiological states, there is a balance between pro-oxidant production and antioxidant defenses. When an imbalance in favor of the production of pro-oxidants occurs, the antioxidant defenses can no longer neutralize the elevated levels of reactive oxygen species. Studies have already shown that salt stress induces the overproduction of ROS, which can disrupt metabolism and weaken the immune system, which can lead to fish death (LIU et al., 2007). The greater accumulation of ROS can cause an increase in lipid peroxidation, as it was possible to observe in the present study. Our result corroborates with other authors who reported the increase in membrane damage caused by salinity (GAN et al., 2016; MOHAMED et al., 2021; SINHA et al., 2014).

The change in membrane fluidity observed in the present study may have occurred because cell membranes are susceptible to disturbance from salinity changes. Sodium interacts with membrane lipid components and increases in the concentration of sodium ions near the membrane lipids can alter membrane geometry and modulate the interaction with other macromolecules nearby (EVANS; KÜLTZ, 2020). We also observed an increase in the

rate of genomic DNA damage, which could have been caused as a consequence of the increase in ROS in the blood or as a direct response to exposure to salinity. DNA is a cellular macromolecule whose structure and function can be affected by changes in intra and extracellular ion concentrations that accompany salt stress (FIOL; KÜLTZ, 2007). Due to its negative charge, this macromolecule becomes susceptible to interact with cations, such as sodium, which can increase or decrease in abundance after the change in salinity. However, deviation from the optimal concentration of intracellular cations can result in irregular interactions with nucleic acids and changes in DNA structure and function (VÁRNAI; ZAKRZEWSKA, 2004). Consistent with the destabilizing effect of sodium on nucleic acids, high levels of sodium cause DNA strand breaks a variety of organisms (EVANS; KÜLTZ, 2020). Previous studies demonstrated that fish positively regulate transcripts and proteins indicative of DNA damage as part of the hyperosmotic stress response, and the presence of widespread strand breaks in marine organisms is considered a consequence of living in high sodium environments. These DNA strand breaks persist until salinity is reduced, which emphasizes the negative effects of hyperosmotic stress (DMITRIEVA et al., 2006; WHITEHEAD et al., 2013).

The intestine display important functions for the absorption of nutrients and, as a barrier to the external environment, it has the additional function of maintaining the necessary absorption of the active fluid in seawater. Increased active fluid absorption in seawater is associated with increased Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) activity throughout the intestinal canal. The co-transporter $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ (NKCC) together with NKA, contributes to the transport of ions and absorption of water. Here, an increase in the expression of *nka* and *nkcc* genes was observed, showing that the fish were under osmotic stress. These results agree with Mohamed et al. (2021), who observed a significant increase in the gene expression of *nka* in *O. niloticus* in groups with salt stress after 10 days exposure. Similar results were also reported by

Gilmour et al. (2012) in rainbow trout (*O. mykiss*) and Yang et al. (2018) in *Schizothorax prenanti*, Kammerer et al. (2009) and Kammerer and Kültz (2009) in tilapia.

From the analysis performed, it was possible to observe an increase in glucose and a greater oxidative damage in the blood cells of *O. niloticus* exposed to 12 ppt. Furthermore, after 21 days, we observed a modulation in the expression of genes *cart*, *npv*, *pyy*, *cck*, *nka*, and *nkcc*. These adaptive responses to salinity may have resulted in decreased appetite in tilapia, since the genes of anorexigenic factors had their expression increased while orexigenic factors were down-regulated, promoting a decrease in weight gain, specific growth rate and final weight.

The mortality of 50% observed in the 12 ppt group may have been the result of all these salinity effects on Nile tilapia physiology, reinforcing the damage caused by salinity in this species. It also provides important data on the physiology of the *O. niloticus* species when exposed to salinities that have never been described before. Furthermore, the knowledge generated in this study can serve as a basis for the genetic improvement of Nile tilapia through genetic engineering. Thus, it is possible to try to revert the expression of these genes to normal levels, even in brackish water, thus ensuring that under these conditions the fish does not lose its appetite.

References

- AHMADIAN-MOGHADAM, H.; SADAT-SHIRAZI, M.-S.; ZARRINDAST, M.-R. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. **Peptides**, v. 110, p. 56–77, 1 dez. 2018.
- ALVAREZ, M.; SCHREY, A. W.; RICHARDS, C. L. Ten Years Of Transcriptomics In Wild Populations: What Have We Learned About Their Ecology And Evolution? **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 710–725, 2015.
- ASSAN, D. et al. The Roles of Neuropeptide Y (Npy) and Peptide YY (Pyy) in Teleost Food Intake: A Mini Review. **Life**, v. 11, n. 6, p. 547, 10 jun. 2021.
- BERNIER, N. J.; BEDARD, N.; PETER, R. E. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 230–240, 15 jan. 2004.
- BERTUCCI, J. I. et al. Nutrient Regulation of Endocrine Factors Influencing Feeding and Growth in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 83, 2019.
- BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. **Tilapias: Biology and Exploitation**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.
- BOJARSKI, B.; WITESKA, M. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19236–19250, 1 jun. 2020.
- BRABO, M. F. et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50–58, 2016.
- CONDE-SIEIRA, M. et al. Stress Effects on the Mechanisms Regulating Appetite in Teleost Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 631, 2018.
- CRIVELENTI, L. Z. et al. Desempenho Econômico da Criação de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em Sistema de Produção Intensiva. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, 2006.
- CRUZ VIEIRA, A. B. et al. Influence of salinity on spermatogenesis in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis. **Theriogenology**, v. 131, p. 1–8, 1 jun. 2019.
- DAYAN, D. I.; CRAWFORD, D. L.; OLEKSIK, M. F. Phenotypic Plasticity in Gene Expression Contributes to Divergence of Locally Adapted Populations of *Fundulus heteroclitus*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 13, p. 3345–3359, 2015.
- DE SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: A Nova Fronteira para Produção de Alimentos de Forma Sustentável. **R. BNDES**, v. 25, n. 49, p. 52, jun. 2018.
- DMITRIEVA, N. I. et al. The saltiness of the sea breaks DNA in marine invertebrates: possible implications for animal evolution. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 5, n. 12, p. 1320–1323, jun. 2006.
- DUNN-MEYNELL, A. A. et al. Glucokinase Is the Likely Mediator of Glucosensing in Both Glucose-Excited and Glucose-Inhibited Central Neurons. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2056–2065, 1 jul. 2002.
- EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia Culture**. [s.l.] CABI, 2006.

EL-SAYED, A.-F. M.; MANSOUR, C. R.; EZZAT, A. A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v. 248, n. 1–4, p. 187–196, jul. 2005.

EVANS, T. G.; KÜLTZ, D. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 333, n. 6, p. 421–435, jul. 2020.

FAO. [s.l.] FAO, 2020.

FIOL, D. F.; KÜLTZ, D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 22, p. 5790–5798, 2007.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. et al. Efeito Da Suplementação Da Dieta Com Nacl No Crescimento De Tilápia *Oreochromis Niloticus* Cultivada Em Diferentes Salinidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 204–211, abr. 2002.

GAN, L. et al. Effects of salinity on growth, body composition, muscle fatty acid composition, and antioxidant status of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 32, n. 2, p. 372–374, abr. 2016.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–457, jan. 2005.

GONZALEZ, R.; UNNIAPPAN, S. Molecular characterization, appetite regulatory effects and feeding related changes of peptide YY in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 273–279, abr. 2010.

GORISSEN, M.; FLIK, G. The Endocrinology of the Stress Response in Fish. In: **Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 35p. 75–111.

GORISSEN, M.; FLIK, G.; HUISING, M. Peptides and proteins regulating food intake: A comparative view. **Animal Biology - ANIM BIOL**, v. 56, 1 nov. 2006.

GU, J. et al. Identification of immune-related genes in gill cells of Japanese eels (*Anguilla japonica*) in adaptation to water salinity changes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 288–296, 1 fev. 2018.

HASSAN, M. et al. Histopathological and Behavioral Changes in *Oreochromis* sp. after Exposure to Different Salinities. **Journal of Fisheries & Livestock Production**, v. 1, 25 mar. 2013.

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. null em Conservação de Recursos Genéticos Animais—Pirassununga: Universidade de São Paulo, 30 set. 2014.

HILSDORF, A. W. S.; ORFÃO, L. H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. p. 8, 2011.

IGARASHI, M. A. ASPECTOS DO POTENCIAL ECONÔMICO DA PISCICULTURA, CONTRIBUIÇÃO E PERSPECTIVAS DA ATIVIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL NO BRASIL. **Revista Unimar Ciências**, v. 28, n. 1–2, 13 abr. 2021.

- IWAMA, G. K.; TAKEMURA, A.; TAKANO, K. Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water, sea water, and hypersaline sea water. **Journal of Fish Biology**, v. 51, n. 5, p. 886–894, nov. 1997.
- KAMISAKA, Y. et al. Cholecystokinin mRNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*—molecular cloning, characterization, and distribution in the digestive tract during the early life stages. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 385–393, 1 mar. 2005.
- KRISTENSEN, P. et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 72–76, maio 1998.
- LEAL, E. et al. Stress-induced effects on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 8, p. 1035–1044, dez. 2011.
- LIU, Y. et al. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. **Aquaculture**, v. 265, n. 1, p. 351–358, 1 maio 2007.
- LOPES, A. L. et al. Associação Brasileira da Piscicultura. p. 71, 2021.
- LUZ, R. K. et al. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. **Aquaculture**, v. 276, n. 1, p. 171–178, 30 abr. 2008.
- MACCONAILL, L. E. Existing and Emerging Technologies for Tumor Genomic Profiling. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 15, p. 1815–1824, 20 maio 2013.
- MARTINEZ-ALBORCIA, M. J. et al. Detrimental Effects of Non-Functional Spermatozoa on the Freezability of Functional Spermatozoa from Boar Ejaculate. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36550, 2 maio 2012.
- MARTY, N.; DALLAPORTA, M.; THORENS, B. Brain Glucose Sensing, Counterregulation, and Energy Homeostasis. **Physiology**, v. 22, n. 4, p. 241–251, 1 ago. 2007.
- MOBBS, C. V. et al. Impaired glucose signaling as a cause of obesity and the metabolic syndrome: The glucoadipostatic hypothesis. **Physiology & Behavior**, Proceedings from the 2004 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior. v. 85, n. 1, p. 3–23, 19 maio 2005.
- MOHAMED, N. A. et al. Physiological and ion changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under the effect of salinity stress. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100567, 1 mar. 2021.
- MURASHITA, K. et al. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Molecular cloning and tissue expression. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, n. 3, p. 223–235, 1 fev. 2009.
- NARNAWARE, Y. K.; PETER, R. E. Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 1–2, p. 185–190, set. 2001.
- NINH, N. H. et al. Selection for enhanced growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water (15–20 ppt) in Vietnam. **Aquaculture**, v. 428–429, p. 1–6, maio 2014.
- QIN, H. et al. Exploring candidate genes in a major QTL region associated with salinity tolerance in the skin of Nile tilapia based on transcriptomic analysis. **Aquaculture**, v. 526, p. 735380, set. 2020.

- RAHMAH, S. et al. Metabolic cost of acute and chronic salinity response of hybrid red tilapia *Oreochromis* sp. larvae. **Aquaculture Reports**, v. 16, p. 100233, 1 mar. 2020.
- ROCHA, C. M. C. DA et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. iv–vi, ago. 2013.
- RONKIN, D. et al. Intestinal transcriptome analysis revealed differential salinity adaptation between two tilapiine species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 13, p. 35–43, mar. 2015.
- RØNNESTAD, I. et al. Appetite-Controlling Endocrine Systems in Teleosts. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 73, 2017a.
- RØNNESTAD, I. et al. Appetite-Controlling Endocrine Systems in Teleosts. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017b.
- RORIZ, G. D. et al. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 43–48, 1 maio 2017.
- RUBIO, V. C.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; MADRID, J. A. Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 4–5, p. 862–869, mar. 2008.
- SANTOS, E. S. D. et al. Avaliação técnica econômica de tilápias cultivadas com diferentes taxas de alimentação em esgoto doméstico tratado. **Conex. Ci. e Tecnol. Fortaleza/CE**, v. 9, n. 3, p. 7, 2015.
- SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. R. V. Evolução Da Piscicultura No Brasil: Diagnóstico E Desenvolvimento Da Cadeia Produtiva De Tilápia. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, p. 42, 2017.
- SINHA, A. K. et al. Anti-Oxidative Defences Are Modulated Differentially in Three Freshwater Teleosts in Response to Ammonia-Induced Oxidative Stress. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95319, 16 abr. 2014.
- SOENGAS, J. L.; CERDÁ-REVERTER, J. M.; DELGADO, M. J. Central regulation of food intake in fish: an evolutionary perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 60, n. 4, p. R171–R199, maio 2018.
- STANLEY, S. A. et al. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo–pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. **Brain Research**, v. 893, n. 1, p. 186–194, 2 mar. 2001.
- TRAN-NGOC, K. T. et al. Salinity and diet composition affect digestibility and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 469, p. 36–43, 20 fev. 2017.
- VAN DOAN, H. et al. The effects of Thai ginseng, *Boesenbergia rotunda* powder on mucosal and serum immunity, disease resistance, and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 513, p. 734388, 15 nov. 2019.
- VÁRNAI, P.; ZAKRZEWSKA, K. DNA and its counterions: a molecular dynamics study. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 14, p. 4269–4280, 15 jul. 2004.
- VELOTTA, J. P. et al. Transcriptomic imprints of adaptation to fresh water: parallel evolution of osmoregulatory gene expression in the Alewife. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 3, p. 831–848, 2017.

VERDEGEM, M. C. J.; HILBRANDS, A. D.; BOON, J. H. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) x *O. mossambicus* (Peters). **Aquaculture Research**, v. 28, n. 6, p. 453–459, jun. 1997.

VOLKOFF, H. et al. Neuropeptides and the control of food intake in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 5th International Symposium on Fish Endocrinology. v. 142, n. 1, p. 3–19, 15 maio 2005.

VOLKOFF, H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Comparative neuroendocrinology: Integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates. v. 144, n. 3, p. 325–331, 1 jul. 2006.

VOLKOFF, H. Cloning and tissue distribution of appetite-regulating peptides in pirapitinga (*Piaractus brachipomus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 987–1001, out. 2015.

VOLKOFF, H. The Neuroendocrine Regulation of Food Intake in Fish: A Review of Current Knowledge. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 540, 2016.

VOLKOFF, H.; HOSKINS, L. J.; TUZIAK, S. M. Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: Potential application in aquaculture. **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 352–359, jul. 2010.

VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. **Brain Research**, v. 887, n. 1, p. 125–133, 22 dez. 2000.

WEN, Z.-Y. et al. Characterization of two *kcnk3* genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional changes in various salinity of seawater. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2213–2222, 1 maio 2020.

WHITEHEAD, A. et al. Common functional targets of adaptive micro- and macro-evolutionary divergence in killifish. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 14, p. 3780–3796, 2013.

WYNNE, K. et al. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 291–318, 1 fev. 2005.

YAN, M. et al. Effects of salinity on food intake, growth, and survival of pufferfish (*Fugu obscurus*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, n. 2, p. 146–149, 2004.

YANG, C. G. et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**, v. 527, n. 1, p. 183–192, 15 set. 2013.

YOKOBORI, E. et al. Neuropeptide Y Stimulates Food Intake in the Zebrafish, *Danio rerio*: NPY stimulates food intake in zebrafish. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 766–773, maio 2012.

ZHANG, M. et al. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. **Aquaculture**, v. 454, p. 72–80, mar. 2016.

6 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que águas com salinidade de até 12 ppt podem ser consideradas prejudiciais para a criação de *O. niloticus*.

O aumento da expressão dos genes *cart*, *pyy* e *cck* (anorexigênicos) e diminuição da expressão de *npv* (orexogênica) no cérebro, e *cck* e *npv* no intestino, junto do aumento dos níveis de glicose plasmática acarretaram na diminuição ganho de peso e taxa de crescimento de *O. niloticus*. Além disso, foi possível observar que o aumento da salinidade provocou um maior dano oxidativo nas células sanguíneas, onde observamos altos níveis de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e fragmentação no DNA. Estas respostas adaptativas à salinidade junto do dano oxidativo pode ter levado a diminuição da sobrevivência das tilápias do grupo de 12 ppt.

Estes resultados fornecem dados importantes sobre a fisiologia da espécie *O. niloticus* quando exposta à altas salinidades que nunca foram descritas anteriormente. Além disso, o conhecimento gerado neste estudo pode servir de base para o melhoramento genético da tilápia-do-Nilo por meio da engenharia genética. Assim, é possível tentar reverter a expressão desses genes a níveis normais, mesmo em água salobra, garantindo assim que nessas condições o peixe não perca o apetite e mantenha o padrão de crescimento normal.

7 REFERÊNCIAS

- AHMADIAN-MOGHADAM, H.; SADAT-SHIRAZI, M.-S.; ZARRINDAST, M.-R. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. **Peptides**, v. 110, p. 56–77, 1 dez. 2018.
- ALVAREZ, M.; SCHREY, A. W.; RICHARDS, C. L. Ten Years Of Transcriptomics In Wild Populations: What Have We Learned About Their Ecology And Evolution? **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 710–725, 2015.
- ASSAN, D. et al. The Roles of Neuropeptide Y (Npy) and Peptide YY (Pyy) in Teleost Food Intake: A Mini Review. **Life**, v. 11, n. 6, p. 547, 10 jun. 2021.
- BERNIER, N. J.; BEDARD, N.; PETER, R. E. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 230–240, 15 jan. 2004.
- BERTUCCI, J. I. et al. Nutrient Regulation of Endocrine Factors Influencing Feeding and Growth in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 83, 2019.
- BEVERIDGE, M. C. M.; MCANDREW, B. **Tilapias: Biology and Exploitation**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.
- BOJARSKI, B.; WITESKA, M. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19236–19250, 1 jun. 2020.
- BRABO, M. F. et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50–58, 2016.
- CONDE-SIEIRA, M. et al. Stress Effects on the Mechanisms Regulating Appetite in Teleost Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 631, 2018.
- CRIVELENTI, L. Z. et al. Desempenho Econômico da Criação de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em Sistema de Produção Intensiva. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, 2006.
- CRUZ VIEIRA, A. B. et al. Influence of salinity on spermatogenesis in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis. **Theriogenology**, v. 131, p. 1–8, 1 jun. 2019.
- DAYAN, D. I.; CRAWFORD, D. L.; OLEKSIK, M. F. Phenotypic Plasticity in Gene Expression Contributes to Divergence of Locally Adapted Populations of *Fundulus heteroclitus*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 13, p. 3345–3359, 2015.
- DE SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: A Nova Fronteira para Produção de Alimentos de Forma Sustentável. **R. BNDES**, v. 25, n. 49, p. 52, jun. 2018.

DMITRIEVA, N. I. et al. The saltiness of the sea breaks DNA in marine invertebrates: possible implications for animal evolution. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 5, n. 12, p. 1320–1323, jun. 2006.

DUNN-MEYNELL, A. A. et al. Glucokinase Is the Likely Mediator of Glucosensing in Both Glucose-Excited and Glucose-Inhibited Central Neurons. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2056–2065, 1 jul. 2002.

EL-SAYED, A.-F. M. **Tilapia Culture**. [s.l.] CABI, 2006.

EL-SAYED, A.-F. M.; MANSOUR, C. R.; EZZAT, A. A. Effects of dietary lipid source on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v. 248, n. 1–4, p. 187–196, jul. 2005.

EVANS, T. G.; KÜLTZ, D. The cellular stress response in fish exposed to salinity fluctuations. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 333, n. 6, p. 421–435, jul. 2020.

FAO. [s.l.] FAO, 2020.

FIOL, D. F.; KÜLTZ, D. Osmotic stress sensing and signaling in fishes. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 22, p. 5790–5798, 2007.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. et al. Efeito Da Suplementação Da Dieta Com NaCl No Crescimento De Tilápia *Oreochromis Niloticus* Cultivada Em Diferentes Salinidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 204–211, abr. 2002.

GAN, L. et al. Effects of salinity on growth, body composition, muscle fatty acid composition, and antioxidant status of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 32, n. 2, p. 372–374, abr. 2016.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–457, jan. 2005.

GONZALEZ, R.; UNNIAPPAN, S. Molecular characterization, appetite regulatory effects and feeding related changes of peptide YY in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 273–279, abr. 2010.

GORISSEN, M.; FLIK, G. The Endocrinology of the Stress Response in Fish. In: **Fish Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 35p. 75–111.

GORISSEN, M.; FLIK, G.; HUISING, M. Peptides and proteins regulating food intake: A comparative view. **Animal Biology - ANIM BIOL**, v. 56, 1 nov. 2006.

GU, J. et al. Identification of immune-related genes in gill cells of Japanese eels (*Anguilla japonica*) in adaptation to water salinity changes. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 288–296, 1 fev. 2018.

HASSAN, M. et al. Histopathological and Behavioral Changes in *Oreochromis* sp. after Exposure to Different Salinities. **Journal of Fisheries & Livestock Production**, v. 1, 25 mar. 2013.

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. null em Conservação de Recursos Genéticos Animais—Pirassununga: Universidade de São Paulo, 30 set. 2014.

HILSDORF, A. W. S.; ORFÃO, L. H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. p. 8, 2011.

IGARASHI, M. A. ASPECTOS DO POTENCIAL ECONÔMICO DA PISCICULTURA, CONTRIBUIÇÃO E PERSPECTIVAS DA ATIVIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL NO BRASIL. **Revista Unimar Ciências**, v. 28, n. 1–2, 13 abr. 2021.

IWAMA, G. K.; TAKEMURA, A.; TAKANO, K. Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water, sea water, and hypersaline sea water. **Journal of Fish Biology**, v. 51, n. 5, p. 886–894, nov. 1997.

KAMISAKA, Y. et al. Cholecystokinin mRNA in Atlantic herring, *Clupea harengus*—molecular cloning, characterization, and distribution in the digestive tract during the early life stages. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 385–393, 1 mar. 2005.

KRISTENSEN, P. et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 72–76, maio 1998.

LEAL, E. et al. Stress-induced effects on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 8, p. 1035–1044, dez. 2011.

LIU, Y. et al. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. **Aquaculture**, v. 265, n. 1, p. 351–358, 1 maio 2007.

LOPES, A. L. et al. Associação Brasileira da Piscicultura. p. 71, 2021.

LUZ, R. K. et al. Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. **Aquaculture**, v. 276, n. 1, p. 171–178, 30 abr. 2008.

MACCONAILL, L. E. Existing and Emerging Technologies for Tumor Genomic Profiling. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 15, p. 1815–1824, 20 maio 2013.

MARTINEZ-ALBORCIA, M. J. et al. Detrimental Effects of Non-Functional Spermatozoa on the Freezability of Functional Spermatozoa from Boar Ejaculate. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36550, 2 maio 2012.

MARTY, N.; DALLAPORTA, M.; THORENS, B. Brain Glucose Sensing, Counterregulation, and Energy Homeostasis. **Physiology**, v. 22, n. 4, p. 241–251, 1 ago. 2007.

MOBBS, C. V. et al. Impaired glucose signaling as a cause of obesity and the metabolic syndrome: The glucostatic hypothesis. **Physiology & Behavior**, Proceedings from the 2004 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior. v. 85, n. 1, p. 3–23, 19 maio 2005.

MOHAMED, N. A. et al. Physiological and ion changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under the effect of salinity stress. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100567, 1 mar. 2021.

MURASHITA, K. et al. Ghrelin, cholecystokinin, and peptide YY in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Molecular cloning and tissue expression. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, n. 3, p. 223–235, 1 fev. 2009.

NARNAWARE, Y. K.; PETER, R. E. Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 1–2, p. 185–190, set. 2001.

NINH, N. H. et al. Selection for enhanced growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water (15–20 ppt) in Vietnam. **Aquaculture**, v. 428–429, p. 1–6, maio 2014.

QIN, H. et al. Exploring candidate genes in a major QTL region associated with salinity tolerance in the skin of Nile tilapia based on transcriptomic analysis. **Aquaculture**, v. 526, p. 735380, set. 2020.

RAHMAH, S. et al. Metabolic cost of acute and chronic salinity response of hybrid red tilapia *Oreochromis* sp. larvae. **Aquaculture Reports**, v. 16, p. 100233, 1 mar. 2020.

ROCHA, C. M. C. DA et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. iv–vi, ago. 2013.

RONKIN, D. et al. Intestinal transcriptome analysis revealed differential salinity adaptation between two tilapiine species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 13, p. 35–43, mar. 2015.

RØNNESTAD, I. et al. Appetite-Controlling Endocrine Systems in Teleosts. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 73, 2017a.

RØNNESTAD, I. et al. Appetite-Controlling Endocrine Systems in Teleosts. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017b.

RORIZ, G. D. et al. Characterization of tilapia farming in net cages at a tropical reservoir in Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 43–48, 1 maio 2017.

RUBIO, V. C.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; MADRID, J. A. Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 4–5, p. 862–869, mar. 2008.

- SANTOS, E. S. D. et al. Avaliação técnica econômica de tilápias cultivadas com diferentes taxas de alimentação em esgoto doméstico tratado. **Conex. Ci. e Tecnol. Fortaleza/CE**, v. 9, n. 3, p. 7, 2015.
- SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. R. V. Evolução Da Piscicultura No Brasil: Diagnóstico E Desenvolvimento Da Cadeia Produtiva De Tilápia. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**, p. 42, 2017.
- SINHA, A. K. et al. Anti-Oxidative Defences Are Modulated Differentially in Three Freshwater Teleosts in Response to Ammonia-Induced Oxidative Stress. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95319, 16 abr. 2014.
- SOENGAS, J. L.; CERDÁ-REVERTER, J. M.; DELGADO, M. J. Central regulation of food intake in fish: an evolutionary perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 60, n. 4, p. R171–R199, maio 2018.
- STANLEY, S. A. et al. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo–pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. **Brain Research**, v. 893, n. 1, p. 186–194, 2 mar. 2001.
- TRAN-NGOC, K. T. et al. Salinity and diet composition affect digestibility and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 469, p. 36–43, 20 fev. 2017.
- VAN DOAN, H. et al. The effects of Thai ginseng, *Boesenbergia rotunda* powder on mucosal and serum immunity, disease resistance, and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 513, p. 734388, 15 nov. 2019.
- VÁRNAI, P.; ZAKRZEWSKA, K. DNA and its counterions: a molecular dynamics study. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 14, p. 4269–4280, 15 jul. 2004.
- VELOTTA, J. P. et al. Transcriptomic imprints of adaptation to fresh water: parallel evolution of osmoregulatory gene expression in the Alewife. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 3, p. 831–848, 2017.
- VERDEGEM, M. C. J.; HILBRANDS, A. D.; BOON, J. H. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) x *O. mossambicus* (Peters). **Aquaculture Research**, v. 28, n. 6, p. 453–459, jun. 1997.
- VOLKOFF, H. et al. Neuropeptides and the control of food intake in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 5th International Symposium on Fish Endocrinology. v. 142, n. 1, p. 3–19, 15 maio 2005.
- VOLKOFF, H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Comparative neuroendocrinology: Integration of hormonal and environmental signals in vertebrates and invertebrates. v. 144, n. 3, p. 325–331, 1 jul. 2006.

VOLKOFF, H. Cloning and tissue distribution of appetite-regulating peptides in pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 987–1001, out. 2015.

VOLKOFF, H. The Neuroendocrine Regulation of Food Intake in Fish: A Review of Current Knowledge. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 540, 2016.

VOLKOFF, H.; HOSKINS, L. J.; TUZIAK, S. M. Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: Potential application in aquaculture. **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 352–359, jul. 2010.

VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. **Brain Research**, v. 887, n. 1, p. 125–133, 22 dez. 2000.

WEN, Z.-Y. et al. Characterization of two *kcnk3* genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional changes in various salinity of seawater. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2213–2222, 1 maio 2020.

WHITEHEAD, A. et al. Common functional targets of adaptive micro- and macro-evolutionary divergence in killifish. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 14, p. 3780–3796, 2013.

WYNNE, K. et al. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 291–318, 1 fev. 2005.

YAN, M. et al. Effects of salinity on food intake, growth, and survival of pufferfish (*Fugu obscurus*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, n. 2, p. 146–149, 2004.

YANG, C. G. et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**, v. 527, n. 1, p. 183–192, 15 set. 2013.

YOKOBORI, E. et al. Neuropeptide Y Stimulates Food Intake in the Zebrafish, *Danio rerio*: NPY stimulates food intake in zebrafish. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 766–773, maio 2012.

ZHANG, M. et al. Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference. **Aquaculture**, v. 454, p. 72–80, mar. 2016.

8 ANEXOS

Anexo A – Comissão de Ética em Experimentação Animal