BRUNO CAVALHEIRO ARAÚJO

**Efeitos da suplementação da dieta com diferentes fontes de
ácidos graxos no metabolismo lipídico de fêmeas de *Epinephelus
marginatus***

**Effects of dietary supplementation with different fatty acids
sources in the lipid metabolism of *Epinephelus marginatus*
females**

São Paulo

2016

BRUNO CAVALHEIRO ARAÚJO

Efeitos da suplementação da dieta com diferentes fontes de ácidos graxos no metabolismo lipídico de fêmeas de *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae)

Effects of dietary supplementation with different fatty acid sources in the lipid metabolism of *Epinephelus marginatus* females (Teleostei: Serranidae)

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Fisiologia.

Orientadora: Renata Guimarães
Moreira Whiton

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Araújo, Bruno Cavalleiro

Efeitos da suplementação da dieta com diferentes fontes de ácidos graxos no metabolismo lipídico de fêmeas de *Epinephelus marginatus* (**Teleostei: Serranidae**).

Número de páginas: 103

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Metabolismo lipídico 2. *Epinephelus marginatus* 3. Ácidos graxos
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Dedicatória

A Claudia,
companheira e parceira de vida, pelo amor, apoio e cumplicidade
proporcionada em todos estes anos...
Aos meus pais Moisés e Piedade,
por terem apoiado todas minhas decisões e por estarem ao meu lado em todos
os momentos,
DEDICO

Agradecimentos

São tantas as pessoas para agradecer que possivelmente serei injusto me esquecendo de algumas delas...

Primeiramente gostaria de agradecer a Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton pelo companherismo, cumplicidade, amizade, paciência, e por ter me conduzido nestes quase últimos dez anos de forma tão amorosa e serena até aqui. Todo o conhecimento que você passou mudou minha vida não só profissionalmente, mas principalmente como pessoa! Se um dia eu conseguir ser para meus “futuros alunos” metade do que você foi para nós tenho certeza que terei cumprido a função com excelência.

A todos meus familiares, em especial a minha mãe, pai, irmãs e sobrinhos, pessoas que juntas formam o alicerce que me sustenta, e me permite estar aqui hoje. Amo vocês incondicionalmente, obrigado por todo o amor e confiança depositados em mim, aconteça o que acontecer eu sei que posso contar com vocês e isso torna minha vida mais leve...

A minha esposa, amiga e antes de tudo companheira Claudia, por dividir o último 1/3 de sua vida comigo. Obrigado por estar sempre junto de mim, em todos os momentos, por me fazer acreditar e por ser minha maior fonte de inspiração. Sem você nada disso teria acontecido, você deve imaginar o quanto você representa para mim! Te amo e estarei aqui sempre. A Elisabeth e Orlando (*in memoriam*) por toda confiança, e por ter me recebido na família sempre de braços abertos.

A “família” LAMEROA, Amanda, Aline, Bianca, Kadu, Gabi, Paulo, Cristiele, Jaja, Jaboti, Honji, Tiago, Vanessa, Ju Suzuki, Raísa, Gabriel, Mariana, Jéssica, Andreone e Walquiria. Como não chamar vocês de família depois de tantas coisas que passamos juntos durante este tempo? Juntos criamos um laço muito forte de amizade, carinho e respeito, e tenho certeza que mesmo longe estaremos sempre juntos. Mais uma vez

obrigado!!! Gostaria de agradecer especialmente ao Jaja, Paulo, Mariana e Jéssica (integrantes do projeto garoupa-verdadeira) por todo o suporte dado a este trabalho, e principalmente por todas as “roubadas”. Todo este tempo em São Sebastião foi bom DEMAIS...

Aproveitando gostaria de agradecer a todos os funcionários do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar) por todo o suporte durante os experimentos. Primeiramente a todos da área técnica: Joseph (*in memmorian*) grande parceiro, me ensinou muito, como foi bom trabalhar com você, Josélton obrigado pela proatividade e boa vontade sempre, e claro “seu” Elso, meu patrão, não tenho palavras para agradecer sua amizade!!! Além de outros, Seu Luis, Elias, Paulo, Oliveira, Vagner, etc... Nada disso teria acontecido sem a grande ajuda de vocês, muito obrigado... A todos meus amigos de praia, Jaja, Serginho, Sol, Mari, Pola, Pedro, Caju, Mogli, Fernando, Marcelo, Renato, Isa, Nilvia, etc... Obrigado por todo companherismo, e claro pelas festas e muitos dias de praia.

Aos funcionários do departamento de fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB), principalmente para à Roseli, Gisele, Marcilene, Vagner, Dilma e Suzi. Em especial gostaria de agradecer a Prof. Lucile Maria Floeter Winter por ter aberto as portas de seu laboratório, e ao Ricardo e Sandra por toda disposição e ajuda com as análises moleculares. Da mesma forma ao Prof. Diogo Teruo Hashimoto do CAUNESP pela grande ajuda com as análises de bioinformática.

Aos companheiros de trabalho do Commonwealth Scientific and Industrial Research, em especial Brett Glencross e Nick Wade, por todo o conhecimento e experiências repassadas, este tempo foi realmente importante para o meu crescimento. Aos meus amigos de Austrália, Bruno, Michael, David, Karl, Amber, Allan, Michell, Artur. Obrigado, estes doze meses na Austrália foram realmente incríveis!!!

Aos meus amigos de vida, os quais me fazem acreditar que realmente o Brasil continua sendo o melhor lugar do mundo, Natália, Wagner, Fabio, Thiago, Alan, Aline, Cristine, Gabriel, Elisa (Caca e Lulu), Alexandre, Ju, Roberta, Marcus, Dú, Flavio, etc... Em especial a família Gil. Ilani, Victor e Dani, muito obrigado pela amizade verdadeira e por me acolherem na família de vocês como membro, pelo menos é assim que me sinto.

Aos meus compadres e comadres, Ge e Dani, e Douglas e Glau pelos dois presentes mais lindos do mundo (Flora e Bárbara), podem contar comigo para tudo, tenho muito orgulho de fazer parte da família de vocês.

Enfim quase impossível listar todos que participaram, e contribuíram direta e indiretamente para a realização do trabalho, mas de qualquer forma serei eternamente grato a todos vocês.

MUITO OBRIGADO!

Índice

Lista de Abreviações.....	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
1. Introdução.....	1
1.1. Espécie modelo – Garoupa Verdadeira (<i>Epinephelus marginatus</i>).....	1
1.2. Ácidos Graxos – Estrutura, Classificação e Funções.....	2
1.3. Regulação da Biossíntese e β -oxidação de Ácidos Graxos	6
1.4. Ferramentas Moleculares no Estudo do Metabolismo Lipídico	10
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Construção e Adequação das Estruturas	14
3.2. Coleta dos Animais Experimentais	14
3.3. Delineamento Experimental e Dietas.....	14
3.4. Análises Bioquímicas.....	17
3.4.1. Lipídios Totais	17
3.4.2. Perfil de Ácidos Graxos	17
3.5. Análises Moleculares	18
3.5.1. Extração de RNA Total.....	18
3.5.2. Quantificação e Análise da Qualidade e Integridade do RNA	18
3.5.3. Síntese de cDNA.....	19
3.5.4. Construção da Biblioteca e Sequenciamento Illumina Miseq®	20
3.5.5. Montagem <i>de novo</i> e anotação funcional.....	21
3.5.6. PCR em tempo real	21
3.6. Forma de Análise dos Resultados	22
4. Resultados	24

4.1.	Análises metabólicas.....	24
4.1.1.	Análise do Perfil de Ácidos Graxos dos Óleos e Dietas Experimentais	24
4.1.2.	Concentração Lipídica Total.....	24
4.1.3.	Ácidos Graxos.....	25
4.1.3.1.	Fosfolipídios.....	25
4.1.3.2.	Triglicerídeos	26
4.1.3.3.	Ácidos Graxos Totais do Plasma	30
4.2.	Análise do Transcriptoma e da Expressão dos Genes do Metabolismo Lipídico	30
4.2.1.	Análise dos Dados Brutos e da Montagem <i>de novo</i>	30
4.2.2.	Anotação Funcional	31
4.2.3.	Expressão dos Genes do Metabolismo Lipídico.....	32
5.	Discussão.....	33
5.1.	Análises Metabólicas	33
5.1.1.	Análise do Perfil de Ácidos Graxos dos Óleos Experimentais e Dietas	33
5.1.2.	Concentração Lipídica Total.....	34
5.1.3.	Ácidos graxos.....	36
5.1.3.1.	Fosfolipídios.....	36
5.1.3.2.	Triglicerídios	38
5.1.3.3.	Ácidos Graxos Totais do Plasma	44
5.2.	Análise do Transcriptoma e Expressão dos Genes Relacionados com o Metabolismo Lipídico	45
5.2.1.	Análise do Transcriptoma	45
5.2.2.	Expressão dos Genes do Metabolismo Lipídico	46
6.	Considerações Finais	Erro! Indicador não definido.
	Referências Bibliográficas	54
	Tabelas	69
	Figuras	83
	Anexos	100

Lista de Abreviações

- ACADVL – do inglês “*very long-chain acyl CoA-dehydrogenase*”
- ACC – do inglês “*acetyl-CoA carboxylase*”
- ACOX – do inglês “*peroxisomal acyl-CoA oxidase*”
- AGs – Ácidos graxos
- ARA – Ácido araquidônico do inglês “*Arachidonic acid*”
- BLAST – do inglês “*Basic Local Alignment Search Tool*”
- CEBIMar – Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo
- CEUA - Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Biociências
- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPT1 – do inglês “*carnitine palmitoyl transferase-1*”
- DHA – Ácido docosahexaenóico do inglês “*Docosahexaenoic acid*”
- EFA – Ácidos graxos essenciais do inglês “*Essential fatty acids*”
- ELOVL5 – Elongase 5
- EPA – Ácido graxo eicosapentanoico do inglês “*Eicosapentaenoic acid*”
- ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
- FADS – Dessaturase do inglês “*fatty acid desaturase*”
- FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
- FAS – do inglês “*fatty acid synthase*”
- FID – Detector de chama de ionização do inglês “*flame ionization detector*”
- GC – Cromatógrafo a Gás do inglês “*Gas chromatography*”
- HUFA – Ácidos graxos altamente insaturados do inglês “*Highly unsaturated fatty acid*”
- IB – Instituto de Biociências
- ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- IUCN – do inglês “*The World Conservation Union*”
- IUPAC - do inglês “*International Union of Physical and Applied Chemists*”
- LAMEROA – Laboratório de metabolismo e reprodução de organismos aquáticos
- lcPUFA – Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa do inglês “*Long chain polyunsaturated fatty acid*”
- LNA – Ácido linolênico do inglês “*linolenic acid*”
- MMA – Ministério do Meio Ambiente
- MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados do inglês “*monounsaturated fatty acids*”

NCBI – do inglês “*National Center for Biotechnology Information*”

OC – Óleo de coco

OCA – Óleo de canola

OL – Óleo de linhaça

OP – Óleo de peixe

OPA – Óleo de palma

OS – Óleo de soja

OV- Óleos vegetais

PCR – Reação em cadeia da polimerase do inglês “*Polymerase chain reaction*”

PL – Fosfolipídios do inglês “*Phospholipids*”

PUFA – Ácidos graxos polinsaturados do inglês “*Polyunsaturated fatty acid*”

RIN – Número de integridade do RNA do inglês “*RNA integrity number*”

S - Sardinha

SAT – Ácidos graxos saturados

SCD – do inglês “*stearoyl-CoA desaturase*”

SRA – do inglês “*Sequence Read Archive*”

TG – Triglicerídeos do inglês “*Triglycerides*”

USP – Universidade de São Paulo

Resumo

O presente estudo teve como objetivo investigar a influência da incorporação da dieta com óleo de peixe (OP), rico em 22:6n3 (DHA) e 20:5n3 (EPA); óleo de linhaça (OL), rico em 18:3n3 (LNA); e óleo de coco (OC), rico em ácidos graxos saturados, no metabolismo lipídico de fêmeas adultas de *Epinhephelus marginatus* (garoupa verdadeira). Adicionalmente foi realizado o sequenciamento e montagem *de novo* do transcriptoma do tecido hepático de *E. marginatus* por *Next Generation Sequence*, e as sequências obtidas foram utilizadas como ferramenta para validar genes relacionados com o metabolismo lipídico. Os resultados mostraram que, após 5 meses de experimento, a concentração de lipídios no tecido muscular foi superior nos animais do grupo controle (alimentado apenas com sardinha) devido possivelmente a uma menor digestibilidade dos ácidos graxos incorporados na dieta dos demais grupos experimentais. Em geral os triglicerídios (TG) refletiram mais a dieta do que os fosfolipídios (PL), e foram marcados pelo alto percentual de 18:3n3 nos animais do grupo OL em todos os tecidos, e DHA na musculatura dos animais do grupo OP. Aparentemente os resultados observados para os ácidos graxos saturados e monoinstaurados sugerem um potencial autorregulatório para processos de retenção e oxidação de ácidos graxos para esta espécie, já que em geral os tecidos não refletiram diretamente a composição da dieta. A suplementação da dieta com diferentes óleos interferiu de forma direta na expressão dos genes relacionados com a síntese e β -oxidação de ácidos graxos. A expressão do gene ELOVL5 presumivelmente influenciou na deposição de ácidos graxos intermediários nos tecidos dos animais de todos os grupos experimentais, que não foram observados, ou foram pouco representativos nas dietas experimentais. O sequenciamento dos transcritos do tecido hepático de *E. marginatus* gerou 92.887 *contigs* de alta qualidade, e foi observado maior número de anotações funcionais contra o banco de proteínas de *zebrafish* (*Danio rerio*), comparado ao banco de proteínas de *fugu* (*Takifugu rubripes*). Foram selecionadas as sequências dos genes de interesse no banco de dados local de *E. marginatus*, e todas as sequências utilizadas apresentaram alto grau de similaridade e foram consideradas adequadas para a realização das análises de PCR em tempo real.

Palavras-chave: Metabolismo lipídico, ácidos graxos, transcriptoma, expressão gênica, garoupa verdadeira

Abstract

This study aimed to investigate the influence of dietary supplementation with fish oil (OP), rich in 22:6n3 (DHA) and 20:5n3 (EPA); linseed oil (OL), rich in 18:3n3 (LNA); and coconut oil (OC), rich in saturated fatty acids in the lipid metabolism of *Epinephelus marginatus* (dusky grouper) adult female. Additionally sequencing and *de novo* assembly of the *E. marginatus* liver transcriptome by Next Generation Sequence was performed, and sequences obtained were used to validate lipid-relevant genes. The results showed that the lipid concentration in the liver was higher in the control group (fed only with sardine) likely because the reduced digestibility of the incorporated fatty acids in the diet from the other experimental groups. In general the triglycerides (TG) of tissues reflected more the diet profile than phospholipids (PL), as well as were characterized by the high percentages of 18:3n3 in the OL group in all tissues, and DHA in the muscles of the OP group. Apparently the results for the saturated and monounsaturated fatty acids suggest a self-regulatory potential for retention and oxidation processes for this species, since in general the tissues did not directly reflect the fatty acid diet composition. The ELOVL5 expression presumably influenced in the fatty acids intermediate deposition in the animal tissue from all experimental groups, which were not observed or not representative in the experimental diets. The sequencing of the transcripts from *E. marginatus* liver yielded 92,887 high quality contigs, and it was recorded a higher number of functional annotations against zebrafish (*Danio rerio*) proteins database, compared to the fugu (*Takifugu rubripes*) proteins database. It was selected sequences of interest genes in the local database of *E. marginatus*, and all sequences used showed a high similarity degree with other teleosteo species, and were considered adequate to run the real time PCR analyzes.

Keywords: Lipid metabolism, fatty acids, transcriptome, gene expression, dusky grouper

1. Introdução

1.1. Espécie modelo – Garoupa Verdadeira (*Epinephelus marginatus*)

A garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae, Epinephelinae) é um peixe teleósteo, hermafrodita protogínico sequencial (nascem com o sexo feminino e alguns indivíduos, na fase adulta, invertem o sexo para machos), característico do litoral rochoso, vive desde águas rasas até profundidades de mais de 200 metros. Sua distribuição é bastante ampla ocorrendo no litoral sudeste do Brasil, assim como no mediterrâneo e no Atlântico leste das Ilhas Virgens Britânicas, África do Sul, Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde (Fig. 1) (Barreiros, 1995).

Figura 1. Mapa mundial com a distribuição da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*. (Fonte: www.fishbase.org)

No Brasil, principalmente entre as regiões norte do litoral paulista e sul fluminense, a garoupa-verdadeira pode ser considerada uma importante fonte de renda para diversas famílias de pescadores tradicionais. No entanto, a forte pressão de pesca, a falta de planejamento de manejo, a agregação na época reprodutiva, a ampla utilização na culinária mundial, aliados a maturação sexual tardia dos machos (cerca de 10 anos), levaram à inclusão de *E. marginatus* na lista da IUCN (*The International Union for Conservation of Nature*) como espécie sobrexploitada no mundo (Cornish e Harmelin-

Vivien, 2004) e recentemente, mais especificamente, no Estado de São Paulo (São Paulo, 2008; Rodrigues-Filho et al., 2009). Devido ao seu delicado estado de conservação o ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) lançou a portaria 445/2014 (Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos) que proibiu a pesca da garoupa verdadeira em todo o território nacional. No entanto apenas a alteração da legislação pesqueira não é suficiente para inibir o declínio dos estoques naturais, já que muitas vezes a fiscalização realizada pelos órgãos governamentais é falha ou inexistente. Esta situação leva à busca de estratégias mitigadoras de conservação, e, com seu estoque natural praticamente esgotado, a produção em cativeiro surge como opção direta para a manutenção dos estoques naturais desta espécie. No entanto, estudos fisiológicos básicos realizados com a garoupa verdadeira são escassos, e informações a respeito do metabolismo lipídico são praticamente inexistentes.

1.2. Ácidos Graxos – Estrutura, Classificação e Funções

Por ser um animal estritamente carnívoro, a garoupa verdadeira necessita de uma dieta com elevada concentração protéica e lipídica (Fraser e Davies, 2009). Os lipídios são um grupo de compostos quimicamente heterogêneos, e que desempenham incontáveis funções celulares (Gurr e James, 1975), como armazenamento e transporte de energia, estruturação das membranas celulares, além de serem precursores de vitaminas e hormônios (Nelson e Cox, 2005). Geralmente os lipídios podem ser divididos em duas grandes classes dependendo de sua polaridade, os lipídios neutros e os polares. Os lipídios neutros são compostos principalmente pelos triglicerídios (TG) e ceras, e são considerados a principal fonte de armazenamento de energia do organismo, enquanto os lipídios polares são normalmente formados pelos fosfolipídios (PL), que

são moléculas anfipáticas, e que dentre muitas, desempenham a importante função de estruturar e conferir fluidez para a bicamada lipídica das membranas biológicas (Nelson e Cox, 2005; Sargent et al., 2002; Glencross, 2009; Turchini et al., 2009).

A unidade básica dos lipídios são os ácidos graxos (AGs), que são ácidos carboxílicos, formados por cadeias hidrocarbonadas contendo de 4 a 36 átomos de carbono, mas a maioria encontrada na natureza apresenta 16 ou 18, podendo conter até 22 carbonos. A nomenclatura utilizada na classificação dos diferentes tipos de AGs foi criada pela *International Union of Physical and Applied Chemists* (IUPAC), e é definida de acordo com o número de átomos de carbono, número de insaturações, e a posição da primeira insaturação relativa a região metil terminal de sua cadeia de carbonos. Esta cadeia pode ser totalmente saturada (ácidos graxos saturados - SAT), conter uma insaturação (ácidos graxos monoinsaturados - MUFA), duas ou três insaturações (ácidos graxos polinsaturados - PUFA), e quatro ou mais insaturações (ácidos graxos altamente insaturados – HUFA) (Kakela et al., 1995; Nelson e Cox, 2005). Adicionalmente cada AG possui um nome químico baseado na convenção de caracterização molecular da IUPAC, no entanto, estes nomes longos e triviais são comumente abreviados ou apresentados de acordo com as características químicas da molécula, por exemplo, o ácido docosahexaenoico, é comumente tratado como 22:6n3 (no qual o 22 representa o número de carbonos, o 6 o número de insaturações, e o 3, o número do carbono da primeira insaturação) ou DHA (Glencross, 2009).

Os AGs da série n3, como o DHA, são encontrados em maior quantidade no ambiente marinho, enquanto os AGs da série n6, são encontrados principalmente no ambiente terrestre e dulciaquícola (Henderson, 1996; Hasting et al., 2001). Peixes marinhos, principalmente de clima temperado, possuem elevadas quantidades de HUFA da série n3 em sua cadeia trófica desde os produtores primários (fitoplâncton), e

apresentam limitada atividade dos grupos enzimáticos (elongases e desaturases) que atuam na síntese de HUFA comparado a espécies dulciaquícolas, que possuem pouca quantidade destes AGs em sua cadeia trófica e assim precisam converter esses AGs a partir de seus precursores (Bell e Tocher, 1995; Henderson, 1996; Hasting et al., 2001; Tocher, 2003; Glencross, 2009). De forma geral, a inabilidade de peixes marinhos em converter C18 PUFA em HUFA é dada principalmente pela insuficiência enzimática das vias de elongação e desaturação, devido especialmente à ausente ou inexpressiva atividade de $\Delta 5$ desaturase e C18-20 elongase (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003; Glencross, 2009; Torstensen e Tocher, 2010).

De uma forma geral, os PUFAs da série n3 e n6 participam de importantes funções biológicas (Nelson e Cox, 2005). Para um crescimento normal em peixes, incluindo desenvolvimento e reprodução, torna-se necessário a inclusão de grandes quantidades de AGs das séries n3 e n6 na dieta, principalmente o DHA, o EPA (C20:5n3; ácido eicosapentaenoico) e o ARA (C20:4n6; ácido araquidônico). O ARA é precursor de vários eicosanoides como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que em peixes podem influenciar em processos de crescimento, vitelogênese, reprodução e regulação de respostas imune (Bell e Tocher, 1995), já o EPA e o DHA, participam de processos relacionados com o desenvolvimento de formas jovens, crescimento, reprodução, síntese de hormônios esteroides gonadais, além de serem importantes componentes das membranas celulares dos tecidos nervosos e visuais (Sorbera et al., 2001; Moreira et al., 2003; Schreiner et al., 2005).

Em virtude de sua dinâmica complexa, os AGs continuam a ser o nutriente menos compreendido das dietas para peixes, apesar dos esforços significativos nos últimos anos para melhorar a base de conhecimentos sobre a aplicação correta destes compostos na aquicultura (Glencross, 2009). Processos de mobilização, deposição, síntese e

oxidação de AGs são interespecíficos, e podem ser influenciados por diversas variáveis como a idade do indivíduo, temperatura da água, densidade de estocagem dos animais e hábito de vida. No entanto, a composição da dieta é o fator que mais interfere no metabolismo lipídico em peixes (Tocher, 2003; Torstensen e Tocher, 2010).

Devido à exigência nutricional de peixes marinhos por HUFA da série n3 (principalmente EPA e DHA), torna-se necessária a incorporação de altas concentrações de farinha e óleo de peixe (OP) nas dietas em aquicultura. No entanto a utilização destes ingredientes pode ser considerado o principal entrave para o crescimento sustentável da atividade. A produção de farinha e OP além de ser considerada uma atividade de alto impacto, uma vez que são produzidos a partir dos estoques naturais, também possuem elevado custo e alta variabilidade nutricional, interferindo na produção das dietas para animais marinhos (Silva et al., 2010). Um esforço considerável vem sendo realizado desde a década de 1990 com o intuito de substituir o OP por óleos alternativos, geralmente de origem vegetal, como o óleo de linhaça (OL) (Bell et al., 1993; Izquierdo et al., 2003; Wassef et al., 2015), óleo de soja (OS) (Brown et al., 1997; Lee et al., 2000; Grisdale-Helland et al., 2002), óleo de canola (OCA) (Glencross, 2003; Francis et al., 2007; Huang et al., 2007). Alguns trabalhos encontraram resultados satisfatórios utilizando diferentes níveis de substituição de OP por óleos vegetais (OV). Izquierdo et al., (2003), em estudo realizado com *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*, observaram que foi possível substituir até 60% do OP por OL, OCA e OS, ou uma mistura destes óleos, sem nenhuma interferência no crescimento dos animais. Da mesma forma, não foram observadas alterações no crescimento de juvenis de *Salmo salar* em detrimento a substituição de 50% de OP por óleo de palma (OPA) (rico em SAT) (Rosenlund et al., 2001). Apesar de, em muitos casos, a substituição de OP por outros óleos não interferir no crescimento, as alterações na composição de AGs das dietas pode diretamente

influenciar o metabolismo lipídico de peixes, e consequentemente a composição lipídica dos tecidos, modulado por fatores como digestibilidade (Torstense et al., 2000), catabolismo de AGs (Frøyland et al., 2000, Torstensen et al., 2009), lipogênese (Rollin et al., 2003), elongação e desaturação (Bell et al., 2001, 2002) e produção de eicosanoides (Torstensen e Tocher, 2010).

1.3. Regulação da Biossíntese e β -oxidação de Ácidos Graxos

A Figura 2 apresenta um esquema simplificado do metabolismo lipídico comum para a maioria dos vertebrados. Como dito anteriormente, o metabolismo lipídico é modulado por uma mistura de processos metabólicos como, geração de energia a partir da oxidação dos AGs, produção de moléculas de AGs a partir de substratos específicos, e bioconversão de AGs de grande importância biológica (por exemplo DHA e EPA) a partir de seus precursores (Nelson e Cox, 2005; Tocher, 2003; Glencross, 2009; Turchini et al., 2009).

Figura 2. Metabolismo de ácidos graxos. Os AGs são absorvidos das dietas ou sintetizados *de novo* a partir da glicose ou outros metabólitos para produzir acetil-CoA, que é convertida em malonil-CoA pela enzima *acetyl-CoA carboxylase* (ACC). Malonil-CoA é utilizado como substrato pela *fatty acid synthase*

(FAS) para produzir o ácido palmítico (16:0). O 16:0 pode então ser dessaturado e alongado por enzimas específicas no retículo endoplasmático (ER), para posteriormente serem armazenados nos tecidos de reserva, serem incorporados nas membranas ou β -oxidados por mitocôndrias e peroxissomos. (modificado de Brolinson, 2009).

Diretamente relacionado com o metabolismo lipídico, alguns estudos comprovaram a influência de diferentes fontes de AGs presentes na dieta, na expressão de genes das vias de síntese e oxidação de AGs (Torstensen e Stubhaug, 2004, Stubhaug et al., 2006; Stubhaug et al., 2007). Estes estudos sugerem que os mecanismos que regulam a biossíntese e a β -oxidação, possuem preferência por determinados AGs mais que para outros, e são modulados pela expressão diferencial de genes como o *acetyl-CoA carboxylase* (ACC), *fatty acid synthase* (FAS), *acyl-CoA oxidase* (ACO), *elongases* (ELOVL), *fatty acid dessaturase* (FADS), dentre outros.

De forma geral todos os vertebrados compartilham de similar via lipogênica, iniciada pela produção de acetil-CoA mitocondrial, dada pela descarboxilação oxidativa de piruvato. Duas enzimas citoplasmáticas nomeadas de *acetyl CoA carboxilase* (ACC) e *fatty acid synthase* (FAS) são responsáveis pela biossíntese de AGs nos animais, com energia proveniente da oxidação de NADPH conduzindo esta reação (Wakil et al., 1983). Depois da transferência de acetil-CoA da mitocôndria para o citoplasma, esta molécula é carboxilada para formar malonil-CoA via ação de ACC, sendo esta enzima o primeiro e limitante passo da lipogênese (Regost et al., 2001; Rollin et al., 2003). Após sua síntese, malonil-CoA é submetido a uma série de processos de condensação, desidratação e redução, facilitado por quatro subcomponentes enzimáticos de FAS (*beta-keto-acyl carrier protein-ACP synthase*, *beta-keto-ACP reductase*, *3-OH acyl-ACP dehydratase* e *enoyl-CoA reductase*). Para cada ciclo dois átomos de carbonos provenientes do malonil-CoA são adicionados na porção inicial de uma molécula de acetil-CoA para formar o 16:0 (ácido palmítico), e esse AG pode sofrer sucessivos

processos de alongação e desaturação gerando formas mais complexas (Frøyland et al., 2000; Regost et al., 2001).

Os processos de alongação e desaturação, em geral, são necessários particularmente quando os níveis de AGs de cadeia longa (lcPUFA) e HUFA são inadequadamente fornecidos na dieta. A alongação de PUFA precursores de 18 e 20 carbonos é modulada pela ação do gene ELOVL5. Muitos trabalhos realizados com espécies de teleósteos caracterizaram este gene, que mesmo em animais marinhos apresentaram elevada expressão, favorecendo a síntese de AGs intermediários como o 18:4n3, 18:3n6, 22:5n3 e 22:4n6 (Izquierdo et al., 2003; Zeng et al., 2004; Salini et al., 2015). No entanto, como dito anteriormente, alguns importantes HUFA como EPA, DHA e ARA geralmente não são sintetizados, ou são sintetizados em níveis inexpressivos por peixes marinhos devido baixa atividade de $\Delta 5$ desaturase e C18-20 elongase (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003; Glencross, 2009; Turchini et al., 2009; Torstensen e Tocher, 2010).

Todos os animais possuem a capacidade de introduzir duplas ligações nas posições n3, n6 e n9 dos AGs. Os MUFA são sintetizados a partir de SAT via $\Delta 9$ desaturase, modulada pela expressão do gene *stearoyl-CoA desaturase* (SCD). SCD promove a desaturação de SAT contendo de 12 a 19 moléculas de carbono, mas principalmente do 16:0 e 18:0, produzindo o 16:1n7 e 18:1n9, respectivamente (Nakamura e Nara, 2004). Em especial o 18:1n9 possui importante função biológica, já que atua diretamente na regulação da viscosidade das membranas celulares, e é um importante AG em processos de produção de energia via β -oxidação (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003).

A β -oxidação de AGs pode ocorrer em duas diferentes organelas, na mitocôndria e nos peroxissomos, e o potencial oxidativo de ambas irá depender da espécie, tecido

em questão e da estrutura da molécula (Henderson, 1996; Torstensen e Tocher, 2010). Musculatura vermelha, fígado e coração podem ser considerados os mais importantes tecidos relacionados com a β -oxidação em peixes, e além disso, o hábito de vida do animal esta intimamente relacionado ao potencial oxidativo do tecido em questão. Enquanto peixes que apresentam comportamento de natação constante oxidam AGs principalmente na musculatura (rápida disponibilidade energética para atividade locomotora), animais de hábitos sedentários oxidam os AGs principalmente no tecido hepático (Sheridan, 1994; Tocher, 2003; Torstensen e Tocher, 2010). A β -oxidação peroxisomal, independente do tecido, é favorecida pela presença de AGs de cadeias muito longas (maiores que 22 carbonos), já que esta organela realiza a oxidação inicial, para posteriormente estes AGs serem processados pelas mitocôndrias. O passo inicial e limitante da β -oxidação mitocondrial é realizado por uma aciltransferase específica nomeada de *carnitine palmitoyl transferase-1* (CPT1). Primeiramente uma molécula de acil-CoA liga-se a uma de carnitina em reação facilitada por CPT1, formando o acilcarnitina éster, que possui composição capaz de translocar as membranas biológicas para serem oxidadas na mitocôndria (Nelson e Cox, 2005). Uma vez no interior celular, a cadeia de AGs sofre ação de quatro diferentes desidrogenases até ser completamente oxidada. A desidrogenase específica para AGs de cadeia muito longa (como o DHA) é denominada de *very long-chain acyl CoA-dehidrogenase* (ACADVL), e assim como CPT1 pode ser considerada uma enzima limitante na β -oxidação mitocondrial de AGs (Torstensen et al., 2009).

Da mesma forma que a β -oxidação mitocondrial, a peroxisomal requer uma série de enzimas específicas para catalizar as reações desta via. *Peroxisomal acyl-CoA oxidase* (ACOX) é a primeira e limitante enzima da β -oxidação peroxisomal (Ruyter et al., 1997), e atua no transporte de grupamentos acil para o interior do peroxissomo

(Frøyland et al., 2000). O sistema de β -oxidação peroxisomal é incapaz de oxidar lcPUFA completamente, sendo assim esta organela encurta a cadeia destes AGs, os convertendo em PUFA de cadeias médias, que são então transferidos por acil carnitinas para mitocôndria, onde será concluída a oxidação (Henderson, 1996). Normalmente a taxa de oxidação decresce com o aumento da cadeia do AG. Para a maioria dos vertebrados, existe uma ordem preferencial de oxidação que é maior para SAT, seguido por MUFA e PUFA. Da mesma forma alguns AGs como o 16:0, 18:1n9, 20:1n9 e EPA são usualmente oxidados, enquanto o DHA é preferencialmente retido, principalmente na musculatura, e isso se dá devido ao alto valor biológico deste AG em diversos processos fisiológicos (Torstensen e Tocher, 2010). Além disso a maior retenção de DHA na musculatura é de suma importância para o consumo de pescados por humanos. A deficiência de n3 HUFA na dieta, particularmente de DHA, associado a dietas contendo grandes quantidades de 18:2n6 pode induzir o desenvolvimento de patologias principalmente relacionadas com respostas inflamatórias, como alguns tipos de câncer (Bougnoux et al. 1994), e doenças cardiovasculares (Holub e Holub, 2004; Maehre et al. 2015).

1.4. Ferramentas Moleculares no Estudo do Metabolismo Lipídico

Para melhor compreender os impactos causados pela composição de AGs das dietas, sobre processos que modulam o metabolismo lipídico em peixes, torna-se necessário um maior investimento no conhecimento da fisiologia básica da espécie, que compreende desde a interação entre processos de conversão, deposição e oxidação de AGs, até a expressão de genes que atuam nestas vias (Torstensen e Tocher, 2010). Cada vez mais estudos utilizando ferramentas moleculares estão sendo realizados visando a aplicação dos resultados na nutrição de organismos aquáticos. Como exemplo disto

constata-se o aumento no número de trabalhos relacionados com análises de genomas, transcriptomas, e expressão gênica (Leaver, 2008; Calduch-Giner, 2013; Athanasios, 2014). A investigação do impacto dos nutrientes presentes na dieta, na expressão de genes de diferentes vias, e o reflexo desta expressão diferenciada no organismo pode ser definida como nutrigenômica (Leaver et al., 2008; Athanasios, 2014). Dentre as abordagens da nutrigenômica destacam-se os sequenciamentos de nova geração (do inglês *Next Generation Sequence*), em especial o transcriptoma, que é o sequenciamento dos genes transcritos em uma célula, tecido, ou organismo específico para um determinado estágio de desenvolvimento, ou condição fisiológica (Qian et al., 2014). A análise do transcriptoma é uma importante ferramenta para ser aplicada na descoberta de novos genes, no desenvolvimento de marcadores genéticos, estudos de expressão gênica, dentre outros (Leaver et al., 2008). Os principais objetivos deste tipo de análise é investigar os elementos funcionais da sequência dos transcritos de um organismo, e obter uma visão global de como a expressão de todos os genes transcritos se alteram sob influência de outras variáveis, tal como temperatura e alimentação (Mazurais et al., 2011). A grande quantidade de dados gerados pelo transcriptoma, muitas vezes alcançando bilhões de pares de bases, permite a investigação mais profunda de uma via metabólica, ao invés de apenas poucas enzimas destas vias, facilitando, barateando e complementando análises metabólicas e moleculares, como a caracterização do perfil de AGs dos tecidos e a quantificação da expressão gênica.

Os estudos relacionados com nutrigenômica na aquicultura são ainda incipientes mundialmente, principalmente no Brasil. No entanto alguns grupos de pesquisas já disponibilizam o banco de sequências geradas por transcriptoma de tecidos específicos de peixes que possuem interesse comercial mundial. Em trabalho realizado com *Spaurus aurata* Calduch-Giner et al., (2013) descreveram um total de 21.384 genes que

atuam em diversas vias biológicas, disponibilizando estas sequências em um endereço eletrônico (www.nutrigroup-iats.org/seabreamdb), facilitando o acesso a essas informações por pesquisadores que tenham interesse em estudar esta mesma espécie em distintas áreas. A formação de um banco de dados com os resultados provenientes do sequenciamento auxilia também em estudos de análise de expressão gênica, pois pode-se desenhar *primers* específicos para PCR em tempo real através da comparação de sequências de outra espécie (BLAST por similaridade). Wade et al., (2014), em estudos realizados com *Lates calcarifer*, utilizaram a sequência gerada por um transcriptoma, e com a utilização da técnica de PCR em tempo real, mapearam e quantificaram a expressão de genes relacionados com o metabolismo de carboidratos e lipídios, identificados por similaridade com outras espécies de teleósteos.

Considerando a importância dos AGs na nutrição de organismos aquáticos, este trabalho testa a hipótese de que a suplementação da dieta com óleos contendo diferentes perfis de ácidos graxos, irá alterar

Considerando a importância da nutrição lipídica para peixes, o presente trabalho testa a hipótese de que diferentes perfis de AGs na dieta afeta diretamente a composição dos tecidos, e por consequência fatores relacionados com β -oxidação, síntese, mobilização e deposição de AGs em fêmeas adultas de *E. marginatus*. Os resultados gerados servirão como base para futuros trabalhos nutricionais, seja para os reprodutores ou para juvenis, já que esta espécie apresenta um alto potencial produtivo, voltado tanto para a comercialização, como para programas de conservação.

2. *Objetivos*

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal do presente trabalho foi descrever as alterações nos processos de mobilização, deposição, síntese e oxidação de AGs, nos principais tecidos lipogênicos de fêmeas adultas de *E. marginatus*, alimentadas com dietas suplementadas com diferentes perfis de AGs.

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar a concentração de lipídios totais nos principais tecidos lipogênicos (fígado, músculo e gônadas) e no plasma sanguíneo;
- Traçar o perfil de AGs dos tecidos (hepático, muscular e gonadal), e do plasma sanguíneo;
- Sequenciar, montar *de novo*, anotar e analisar o transcriptoma do tecido hepático;
- Identificar e validar genes relevantes relacionados com o metabolismo lipídico;
- Quantificar a expressão de genes relacionados com as vias de síntese e β -oxidação de AGs;
- Comparar as variáveis acima descritas (lípidos, ácidos graxos e expressão gênica) em fêmeas adultas de *E. marginatus* alimentadas com dietas suplementadas com diferentes fontes de AGs.

3. Materiais e Métodos

3.1. Construção e Adequação das Estruturas

As estruturas do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP), como sistema de captação e filtragem de água, sistema de aeração e de acomodação dos animais (tanques e estruturas) foram construídas e adequadas com recursos de projetos do CNPq (Edital 36/2009) e FAPESP (2011/50407-4, ao qual este projeto foi vinculado) (Fig. 3).

3.2. Coleta dos Animais Experimentais

No total 42 exemplares adultos de *E. marginatus* foram coletados entre o meses de janeiro/2012 e agosto/2012, por pescadores artesanais do litoral norte do Estado de São Paulo, principalmente da ilha do Montão de Trigo (latitude 26° 54'14,24" Sul; longitude 45° 51'02,14" Oeste). A captura foi realizada através da técnica de "linhada" (utilização apenas de linha, anzol e isca, geralmente composta por sardinha ou bonito), sendo esta técnica a mais aconselhada para manter a integridade dos animais. Após a captura os animais foram mantidos em tanques-rede pelos pescadores até o momento do transporte, que foi realizado em caixa de 500L selada, com fluxo de oxigenação contínuo, adaptada ao carro ou barco (gentilmente disponibilizado pelo CEBIMar), até as estruturas onde o experimento foi conduzido. Todos os animais apresentavam comprimento total acima de 47cm (Tabela 1), considerado o comprimento de primeira maturação para *E. marginatus* (Andrade et al., 2003), ou seja, acima desta faixa de comprimento os animais são considerados adultos.

3.3. Delineamento Experimental e Dietas

Para a realização do tratamento alimentar 32 fêmeas adultas de *E. marginatus* foram igualmente distribuídas, levando-se em consideração massa corpórea e comprimento total (Tabela 1), em oito tanques circulares de 2.000l com fluxo de água aberto (± 3 l/min) instalados nas dependências do CEBIMar. Durante 30 dias os animais foram aclimatados às condições experimentais, e foram alimentados apenas com sardinhas (decapitadas e evisceradas) sem nenhum tipo de suplementação. A temperatura média da água dos tanques variou no decorrer de todo o experimento de $22,4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ (mínima) até $25,8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ (máxima) e a média da concentração de oxigênio dissolvido variou entre $7,5 \pm 0,7$ mg/L (mínima) até $8,4 \pm 0,4$ mg/L (máxima), e esses parâmetros foram aferidos diariamente. As médias mensais de todos os parâmetros físico-químicos da água como nitrito, nitrato, pH e amônia foram aferidos semanalmente e estão representadas no Anexo 1 - Parâmetros de Qualidade da Água.

Foram formados quatro grupos experimentais, com total de oito animais cada (duas caixas com quatro animais por tratamento alimentar): (S) grupo alimentado apenas com sardinha; (OL) grupo alimentado com sardinha contendo cápsulas de óleo de linhaça (rico em 18:3n3); (OP) grupo alimentado com sardinha contendo cápsulas de óleo de peixe (rico em 20:5n3 e 22:6n3); e (OC) grupo alimentado com sardinha contendo cápsulas de óleo de coco (rico em 12:0 e 14:0 e sem a presença dos AGs da série n3).

Dois grupos controle para o experimento foram estabelecidos, o grupo S sem a presença de nenhum óleo experimental adicional, com isso podemos investigar apenas a influência da dieta base (sardinha) no perfil de AGs dos tecidos e na expressão dos genes, e o grupo OC, já que os principais AGs presentes neste óleo são os 12:0 e 14:0, substratos que não irão diretamente influenciar nas vias de síntese e degradação de AGs polinsaturados (PUFA). Foram analisados os perfis dos AGs dos três óleos experimentais (óleo de linhaça - OL, óleo de peixe - OP e óleo de coco - OC) para a comprovação da integridade e

composição (Tabela 2). Da mesma forma foram analisados os perfis de AGs da sardinha e do homogeneizado da dieta base com os óleos experimentais, na mesma proporção (2.000mg por sardinha) ao ofertado para os diferentes grupos de animais (Tabela 3).

Para fornecer o alimento nos tanques, as sardinhas foram decapitadas e evisceradas, e duas cápsulas dos respectivos óleos, contendo 1.000mg cada, foram inseridas na cavidade abdominal (Fig. 4A, B e C). As alimentações foram realizadas a cada 96h, sendo ofertado aproximadamente 3% da biomassa do tanque por alimentação (equivalente a duas sardinhas com os respectivos suplementos por animal experimental). O alimento excedente foi retirado e pesado após 2h para calcular a quantidade exata ingerida pelos animais (Tabela 4). É importante destacar que foram realizados testes prévios para definir a frequência alimentar e o intervalo de 96h entre as refeições foi aquele no qual se observou o consumo completo do alimento pelos animais. Intervalos inferiores a estes resultaram em grande sobra de alimento nos tanques.

Antes do início do experimento todos os animais foram medidos e pesados novamente, e tiveram uma alíquota de sangue retirada para a análise metabólica do plasma (Fig. 4D). O experimento foi iniciado no mês de outubro/2012, e no mês de dezembro/2012 os animais tiveram outra alíquota de sangue coletada, para análises posteriores, sendo esta a coleta intermediária do experimento.

O experimento foi encerrado no mês de março/2013 totalizando cinco meses de alimentação. Os animais foram então anestesiados, eutanaziados por secção da medula espinhal (Comitê de Ética em Uso de Animais do IB/ CEUA – 166/2012), e tiveram seus tecidos (hepático, muscular e gonadal), além do plasma sanguíneo, coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido ou fixados em Trizol[®] (tecido hepático) para posteriormente serem analisados.

3.4. Análises Bioquímicas

3.4.1. Lipídios Totais

A extração dos lipídios totais nos tecidos e dietas foi realizada com uma mistura de clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) (Folch et al., 1957), e os mesmos quantificados pelo método colorimétrico de Frings et al., (1972) utilizando óleo de fígado de bacalhau (Sigma Aldrich) como curva padrão.

3.4.2. Perfil de Ácidos Graxos

As amostras de óleos, dietas e tecidos das fêmeas tiveram seus lipídios totais extraídos pelo método descrito acima e em seguida o extrato lipídico foi submetido a uma atmosfera de N₂ para evaporação do solvente. Com o método de cromatografia de coluna, os extratos lipídicos foram separados em lipídios neutros (triglicérides - TG) e polares (fosfolipídios - PL), metilados com cloreto de acetila (5% HCl em metanol) para a formação dos metil ésteres (Christie, 2003), e os AGs determinados em cromatografia gasosa (GC), acoplada a um ionizador de chama (FID) e auto injetor (Varian GC 3900). O perfil de AGs foi determinado com o cálculo de tempo de retenção, utilizando-se padrões de AGs com tempo de retenção conhecido (Supelco®, *37 Standard e Larodan Chemical Company – Mixture Me93 e Qualmix PUFA fish M – Menhaden Oil*). Para a análise dos AGs foi utilizada uma programação no cromatógrafo com as seguintes características:

- Início da corrida a 170°C mantida por 1 minuto;
- Rampa de 2.5°C/minuto, até atingir a temperatura final de 240°C, que foi mantida por 5 minutos.

O injetor e o detector foram mantidos a 250°C e 260°C, e foi utilizada uma coluna CP wax 52CB, com espessura de 0,25µm, diâmetro interno de 0,25mm e 30m de comprimento, tendo o hidrogênio como o gás de arraste.

3.5. Análises Moleculares

3.5.1. Extração de RNA Total

O RNA total do tecido hepático congelado das fêmeas de *E. marginatus* foi extraído utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen) que consiste em uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina designado para isolar RNA total de alta qualidade de células e amostras de tecidos. O tecido extraído foi pesado, e para cada 50mg foi adicionado 1ml de Trizol (Invitrogen[®]). O tecido foi então macerado e homogeneizado. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200μL de clorofórmio na amostra e a mesma foi agitada por 15 segundos com o auxílio de um vortex. Os tubos contendo as amostras foram incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 11.000g por 15 minutos à 2°C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi aspirada e transferida para outro tubo. Para a precipitação do RNA, adicionou-se 500μL de isopropanol por amostra e a mesma foi homogeneizada invertendo-se os tubos. As amostras foram então incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 2°C por 10 minutos a 11.000g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e descartado. Para a lavagem do RNA extraído, foi adicionado 1mL de etanol 75% sobre o pellet e o mesmo foi agitado com a ajuda de um vortex. Os tubos contendo as amostras foram então centrifugados a 7.000g por 5 minutos à 2°C. O sobrenadante foi novamente retirado e o tubo foi mantido invertido por 10 minutos. O RNA sedimentado foi redissolvido em 30μL de água MilliQ[®]. As amostras que não apresentaram alto grau de pureza foram extraídas utilizando o Rnase[®] Lipid Tissue (Qiagen), kit específico para extração em tecidos lipogênicos, de acordo com as especificações do fabricante.

3.5.2. Quantificação e Análise da Qualidade e Integridade do RNA

A integridade do material foi averiguada através da análise da razão Abs260/Abs280 no aparelho Nanodrop™ *Spectrophotometer* (ND-1000). Foram utilizadas apenas amostras com a razão Abs260/Abs280 maiores que 1.8. O RNA assim purificado foi estocado e mantido a -80°C.

Para realização da análise de integridade do RNA extraído foi utilizado o aparelho 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA), que avalia o número de integridade do RNA (RNA *integrity number* - RIN). Em experimentos que envolvam a extração de RNA de amostras de tecido de outras espécies de teleósteos, valores de RIN entre 6 e 7 são considerados adequados para a realização da quantificação por PCR em tempo real. Os dados referentes à qualidade e integridade das amostras de RNA utilizadas no presente estudo estão apresentados no Anexo 2 – Resultados Qualidade do RNA (Bioanalyzer).

3.5.3. Síntese de cDNA

Em microtubos de 0,2ml foi adicionado 5µL de cada amostra (em concentração de 200ng/ul) de RNA, de modo a se obter a concentração final de 1.000ng/µl. Em cada tubo foi acrescentado 1µl de oligo dT, 1µl de Randon hexamer (50ng/ul), 1µl de 10nm dNTP mix, 1µl de luciferase RNA (Promega 400pg/µl) e 1µl de água milliQ estéril. As amostras foram incubadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler) com programação de 65 °C por 5 minutos, sendo posteriormente resfriadas em gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 2µl de 10X RT buffer, 4µl de 25mM MgCl₂, 2µl de 0,1 M DTT, 1µl de RNaseOUT (40 U/µl) e 1µl de Superscript III RT (200 U/µL), totalizando 20µl de reação por amostra. Os tubos com as amostras foram então centrifugados a 1.500rpm por 15 segundos, e foram incubados novamente em termociclador a 50°C por 50 minutos, e 85°C por 5 minutos. Ao término do período de incubação as amostras foram resfriadas previamente em gelo e em seguida estocadas a -80°C.

3.5.4. Construção da Biblioteca e Sequenciamento Illumina Miseq®

O preparo da biblioteca assim como o sequenciamento por Illumina Miseq® foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP). Para o preparo das bibliotecas a serem sequenciadas foi utilizado o protocolo do kit TruSeq RNA Sample Preparation Illumina. A partir de 1µg (proveniente de um *pool* de todos os animais experimentais) de RNA total, o mRNA foi purificado com a utilização de esferas magnéticas e fragmentado por reações químicas com íons de metais. Após a fragmentação, foram sintetizadas a primeira fita e depois a segunda fita de cDNA. As extremidades 5'e 3' foram reparadas de forma a ficarem sem saliência (*blunt end*) e uma base adenina foi inserida na extremidade 3' (adenilação na extremidade 3'). Foram ligados os adaptadores e index, realizou-se a amplificação por PCR e a purificação da PCR. A quantificação do cDNA foi determinada por PCR quantitativo sendo utilizado KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems), o qual possui seis padrões de concentrações (entre 20 a 0,0002pM) e tamanho de fragmento conhecido (452pb). A partir dos valores de *Ct* dos padrões foram determinadas as concentrações das amostras por meio de uma regressão linear. A qualidade da biblioteca foi validada por 2100 Bioanalyzer antes de ser submetido ao sequenciamento. Foi feito um *pool* de 12 amostras com concentração final de 2nM de forma a se ter 12 amostras por *lane*. O *pool* de amostras foi desnaturado com NaOH (hidróxido de sódio) para facilitar a hibridização e amplificação durante a clusterização. A clusterização foi realizada no equipamento cBot-HS (Illumina – San Diego, EUA) utilizando o TruSeq PE Cluster Kit v3 (Illumina – San Diego, EUA). O protocolo seguido originou o sequenciamento de 300pb no formato *paired end*. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq 2000 – Illumina de forma a se obter o sequenciamento de mais de 300Gb por *flowcell* ou corrida.

3.5.5. Montagem *de novo* e anotação funcional

Os dados brutos provenientes do sequenciamento por Illumina Miseq[®] foram tratados (filtrados e aparados) utilizando software CLC Genomics Workbench versão 8.0.4 (CLC bio, Denmark). O processo de aparar utilizou como critério a remoção de sequências de baixa qualidade (PHRED < 20), curtas (inferiores a 200pb), adaptadores e de bases da cauda poly-A/T. Como não foi utilizado um genoma de referência, já que não existe nenhuma informação genômica para esta espécie disponível em banco de dados públicos, a estratégia utilizada para montar o transcriptoma foi a *de novo*. A montagem *de novo* dos *contigs*, da mesma forma, foi realizada utilizando software CLC Genomics Workbench. Os *contigs* foram anotados funcionalmente de acordo com processo biológico, função molecular e componente celular utilizando software Blast2GO (algoritmo BLASTX) com sistema nuvem, contra o banco público de proteínas de duas espécies de teleósteos comumente utilizadas, e que possuem o genoma descrito, *zebrafish* (*Danio rerio*) e *fugu* (*Takifugu rubripes*). Para ambas as espécies o alinhamento foi programado para ter *cut-off* do *e-value* de 1e-6.

3.5.6. PCR em tempo real

Com base em informações prévias da literatura foram selecionado nove genes alvos que participam ativamente das vias de lipogênese, síntese e β -oxidação de AGs. Utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) foram alinhadas as sequências dos genes de interesse, já descritas para outras espécies de teleósteos, contra o banco de dados local de *E. marginatus* (proveniente do transcriptoma) utilizando software CLC Main Workbench versão 7 (CLC bio, Denmark). Foram consideradas e selecionadas apenas as sequências que apresentaram similaridade superior a 85%, *e-value* igual ou

próximo a 0 e apresentaram anotação funcional quando comparado a outras espécies de teleósteos (Tabela 5). As sequências dos genes homólogos de outras espécies de teleósteos foram obtidas a partir da base pública do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Todos os *primers* utilizados para quantificar a expressão dos genes de interesse foram desenhados entre regiões regulatórias (5'UTR e 3'UTR) utilizando software PerlPrimer v1.1.17, e foram preparados para conter entre 20 a 22 pares de bases (pb) e possuir temperatura de anelamento de 59 a 61°C.

A eficiência do gene foi otimizada para estar entre 95 e 105% usando curva padrão com cinco diferentes diluições de um *pool* de amostras cDNA provenientes de todos os animais experimentais. A reação de PCR em tempo real foi realizada usando 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2µM de *primer* (*forward* e *reverse*) e um equivalente de 7.5ng cDNA. A reação foi incubada por 2 minutos à 50°C, 10 minutos a 95°C, seguido por quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 40 segundos a 60°C. Ao final destes ciclos foi realizada uma análise da *melt curve* para testar a especificidade da reação. A reação foi realizada em triplicata em termociclador Exicycler™96, através do *software* Exicycler Diagnosis3. Baseado em trabalho prévio com a mesma espécie (Garcia et al., 2013) o gene *EF1α* foi usado como uma referência endógena para a análise da expressão relativa dos genes analisados. A expressão gênica foi calculada de acordo com o valor de *Ct*, que foi transformado em log2 e normalizado por *EF1α*.

3.6. Forma de Análise dos Resultados

Foram analisadas as variáveis acima descritas (lipídios totais, perfil de ácidos graxos dos tecidos e expressão gênica) para os quatro grupos experimentais. Após a realização dos experimentos os grupos foram comparados estatisticamente entre si e ao longo do

experimento (plasma sanguíneo). Testes de normalidade e homogeneidade de variância foram aplicados resultando em uma distribuição normal dos dados, que levou a uma análise paramétrica, sendo os resultados comparados utilizando-se teste de Análise de Variância (*one-way* ANOVA), seguido do teste de Student-Newman-Keuls, (Zar, 1984). As análises foram conduzidas utilizando-se o *software* SigmaStat versão 3.

4. Resultados

4.1. Análises metabólicas

4.1.1. Análise do Perfil de Ácidos Graxos dos Óleos e Dietas Experimentais

Como esperado, o OL apresentou uma elevada concentração de 18:3n3, representando aproximadamente 56% dos AGs totais, o OP apresentou aproximadamente 22% de DHA e 8,5% de EPA, e no OC os AGs mais abundantes foram o 12:0 e 14:0 com 48% e 21%, respectivamente, não apresentando em sua composição AGs da série n3 (tabela 2). O perfil de AGs observado da sardinha apresentou uma elevada porcentagem de DHA (14,4%) e EPA (7,86%) em relação aos AGs totais, assim como observado para a dieta suplementada com OP com 15,96% e 13,02% de DHA e EPA, respectivamente. Na dieta suplementada com OL foi observado elevado percentual do 18:3n3 (9,87%) comparado aos outros grupos experimentais (entre 1 e 1,7%), e os SAT foram os mais abundantes na dieta suplementada com OC, devido principalmente a elevados percentuais do 12:0, 14:0 e 16:0 (19,42; 15,99 e 25,77% respectivamente) (Tabela 3).

4.1.2. Concentração Lipídica Total

As concentrações lipídicas hepática e gonadal não se alteraram entre os grupos, durante o período experimental (Fig. 5A e C). As concentrações lipídicas variaram entre 5 (grupo OL e OP) a aproximadamente 8mg/g nas gônadas (grupo S e OC), e no fígado variaram entre cerca de 33mg/g (grupo OP) a 60mg/g (grupo S). Já no tecido muscular, as fêmeas alimentadas com sardinha (S) apresentaram maior deposição lipídica ($P<0,05$) (aproximadamente 6mg/g) comparadas aos outros grupos experimentais (Fig. 5B).

No plasma sanguíneo das três coletas (inicial, intermediária e final) as concentrações lipídicas não variaram entre os grupos, nem no decorrer do experimento, mantendo-se em 3 a 4mg/mL de lipídios (Fig. 5D, E e F).

4.1.3. Ácidos Graxos

Os resultados da caracterização dos AGs foram subdivididos basicamente em três partes, as duas primeiras referentes aos triglicerídios (TG) e aos fosfolipídios (PL) dos tecidos hepático, muscular e gonadal, e uma última referente às análises dos AGs totais do plasma das três coletas.

4.1.3.1. Fosfolipídios

Os PL do fígado (Fig. 6, Tabela 6) foram observadas alterações significativas nos SAT, com maior percentual de 14:0 e 16:0 nos animais do grupo OC ($P<0,05$) em relação as fêmeas dos demais grupos experimentais, e inversamente uma menor concentração de 18:0 neste mesmo grupo ($P<0,05$) em relação aos animais do grupo OL, porém estas alterações encontradas não influenciaram na somatória total dos SAT. Foi possível notar uma alteração significativa ($P<0,05$) na somatória dos MUFA, devido a uma maior porcentagem destes AGs nos animais do grupo OC comparado aos outros grupos, sendo essas diferenças geradas principalmente por um maior percentual do 16:1 (comparado aos grupos OL e OP) e 18:1n9 (comparado aos animais dos demais grupos) ($P<0,05$). Nos PUFA foi observada maior porcentagem de DHA nos PL hepáticos das fêmeas do grupo OP comparada as do grupo OC, e as fêmeas alimentadas com OL apresentaram porcentagens mais elevadas de 18:2n6 do que os animais dos demais grupos experimentais ($P<0,05$) (Fig. 6, Tabela 6).

No tecido muscular, nos SAT dos PL (Fig. 7, Tabela 7) foi observada maior porcentagem do 18:0 nos animais do grupo OC comparado aos animais do grupo OP ($P<0,05$). Na série n3 dos PUFA foi verificado maior percentual do 18:3n3 nas fêmeas alimentadas com OL e OC, em relação as fêmeas dos outros grupos ($P<0,05$). Não foram encontradas variações nas concentrações dos PUFA da série n6 individualmente, porém quando somados estes AGs foram mais elevados nas fêmeas do grupo OC em relação as dos grupos S e OP, e também nas fêmeas alimentadas com OL comparadas as do grupo OP ($P<0,05$). Ainda em relação aos PUFA, foi possível verificar que os animais dos grupos S e OP apresentaram a razão n3/n6 mais elevada que os dos grupos OL e OC. Além disso, os animais alimentados com OL apresentaram essa razão mais elevada em relação ao grupo OC ($P<0,05$) (Fig. 7, Tabela 7).

Nos PL do tecido gonadal (Fig. 8, Tabela 8) as principais diferenças foram observadas nos MUFA, resultando em diferença significativa na somatória destes AGs ($P<0,05$). A porcentagem de 16:1 foi mais elevada nos animais do grupo OC comparado aos animais do grupo OL ($P<0,05$), os animais do grupo OC apresentaram ainda maior percentual de 18:1n9 em relação aos animais do grupo S ($P<0,05$). Por fim, o percentual de 18:1n7 foi mais elevado nas fêmeas do grupo S comparada as do grupo OL ($P<0,05$). Nos AGs da fração n3 dos PUFA não foi constatada nenhuma diferença significativa, porém apenas nos animais do grupo OL foi detectado o 18:3n3 (2,39%), não sendo este AG representativo no perfil dos PL dos ovários das fêmeas dos demais grupos. Na fração n6 uma única diferença foi observada, no 18:2n6, com porcentagem superior nas fêmeas dos grupos OL e OC comparados as do grupo S ($P<0,05$) (Fig. 8, Tabela 8).

4.1.3.2. Triglicerídeos

Nos TG hepáticos (Fig. 9, Tabela 9) foram observadas alterações significativas nos SAT, MUFA e PUFA. Nos SAT o 14:0 foi mais elevado nas fêmeas do grupo OC, comparado as fêmeas dos outros grupos experimentais ($P<0,05$). Os animais do grupo OC apresentaram ainda percentual mais elevado do 16:0 comparado aos do grupo OL ($P<0,05$). Foi verificado também que os animais do grupo OC apresentaram menor percentagem de 18:0 em relação aos animais do grupo OP ($P<0,05$). Essas alterações nos SAT influenciaram a somatória desta classe de AGs, com menor percentagem nos TG hepáticos dos animais do grupo OL comparado aos animais dos outros grupos experimentais, e maior percentual nos animais do grupo OC, do que nos animais dos grupos S e OL. Nos MUFA foi observado menor percentual do 16:1 nos TG hepáticos das fêmeas do grupo OL comparado às fêmeas dos grupos OC e S ($P<0,05$). Outro AG que apresentou diferença significativa nos MUFA foi o 18:1n7 com menor percentual nos animais do grupo OL comparado aos animais dos grupos S e OP ($P<0,05$). O percentual da somatória dos MUFA foi influenciado por estas variações e foi observada maior percentagem nas fêmeas do grupo OC, em relação as fêmeas do grupo OL ($P<0,05$). Na série n3 dos PUFA foi encontrada uma elevação na percentagem do 18:3n3 no fígado dos animais do grupo OL, representando 12,58% do total dos AGs, enquanto para os animais dos outros grupos este percentual manteve-se em baixos níveis, não alcançando 1% dos AGs totais ($P<0,05$). O 22:5n3 apresentou menor percentual nos animais do grupo OL, comparado aos animais dos grupos S e OP ($P<0,05$). A somatória dos PUFA da série n3, graças as alterações observadas nos AGs 18:3n3 e 20:5n3, apresentaram diferenças entre os grupos experimentais, com um maior percentual nos animais do grupo OL comparado aos animais do grupo OC ($P<0,05$).

Na série n6 a percentagem de 18:2n6 foi mais elevada nos animais do grupo OL com 7,12%, enquanto os animais dos outros grupos apresentaram aproximadamente 1,5% deste

AG em seus perfis ($P<0,05$). Esta diferença influenciou diretamente na somatória dos PUFA n6, já que os animais do grupo OL apresentaram percentual mais elevado destes substratos comparados aos dos outros grupos ($P<0,05$). As alterações observadas nos PUFA da série n3 e n6 refletiram em um maior percentual dos PUFA totais nas fêmeas do grupo OL em relação as fêmeas dos outros grupos experimentais ($P<0,05$) (Fig. 9, Tabela 9).

Nos TG do tecido muscular (Fig. 10, Tabela 10) foram encontradas diferenças significativas no 18:0 com maior percentual nos animais do grupo OP comparados aos animais dos outros grupos ($P<0,05$), e no 20:0 com maior porcentagem nas fêmeas do mesmo grupo mas apenas em relação às fêmeas do grupo OC ($P<0,05$). Todos os MUFA apresentaram alterações entre os grupos ($P<0,05$). Os animais dos grupos S e OC apresentaram maior percentual do 16:1 e 18:1n9 comparados aos do grupo OP ($P<0,05$), e foi verificado um menor percentual de 18:1n7 nos animais do grupo OP em relação aos animais do grupo S ($P<0,05$). Foi verificado ainda uma menor porcentagem do 20:1n9 nas fêmeas do grupo OP comparados ao percentual encontrado para as fêmeas dos outros grupos experimentais ($P<0,05$). Essas flutuações nos MUFA influenciaram em alterações significativas na somatória destes AGs, sendo que os animais do grupo OP apresentaram menor porcentagem destes AGs nos TG musculares, do que os animais dos grupos S e OC ($P<0,05$). Nos PUFA n3 os animais do grupo OL novamente apresentaram uma porcentagem mais elevada do 18:3n3, representado por 4,22%, enquanto para os outros grupos o percentual deste não chegou a 1% do total dos AGs ($P<0,05$). Foi observada ainda uma maior porcentagem do 18:4n3 nos animais do grupo OC comparados aos do grupo S. Outra diferença observada nos PUFA n3 foi um maior percentual do 22:5n3 dos animais dos grupos S, OL e OC em relação aos animais do grupo OP ($P<0,05$). O DHA também foi diferente estatisticamente entre os grupos, com maior porcentagem (21,71%)

nos animais do grupo OP, do que nos animais dos demais grupos (11 a 13% dos AGs totais) ($P<0,05$). Mesmo com todas estas diferenças encontradas nos AGs da série n3, na somatória final não foi observada nenhuma alteração significativa entre os grupos. Assim como no tecido hepático, foi observada maior porcentagem do 18:2n6 nos animais do grupo OL comparado aos animais dos outros grupos experimentais ($P<0,05$). Outro AG que sofreu variações foi o 20:4n6, com maior percentual nas fêmeas do grupo OP em relação as fêmeas dos outros grupos ($P<0,05$). Para o 22:2n6 foi notada uma alteração significativa, com maior percentual deste AG nas fêmeas do grupo OL em relação as fêmeas dos outros grupos ($P<0,05$). Essas alterações nas porcentagens dos AGs da série n6 influenciaram na somatória final dos PUFA n6, resultando em um maior percentual destes AGs nas fêmeas dos grupos OL e OP em relação às fêmeas do grupo S ($P<0,05$). As alterações observadas nos PUFA influenciaram as diferenças na razão n3/n6, que foi mais elevada nas fêmeas do grupo S comparando-as com as dos outros grupos experimentais ($P<0,05$) (Fig. 10, Tabela 10).

Nas gônadas, assim como no músculo, os SAT também não apresentaram alterações significativas nos TG (Fig. 11, Tabela 11). Foi observada uma redução na porcentagem de 16:1, nos animais do grupo OL em relação aos animais do grupo S ($P<0,05$). Esta alteração resultou em uma somatória de MUFA maior nos animais do grupo S em relação aos animais dos grupos OL e OP ($P<0,05$). Nos PUFA n3 novamente foi observado um percentual elevado do 18:3n3 nos animais do grupo OL ($P<0,05$) comparado aos animais dos demais grupos, o 20:4n3 foi mais elevado nos animais do grupo OP em relação aos animais dos outros grupos experimentais ($P<0,05$), e a porcentagem de 22:5n3 foi mais elevada nos animais do grupo S em comparação aos animais dos grupos OL e OP ($P<0,05$). Na série n6 dos PUFA foi encontrada apenas uma diferença significativa, relacionada a um maior percentual do 20:2n6 nos animais do grupo OP em relação aos

animais dos grupos S e OC ($P<0,05$). Na somatória dos PUFA n6, os animais do grupo OL apresentaram um percentual mais elevado destes substratos comparado aos animais do grupo S ($P<0,05$), sendo esta mesma diferença observada na somatória dos PUFA totais ($P<0,05$) (Fig. 11, Tabela 11).

4.1.3.3. Ácidos Graxos Totais do Plasma

Para a realização das análises do perfil de AGs do plasma das três coletas, diferentemente dos tecidos não foi feita a separação entre TG e PL, já que os AGs presentes no plasma estão, em sua maioria, em forma livre (não esterificados).

Na coleta inicial não foi verificada nenhuma diferença significativa no plasma dos animais dos diferentes grupos experimentais (Fig. 12 e Tabela 12). Na coleta intermediária foram registradas diferenças no 14:0, que foi mais elevado nos animais OC em relação aos animais dos demais grupos ($P<0,05$). Na série n3 foi observado maior percentual de 18:3n3 nos animais do grupo OL ($P<0,05$) em relação aos animais dos demais grupos experimentais, e o percentual do 20:5n3 foi mais elevado nos animais do grupo OP em relação aos animais dos outros grupos experimentais. Já na série n6, a concentração de 18:2n6 foi superior nos animais do grupo OL, comparado aos animais do grupo OP ($P<0,05$) (Fig. 13, tabela 13). Na coleta final o perfil das alterações no plasma foi idêntico ao observado na coleta intermediária, com exceção das alterações descritas para 20:5n3 (Fig. 14, Tabela 14).

4.2. Análise do Transcriptoma e da Expressão dos Genes do Metabolismo

Lipídico

4.2.1. Análise dos Dados Brutos e da Montagem *de novo*

Os dados brutos gerados pelo sequenciamento do tecido hepático de *E. marginatus* foram depositados no SRA (*Sequence Read Archive*) do Genbank sobre o número de acesso SRX1452893. O sequenciamento da biblioteca normalizada de cDNA do tecido hepático foi obtida em sequências *paired end*, a partir de tecnologia Illumina Miseq®. Após pareamento das sequências foram gerados 52.022.852 *reads* (10,45Gb) com comprimento médio de 200,9pb (Tabela 15). A maioria dos *reads* apresentaram alta qualidade, fato evidenciado pelo alto PHRED *score* (99,88% >20) (Fig. 15). Depois dos processos de *apara* (*trimming*), dado pela retirada de sequências curtas, ambíguas, e de baixa qualidade, 51.931.408 *reads* (9,93Gb), com média de 191,2pb, foram mantidos e utilizados na montagem *de novo* (Fig. 16, Tabela 15). A montagem *de novo* do transcriptoma, utilizando o software CLC Genomics Workbench, retornou 92.887 *contigs* com média de comprimento de 646pb, e N50 de 1.029pb (Fig. 17, Tabela 15).

4.2.2. Anotação Funcional

Foi observado maior número de anotações das sequências de *E. marginatus* contra o banco de proteínas de *zebrafish* (21.682 ou 23.3% do total das sequências), do que contra o de banco de proteínas de *fugu* (13.334 ou 14.3% total das sequências) (Fig. 18). O maior número de anotações, contra ambas espécies, foram relacionadas com processos biológicos (51,2% e 45,6% para *zebrafish* e *fugu*, respectivamente), seguido por função molecular (30,6% e 34,3 para *zebrafish* e *fugu*, respectivamente) e componente celular (18,1% e 20% para *zebrafish* e *fugu*, respectivamente) (Fig. 19).

Os resultados gerados pelo software Blast2GO mostraram ainda que os transcritos relacionados com processos biológicos mais abundantes foram os processos celulares (14.923 e 8.593 sequências anotadas contra *zebrafish* e *fugu*, respectivamente), seguido por

processos de organismo-simples (14.315 e 7.403 sequências anotadas contra *zebrafish* e *fugu* respectivamente). As funções moleculares mais representativas foram, transporte (11.709 e 6.976 sequências anotadas contra *zebrafish* e *fugu*, respectivamente), seguido por atividade catalítica (8.593 e 5.501 anotações contra *zebrafish* e *fugu*, respectivamente). Por fim as anotações relacionadas com os componentes celulares mais abundantes foram, célula (11.201 e 6.059 anotações contra *zebrafish* e *fugu*, respectivamente), seguido por região intracelular (10.076 e 4.641 anotações contra *zebrafish* e *fugu*, respectivamente) (Fig. 20).

4.2.3. Expressão dos Genes do Metabolismo Lipídico

Foram observadas diversas alterações significativas na expressão dos genes relacionados com a lipogênese, síntese e β -oxidação de AGs do tecido hepático de *E. marginatus* em relação às diferentes dietas (Fig. 21). Foi verificada maior expressão do gene *Acetyl CoA Carboxylase* (ACC) nas fêmeas provenientes do grupo OC comparado as do grupo OP ($P < 0,05$). Outra diferença significativa foi observada na expressão do gene *Stearoyl CoA Desaturase* (SCD) o qual os animais do grupo S apresentaram maior expressão que os do grupo OC ($P < 0,05$). Não foram observadas alterações significativas na expressão dos genes *Fatty Acid Synthase* (FAS) e *Elongation of very long chain fatty acids* (ELOVL5) (Fig. 21). Com relação aos genes que atuam na via de β -oxidação foram encontradas alterações significativas na *Acyl CoA dehydrogenase very long chain* (ACADVL), com elevada expressão nas fêmeas do grupo S com relação as dos outros grupos experimentais ($P < 0,05$), e dos grupos OL e OP em relação as fêmeas do grupo OC ($P < 0,05$), e para o gene *Acyl-CoA Oxidase* (ACOX), foi observada menor expressão nos animais do grupo S com relação aos animais dos outros grupos experimentais ($P < 0,05$).

5. *Discussão*

5.1. Análises Metabólicas

5.1.1. Análise do Perfil de Ácidos Graxos dos Óleos Experimentais e Dietas

O perfil de AGs nos óleos utilizados esteve dentro do esperado e muito similares aos descritos por Wu e Chen (2012). Gunstone (2010) analisou diversos óleos vegetais (OV) ricos em 18:3n3 e concluiu que o óleo de linhaça (OL) foi o que apresentou maior porcentagem deste AG (aproximadamente 50% dos AGs totais), comparado a outros óleos. Glencross (2009) encontrou exatos 56% de 18:3n3 no OL, e estes resultados foram muito próximos aos valores observados neste trabalho (55,97%).

Segundo Ng e Gibon (2010), o óleo de coco (OC) geralmente é composto por até 60% de AGs saturados, sendo que deste percentual 45 a 50% pode ser constituído pelo 12:0. A porcentagem dos SAT encontrados na análise deste óleo foi ainda maior, com 87% dos AGs totais, porém a porcentagem de 12:0 foi basicamente a mesma encontrada pelos autores (48,56%).

A porcentagem de DHA no perfil do óleo de peixe (OP) utilizado neste trabalho (21,7%) foi superior ao encontrado por outros autores. Ackman (1976) encontrou para óleo de anchova 9 – 12,7%; Ustün et al., (1997) em estudos com óleo de *herring* relataram uma porcentagem de 2,0 – 7,8%; Gunstone et al., (1994) analisando o perfil do óleo de *capelin* encontraram de 3,7 – 6,0% e Hertrampf e Piedad-Pascual (2000) em experimentos com óleo de *menhaden* encontraram de 4,6 – 13,8% de DHA no perfil total dos AGs. O elevado percentual de DHA deste óleo foi importante para observar o efeito da incorporação na mobilização dos AGs entre os tecidos, já que a dieta base também apresentou uma porcentagem elevada (14,40%) deste AG. Desta forma, a

distinção da influência do DHA da dieta base (sardinha), comparada com a dieta OP foi mais clara. De uma forma geral, as dietas experimentais (homogeneizado da sardinha esviscerada e decaptada com os óleos experimentais) refletiram o mesmo perfil dos ingredientes, com elevado percentual do 18:3n3 na dieta do grupo OL, 12:0 e 14:0 na dieta OC e dos PUFA n3 (principalmente DHA e EPA) na dieta OP. Como esperado, foi observado um gradiente de porcentagens de importantes AGs, como por exemplo o DHA, nas dietas experimentais, sendo observado o total de 5,27% na dieta do grupo OC, seguido por 8,62% na do grupo OL, e 15,96% na dieta do grupo OP. Este mesmo padrão foi observado para o EPA com 3,07% na dieta OC, seguido por 4,70% na OL, e por fim 13,02% na dieta do grupo OP.

5.1.2. Concentração Lipídica Total

As concentrações lipídicas observadas no tecido hepático de *E. marginatus*, principalmente dos grupos S, OL e OC (entre 50 a 60mg/g) foram superiores aos resultados observados para *Salmo gairdnerii* (Robinson e Mead, 1973; Sheridan et al., 1983), *Oncorhynchus kisutch* (Sheridan, 1986) e *Psetta maxima* (Regost et al., 2003), que apresentaram concentrações aproximadas de 30mg/g de lipídios para o mesmo tecido. Salvo algumas excessões, para a maioria das espécies, o fígado pode ser considerado o principal órgão de armazenamento e oxidação lipídica, principalmente em animais de hábitos sedentários, sendo este o caso de *E. marginatus*. Diferente ao observado para esta espécie, geralmente teleósteos de hábitos mais ativos (natação constante) utilizam como principal local de armazenamento lipídico o tecido muscular, já que necessitam de rápida oxidação e disponibilidade energética para atividades locomotoras (Sheridan, 1994; Tocher, 2003; Torstensen e Tocher 2010). Esta informação pode justificar as altas concentrações lipídicas observadas no tecido

hepático comparado ao tecido muscular, que apresentou concentração máxima de 5,8 mg/g (grupo S). Estudos realizados com *Salmo salar* reportaram que mesmo aumentando a concentração lipídica da dieta de 38% para 47%, esta não influenciou nos níveis de lipídios totais musculares, que permaneceram em 16% para os respectivos tratamentos (Bell et al. 2003). Em outro estudo realizado com salmonídeos, Ruyter et al. (2006) observaram que a deposição lipídica nos tecidos foi diretamente influenciada pela composição de AGs da dieta. De uma forma geral, sabe-se que o aumento da concentração de DHA e EPA na dieta, algumas vezes aliado a outras variáveis como temperatura da água, pode acarretar em um desequilíbrio no metabolismo resultando em um aumento na concentração destes substratos em tecidos lipogênicos como músculo e fígado (Torstensen e Tocher, 2010). Este fato pode justificar a baixa concentração lipídica muscular encontrada principalmente nos animais do grupo OP.

As gônadas também podem ser consideradas locais de armazenamento lipídico, porém as concentrações neste tecido variam de acordo com o estado reprodutivo do animal (Sheridan et al., 1994). As baixas concentrações lipídicas das gônadas, comparadas ao tecido hepático podem sugerir baixa mobilização deste substrato, considerando-se que os ovários não eram vitelogênicos (Marino et al., 2002). Assim como nas gônadas, as análises lipídicas quantitativas do plasma das três coletas não apresentaram alterações significativas e mantiveram-se em concentrações aproximadas de 3 a 4 mg/ml durante o período experimental, e entre os grupos experimentais. Alterações sazonais dos lipídios do plasma foram reportados para outras espécies de teleósteos como *Salmo trutta* (Navarro et al., 1991), *Paraphrys vetulus* (Johnson e Casillas 1991), *Morone saxatilis* (Lund et al., 2000) e *Salmo salar* (Jordal et al., 2007), e esta variação se deu principalmente devido ao estágio reprodutivo dos animais. As concentrações lipídicas no plasma e gônadas, observadas para *E. marginatus*, não se

alteraram em relação ao tempo devido possivelmente à ausência da vitelogênese causada possivelmente pelo processo de confinamento (Marino et al., 2002).

5.1.3. Ácidos graxos

Como dito anteriormente, as duas principais classes lipídicas são os triglicerídios (TG), que são principalmente utilizados para geração de energia metabólica para processos biológicos como, metabolismo celular, atividades reprodutivas e migrações, e os fosfolipídios (PL), que são, em geral, utilizados como componentes das membranas biológicas, promovendo a estruturação celular, transporte e modulando a fluidez destas membranas (Sargent et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Glencross, 2009; Torstensen e Tocher, 2010). Normalmente a composição lipídica dos TG é a que mais sofre influência da composição das dietas, uma vez que os óleos experimentais se apresentam todos na forma de TG (Glencross, 2009; Turchini et al., 2009; Torstensen e Tocher, 2010). Além da composição da dieta, a magnitude das alterações irá também depender da relativa proporção de TG e PL encontrada no tecido em questão. Os resultados obtidos neste estudos foram similares ao observados para outras espécies de teleósteos (Bell et al. 2001, 2003; Torstensen et al., 2004), com alterações principalmente nos TG, enquanto os PL, salvo algumas exceções, mantiveram o mesmo perfil entre os diferentes grupos experimentais.

5.1.3.1. Fosfolipídios

De uma forma geral, para a maioria dos vertebrados, as membranas biológicas são constituídas em grande parte pelos AGs 16:0, 18:1n9, EPA e DHA, e nos PL de todos os tecidos de *E. marginatus* foram observadas altos percentuais destes AGs (Sargent et al., 2002). Foi observado maior percentual de MUFA hepático e gonadal nos animais do grupo OC, mesmo estes recebendo menor percentual destes AGs na dieta. Ao que

parece este processo pode não estar relacionado com a síntese de MUFA a partir de SAT (mesmo sendo observado elevado percentual deste AG na dieta do grupo OC), já que a expressão de SCD foi inferior nos animais deste grupo comparado aos animais do grupo S. Estudos relacionados com β -oxidação de AGs em peixes sugerem a existência de preferência de substratos, sendo os SAT primeiramente oxidados, seguidos por MUFA e por fim PUFA (Kiessling e Kiessling, 1993; Henderson, 1996). Os SAT, quando presentes em grandes quantidades nas dietas, como na dieta OC, podem influenciar na composição e conseqüentemente na fluidez das membranas biológicas (a fluidez dos fosfoglicerídios é diretamente influenciada pela razão SAT/MUFA), sendo assim, em excesso, estes AGs são em grande parte depositados na forma de TG nos tecidos de reserva ou prontamente oxidados para gerar energia metabólica (Bell et al., 2003; Sargent et al., 2002). O oposto é observado quando ofertamos em menor quantidade alguma outra classe de AGs, isso quer dizer se incluirmos pouco MUFA ou PUFA por exemplo nas dietas, maior será a retenção destas classes pelo animal (Stubhaug et al., 2007; Glencross, 2009).

O 18:1n9 pode ser considerado um importante AG na composição das membranas biológicas, pois em associação com o DHA forma uma espécie molecular de fosfoglicerídio, e este AG é constantemente retido pelos organismos quando inseridos em menor quantidade na dieta (Sargent et al., 2002). Isso pode explicar a porcentagem elevada de MUFA nos tecidos hepático e gonadal dos animais do grupo OC, influenciada principalmente pela retenção seletiva do 18:1n9.

Nos PL do fígado os animais do grupo OP apresentaram maior porcentagem de DHA, mas apenas quando comparados aos animais do grupo OC, o que pode ser justificado pelo maior percentual de DHA na dieta, no entanto, essa alteração não ocorre em relação aos animais do grupo alimentado apenas com sardinha (S). Já a porcentagem

elevada de 18:3n3 na dieta OL refletiu na composição de AGs dos PL de todos os tecidos. De acordo com Regost et al., (2003) os percentuais de PUFA n3 dos PL do tecido hepático de *Psetta maxima* alimentados com uma dieta constituída por OP, foram mais elevados comparando-se aos animais com dieta suplementada com óleos vegetais (OV), resultados similares foram encontrados para *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* (Izquierdo et al., 2003). Os TG dos tecidos retrataram mais a composição da dieta, no entanto quando alguns AGs, principalmente os PUFA da série n3, são incorporado em grandes quantidades na dieta pode ocorrer uma maior deposição deste substrato nas membranas celulares, alterando assim sua conformação (Brodtkorb et al., 1997).

Nos PL do músculo os resultados encontrados para os PUFA apresentam um perfil contraditório, com maior porcentagem de PUFA n6 nos animais dos grupos OL e OC (sendo que o OL apresentou maior percentual destes AGs na dieta e o grupo OC menor percentual), comparados principalmente ao grupo OP. Nos ovários, a porcentagem de 18:2n6 também foi mais elevada nas fêmeas do grupo OC em relação aquelas alimentadas apenas com sardinha. Com isso pode-se sugerir um equilíbrio entre os processos de retenção seletiva de certos AGs, quando estes forem incluídos em pouca quantidade na dieta, ou oxidação quando incluídos em excesso. Além da composição da dieta outros fatores podem influenciar diretamente na composição lipídica das membranas celulares como, digestibilidade e seletividade dependendo do tipo de tecido, sendo assim a preservação destes AGs pode variar de acordo com a necessidade deste substrato pelo animal, ou simplesmente ser depositado pela influência exercida pela dieta (Torstensen e Tocher, 2010).

5.1.3.2. Triglicerídios

Como dito anteriormente os TG são os AGs que mais retratam a influência da dieta, já que os PL são modulados principalmente por fatores ambientais como a temperatura (Brodtkorb et al., 1997). No geral este padrão ficou claro nos resultados obtidos para *E. marginatus*, salvo algumas exceções.

Uma importante influência da dieta foi observada na porcentagem dos SAT. Diferente ao observado em estudos prévios, realizados com *Epinephelus coioides* (Lin et al., 2007) e *Salmo salar* (Bell et al., 2002), nos quais os autores encontraram um reflexo direto da dieta nos SAT do tecido hepático, foi observado uma redução acentuada na porcentagem desta classe de AGs, principalmente nos animais do grupo OC (37,54%), comparado à porcentagem da dieta (68,83%). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados para juvenis de *Epinephelus malabaricus* alimentados com dietas ricas em SAT e MUFA (Wu et al., 2002). Nos animais dos grupos S, OL e OP foi observado também uma redução, no entanto inferior ao observado para os animais do grupo OC. Estes resultados sugerem um alto potencial oxidativo desta classe (SAT), principalmente para o grupo OC, dado pelo excesso destes AGs na dieta. Aparentemente os animais deste grupo oxidaram preferencialmente os AGs 12:0, já que este não foi observado no tecido, e o 18:0 sendo observada uma redução no percentual deste AG nos animais do grupo OC, comparado aos do grupo OP. Como dito anteriormente, sabe-se, que para a maioria dos organismos existe uma ordem preferencial de oxidação de AGs, que é maior para SAT, seguido por MUFA e por fim PUFA (Torstensen et al., 2000, 2009; Turchini et al. 2009, Glencross, 2009). Dentre os SAT destaca-se o 16:0 como sendo o principal AG oxidado em mamíferos e peixes, no entanto quando outros SAT são ofertados em excesso na dieta, como no caso do 12:0 no grupo OC, ocorre um mecanismo seletivo ao qual o animal preserva os menos ofertados e oxida os mais representativos (Torstensen et al., 2000, 2009). Os resultados

observados no percentual dos MUFA hepáticos, corroboram com esta hipótese. Foi observado que os animais do grupo OL e OP, que receberam maiores percentuais destes AGs na dieta (21,25% e 19,08% respectivamente), inversamente apresentaram menores percentuais desta classe no tecido hepático (22,20% e 24,06% respectivamente). O oposto foi observado nos animais do grupo OC, que receberam menor quantidade de MUFA na dieta (14,73%) e apresentaram maior percentual destes AGs no tecido (31,04%). Da mesma forma, Bell et al., (2002) relataram que *Salmo salar* alimentados com dietas contendo de 27,1 a 47,1% de SAT apresentaram menor deposição e baixa variação (de 25,9 até 29,2% respectivamente) destes AGs nos tecidos. Os resultados observados para estas duas classes de AGs (SAT e MUFA) sugerem um potencial auto-regulatório (principalmente modulado pela concentração destes substratos nas dietas), em processos de deposição e β -oxidação de AGs, sendo este mesmo padrão observado em estudos realizados com *Epinephelus malabaricus* (Wu et al., 2002).

Foram verificadas algumas alterações significativas nos AGs da série n3 no tecido hepático. Torstensen et al., (2004), em estudos realizados com *Salmo salar* encontraram alta taxa de oxidação do 18:3n3, quando este foi incorporado em excesso na dieta, no entanto a alta porcentagem de 18:3n3 presente na dieta OL (9,87%), refletiu diretamente no tecido hepático dos animais (12,58%), sugerindo um processo de retenção deste AG. Segundo Izquierdo et al., (2003) de forma geral, os AGs 18:3n3 e 18:2n6 são comumente acumulados nos triglicerídeos hepáticos em peixes, normalmente nas mesmas proporções dos níveis incorporados nas dietas. Foi observada também uma elevação no percentual do 22:5n3 no tecido hepático de todos os grupos experimentais, comparado as respectivas dietas. Este aumento pode estar relacionado com a possível elongação de EPA para este AG, mediado pela elevada expressão do gene ELOVL5, observada nos animais de todos os grupos experimentais. Em estudos realizados com

Sparus aurata (Izquierdo, et al., 2003), *Dicentrarchus labrax* (Izquierdo, et al., 2003), e *Epinephelus malabaricus* (Wu et al., 2012) os autores observaram a presença de PUFA intermediários, dentre eles o 22:5n3, nos tecidos musculares e hepáticos, mesmo não sendo observado este AG na composição das dietas experimentais, e da mesma forma estas alterações foram atribuídas à possível elongação de EPA para 22:5n3. Diferente ao observado para o 18:3n3, o alto nível de DHA presente na dieta OP não refletiu na composição de AGs do fígado de *E. marginatus*.

Nos TG da musculatura foram notadas diversas alterações significativas diretamente relacionadas ao perfil das dietas, e similarmente ao tecido hepático, relacionadas a seleção de AGs para processos de deposição e β -oxidação. As correlações entre as quantidades de AGs específicos nas dietas, e as concentrações correspondentes no tecido muscular nem sempre são óbvias (Kennish et al. 1992; Turchini et al., 2003). No entanto, o mesmo perfil de regulação de SAT e MUFA observado no tecido hepático, foi observado também para o tecido muscular, com diferenças pontuais em alguns AGs. Os resultados observados para os SAT e MUFA do tecido muscular foram muito semelhantes aos resultados obtidos em estudos realizados com *Oncorhynchus mykiss* (Greene e Selivonchick, 1990), *Epinephelus malabaricus* (Wu et al., 2002) e *Maccullochella peelii peelii* (Turchini et al., 2003), no qual as composições (SAT e MUFA) dos tecidos não refletiram diretamente as das dietas.

Não foram observadas alterações significativas no percentual de SAT totais entre os grupos, mesmo a dieta OC apresentando um elevado percentual destes AGs em sua composição (68,8%). Da mesma forma ao observado para o tecido hepático as concentrações de SAT não apresentaram a mesma variação observada na dieta, e este fato reforça a hipótese destes animais se auto-regularem para esta classe de AGs, seja

pela oxidação dado pelo excesso, ou retenção dado pela falta deste na composição da dieta (Torstensen e Tocher, 2010).

A alteração observada no percentual de MUFA total foi muito semelhante ao observado no tecido hepático, com maior percentual destes AGs nos animais dos grupos que receberam menor percentual dos mesmos em suas dietas (S e OC), e o inverso foi observado para os outros dois grupos (OL e OP). No entanto, diferente ao observado no tecido hepático as variações nos MUFA totais foram diretamente influenciadas pelo AG 18:1n9. De acordo com Turchini e Francis (2009) este AG é comumente oxidado no tecido muscular de teleósteos, possivelmente para uma rápida conversão energética. Em *E. marginatus* foi observado o oposto, ou seja a retenção deste AG na musculatura dos animais de todos os grupos experimentais. Este fato reforça a hipótese de que estes animais utilizam principalmente os SAT para gerar energia via β -oxidação.

A elevada porcentagem de DHA da dieta OP refletiu diretamente em uma elevação deste AG nos TG do tecido muscular nos animais deste grupo. A incorporação de AGs nos tecidos de peixes é modulada pela influência de vários processos metabólicos como, incorporação preferencial, β -oxidação, atividade lipogênica, dentre outros (Sargent et al., 2002; Robbin et al., 2003) e diferentes AGs, assim como diferentes classes de AGs são depositadas no tecido muscular em diferentes níveis. Em estudos realizados em espécie congênica, *Epinephelus coioides* (Lin et al., 2007) foram encontrados resultados divergentes aos observados no tecido muscular de *E. marginatus*. Os autores relataram que os níveis deste AG não se alteraram no tecido muscular e hepático em detrimento a diferentes concentrações de DHA nas dietas. No entanto para diversas espécies de teleósteos marinhos, principalmente carnívoros, o DHA presente nas dietas foi diretamente depositado e preservado nos TG da musculatura esquelética. Izquierdo et al. (2003) em estudo realizado com *Sparus aurata*

e *Dicentrarchus labrax* observaram que os animais, tanto os alimentados com dietas constituídas de OP, como de OV, oxidaram EPA para geração de energia, e retiveram preferencialmente DHA na musculatura, e estes resultados foram muito semelhantes ao observado para o *E. marginatus*. A oxidação seletiva de SAT, MUFA, e em muitos casos de EPA na musculatura pode ser considerado o principal fator da retenção do DHA (Sargent et al., 2002). As variações observadas nos PUFA da série n3 e n6, principalmente modulado pelos níveis de DHA, 18:2n6 e ARA, alteraram a razão n3/n6 entre os grupos. Segundo Simopoulos (1989) a razão ideal destes PUFA no filé de pescado, para nutrição humana, deve estar acima de 1. Os valores encontrados para esta razão no tecido muscular da garoupa estão acima deste valor, mesmo considerando os animais suplementados com OC, evidenciando o alto valor nutricional da espécie para o consumo.

Apesar de não ser observada mobilização evidente de lipídios para as gônadas, e não ser detectado nenhum aumento no diâmetro oocitário (dados não apresentados) ao longo do experimento, a suplementação com diferentes fontes de óleo resultou em interessantes alterações nos TG dos ovários. A suplementação da dieta com OL e OP proporcionou uma redução na porcentagem de MUFA nos ovários quando comparados com os animais alimentados com sardinha (S). Novamente esta alteração justifica-se pela possível existência de uma ordem preferencial de oxidação de AGs, que em geral é controlada pela abundância deste substrato na dieta, sendo este o caso das dietas compostas por OL e OP (21,25% e 19,08% respectivamente dos MUFA) (Turchini et al., 2009). Além disso, os animais do grupo OL apresentaram maior porcentagem de 18:3n3 e assim, semelhante a outros tecidos, esta deposição foi influenciada pelo percentual deste AG na dieta. O mesmo se aplica a tendência a um maior percentual de 18:2n6 do grupo OL, resultando na maior deposição de PUFA n6 neste grupo

comparado ao grupo S. O elevado percentual do 18:3n3 e do 18:2n6 resultou em maior porcentagem de PUFA totais nos ovários das fêmeas do grupo OL, comparadas as fêmeas do grupo S, e como relatado por diversos autores essas alterações foram reflexo direto da composição das dietas experimentais (Stéphan et al., 1995; Hemre et al., 1997; Bell et al., 2002; Glencross et al., 2003; Izquierdo et al., 2003).

5.1.3.3. Ácidos Graxos Totais do Plasma

Como esperado, na coleta inicial não foi observada nenhuma alteração significativa no perfil de AGs do plasma, já que os animais divididos nos diferentes grupos experimentais foram mantidos sobre as mesmas condições de cultivo, e sob o mesmo regime alimentar durante o período de aclimação. Já nas coletas intermediária e final, foram encontradas alterações que foram claramente influenciadas pela composição das dietas. Izquierdo et al., (2003) apontam para o fato de que a composição dos lipídios plasmáticos é diretamente afetada pela suplementação de OP na dieta, principalmente relacionado a um maior percentual de 18:3n3 e 18:2n6. Estas características foram encontradas no perfil plasmático de *E. marginatus*, que apresentou maior porcentagem de 14:0 no grupo OC e maior porcentagem de 18:3n3 e 18:2n6 nos animais do grupo OL nas coletas intermediária e final. Um fato relevante a ser discutido foi que a porcentagem de DHA, que é o AG mais abundante no OP, não se alterou no plasma em nenhum momento ao longo do experimento. Apenas na coleta intermediária, os animais do grupo OP apresentaram maior porcentagem de EPA, segundo AG da série n3 mais representativo no OP, mas que não foi depositado de forma diferencial nos tecidos de reserva de *E. marginatus*. Estudos realizados com outras espécies de teleósteos apontam para um aumento na porcentagem plasmática de DHA em animais alimentados com dietas suplementadas com OP (Waagbo et al., 1993; Farndale et al.,

1999; Caballero, 2002). Pelos resultados apresentados nos TG da musculatura, esta maior porcentagem de DHA presente no OP foi depositada de forma diferenciada apenas neste tecido, já que não foram verificadas alterações significativas para este substrato no fígado e gônadas, e na análise do plasma das coletas intermediárias e final.

5.2. Análise do Transcriptoma e Expressão dos Genes Relacionados com o Metabolismo Lipídico

5.2.1. Análise do Transcriptoma

Os resultados obtidos a partir do sequenciamento do tecido hepático de *E. marginatus* representam a primeira caracterização de transcriptoma para esta espécie. A utilização do transcriptoma no estudo de expressão gênica do tecido hepático de *E. marginatus* foi considerada uma ferramenta rápida, eficiente e em geral de baixo custo (comparado a utilização de primers degenerados), principalmente para esta espécie, já que não existe uma sequência de referência em banco de dados públicos. Nos últimos anos montagens *de novo* de transcriptomas de diversos tecidos, e espécies de teleósteos tem sido frequentemente realizadas, e as sequências obtidas disponibilizadas em bancos públicos como do NCBI (Coppe et al., 2010; Liu et al., 2011; Fraser et al., 2011; Calduch-Giner et al., 2013). O depósito dos dados em bancos públicos, sejam eles brutos, ou de sequências gênicas já definidas, é fundamental na colaboração e continuidade de estudos moleculares com a espécie alvo, auxiliando em pesquisas futuras, principalmente relacionada com expressão gênica. Mesmo sendo uma espécie de ampla distribuição, ameaçada e de alto valor agregado, pouca ou praticamente nenhuma informação relacionada a estudos moleculares foi encontrada na literatura, sendo que este trabalho representa o primeiro transcriptoma analisado de *E. marginatus*.

Foi observado um elevado número de *contigs* formados após a montagem *de novo*, comparado ao sequenciamento dos transcritos de outras espécies de teleósteos como, *Genypterus chilensis* (Aedo et al., 2015), *Gadus morhua* (Malachowicz et al., 2015) e *Engraulis encrasicolus* (Eldem et al., 2015). O maior número de anotações funcionais em alinhamento contra banco de proteínas de *zebrafish* (*Danio rerio*), comparado ao de *fugu* (*Takifugu rubripes*), está relacionado possivelmente ao maior número de sequências depositadas no NCBI para *zebrafish*, e isso se dá por esta ser uma espécie considerada modelo. Os genes de interesse, encontrados nas sequências de *E. marginatus* (BLAST), apresentaram alto grau de similaridade comparados a outras espécies de teleósteis (acima de 85%), e foram considerados adequados para a realização das análises de PCR em tempo real.

5.2.2. Expressão dos Genes do Metabolismo Lipídico

A incorporação de OV em dietas para peixes pode exercer efeitos agonísticos e antagonísticos em diferentes vias do metabolismo lipídico, e estes efeitos irão depender da espécie, tipo de tecido, idade e principalmente da composição da dieta (Tocher, 2003). De forma geral a composição da dieta influenciou diretamente na expressão dos genes relacionados com a síntese e oxidação de AGs.

A carboxilação de acetil-CoA para malonil-CoA, realizada pela enzima *acetyl-CoA carboxylase* (ACC) é considerado o passo chave para lipogênese na maioria dos organismos vivos (Hillgartner et al., 1995; Kim, 1997). Malonil-CoA é a molécula doadora de dois carbonos para a síntese inicial de AGs (*de novo*), e adicionalmente à sua importante função na lipogênese, ela atua também em processos de β -oxidação mitocondrial, inibindo diretamente a expressão da *carnitina palmitoyltransferase 1* (CPT1) (McGarry et al., 1977; Wakil, et al., 1983; Iritani, 1984; Torstensen et al., 2009;

Brolinson, 2009). Até o momento poucos estudos foram realizados com peixes, no entanto para mamíferos a expressão de ACC pode ser diretamente modulada pela composição das dietas, perfil hormonal e outros fatores fisiológicos (Iritani, 1993; Kim, 1997). Rollin et al., (2003) em estudos realizados com *Oncorhynchus mykiss*, detectaram a atividade de ACC em vários tecidos, sendo o tecido hepático claramente o mais representativo. Este mesmo estudo constatou que baixas concentrações lipídicas nos tecidos, principalmente hepático, resultou em baixa atividade de ACC. Apesar de não ser observada alteração significativa na concentração lipídica deste tecido entre os grupos experimentais, foi notada uma tendência a menor deposição hepática de lipídios nas fêmeas do grupo OP, sendo observada menor expressão de ACC nos animais deste mesmo grupo corroborando com os resultados observados por Rollin et al., (2003). Da mesma forma, outros estudos realizados com mamíferos, apontaram para a estimulação da lipogênese no fígado, dado pelo aumento da concentração lipídica na dieta (Clarke et al., 1977; Kim et al., 1997).

Assim como a concentração lipídica, a concentração de PUFA na dieta pode alterar a expressão de genes relacionados com a lipogênese. Alguns autores encontraram menor expressão de ACC em ratos alimentados com dietas ricas em lcPUFA (Iritani, 1993; Iritani et al., 1998). Este fato pode também justificar a menor expressão de ACC observada nas fêmeas do grupo OP, e inversamente a maior expressão nas do grupo OC.

Estudos realizados com mamíferos apontaram para uma diminuição da síntese de mRNA do gene *fatty acid synthase* (FAS) no tecido hepático, dado pela inclusão de lcPUFA na dieta (Jump et al., 1994; Blake e Clark, 1990; Clarke et al., 1990). De forma geral, a supressão da lipogênese é acompanhada pela inibição da síntese hepática de ACC e FAS (Clarke e Abraham, 1992). Assim como ACC, FAS pode ser considerado uma enzima fundamental na síntese de AGs hepáticos, já que cataliza a síntese de 16:0 a

partir de malonil-CoA (subproduto da ação de ACC), e diferente ao observado para mamíferos, alguns estudos observaram uma baixa expressão deste gene em peixes alimentados com dietas contendo OV (com baixos níveis de lcPUFA) (Zampelas et al., 1995; Alvarez et al., 2000; Panserat et al., 2008). Diferente ao observado na expressão de ACC, não foram verificadas alterações significativas na expressão de FAS. Da mesma forma, em estudo realizado com *Salmo salar*, a expressão de FAS não foi afetada em detrimento aos diferentes óleos utilizados nas dietas, e apesar do baixo conhecimento na dinâmica deste gene em especial para peixes, este resultado pode estar relacionado com outros fatores importantes em adição à composição da dieta como a temperatura (Jordal., 2007).

Como dito anteriormente *stearoyl-CoA desaturase* (SCD) é responsável pela dessaturação de 16:0 para 16:1, e de 18:0 para 18:1n9, e estes AGs MUFA são comumente utilizados como substrato na produção de ésters de colesterol, triglicerídeos, fosfolipídios, ceras e principalmente na geração de energia metabólica (Ntambi e Miyazaki, 2004). Em estudo realizado com juvenis de *Pelteobagrus fulvidraco*, Tan et al., (2010) relacionaram a diminuição do percentual de MUFA nos tecidos hepático e muscular, com a menor expressão de SCD em animais alimentados com dietas suplementadas com OV. Os resultados observados para *E. marginatus* mostram um perfil contraditório. Apesar do elevado percentual de MUFA, e da alta expressão de SCD nos animais do grupo S, a expressão deste gene parece não estar relacionada com a composição de AGs dos tecidos, tanto nos triglicerídios, quanto nos fosfolipídios, já que para a maioria, os animais com maiores percentuais de MUFA foram justamente os do grupo OC, que da mesma forma apresentaram menor expressão deste gene. As alterações na expressão de genes relacionados com processos de desaturação no fígado, pode ter efeito relativamente insignificativo na composição de AGs dos tecidos, como

demonstrado em estudos prévios realizados com *Salmo salar*, alimentados com dietas contendo baixo percentual de lcPUFA (Bell et al., 2001, 2002).

Em geral os animais de todos os grupos experimentais apresentaram elevada expressão do gene ELOVL5, corroborando com estudos realizados com outras espécies de teleósteos, principalmente em animais alimentados com dietas contendo reduzido percentual de lcPUFA em sua composição (Izquierdo et al. 2003; Zeng et al., 2004). Os resultados observados para *E. marginatus* apontam apenas para uma tendência a elevação da expressão nos animais do grupo OC. Li et al., (2012) em estudos com *Megalobrama amblycephala*, observaram que apenas os animais que receberam dietas compostas por 100% de óleo de soja (e sem nenhuma adição de farinha ou óleo de peixe) tiveram expressão de ELOVL5 significativamente superior aos animais que receberam dietas contendo 20% e 30% do mesmo óleo. Com isso, sugere-se que a composição da dieta base (sardinha) tenha elevado a expressão de ELOVL5 próximo a saturação, já que nem mesmo a dieta suplementada com OC (dieta com reduzido percentual de lcPUFA) influenciou na expressão deste gene. A elevação de PUFA de cadeia intermediária como o 22:5n3, dado possivelmente pela ação da enzima elongase 5, utilizando EPA como substrato, foi uma evidência clara do potencial de elongação para esta espécie, e estes resultados foram semelhantes aos observados para outras espécies de telósteos (Izquierdo et al., 2003; Zeng et al., 2004; Salini et al., 2015).

Além de influenciar a lipogênese, fatores como a concentração lipídica ou de PUFA nas dietas podem afetar diretamente a β -oxidação, tanto peroxisomal quanto mitocondrial (Willumsen et al. 1996; Frøylund et al., 1998; Madsen et al., 1998, 1999). Para peixes, já é bem aceito que os dois principais tecidos responsáveis pelo catabolismo de AGs são fígado e musculatura vermelha (Henderson, 1996). Para algumas espécies, a β -oxidação peroxisomal hepática contribui mais significativamente

para a capacidade de β -oxidação total, enquanto para outras a mitocondrial é a mais representativa (Crockett e Sidell 1993; Stubhaug et al., 2007). Assim como para *E. marginatus*, Leaver et al., (2006) em estudo realizado com *Salmo salar* observaram que a expressão de CPT1 não foi alterada devido a menor inclusão de lcPUFA na dieta. No entanto, a oxidação mitocondrial foi alterada devido a expressão diferenciada de ACADVL, mais baixa nos animais do grupo OC quando comparada aos animais do grupo S. *Very long chain dehidrogenase* (enzima modulada por ACADVL) tem sido apontada como enzima chave na β -oxidação mitocondrial (Lee et al., 2000). Em *Salmo salar* foi observada uma menor expressão de ACADVL na musculatura branca (tecido que mais contribuiu para a β -oxidação nesta espécie) de animais alimentados com dietas contendo OV, mas estas alterações não foram observadas no tecido muscular vermelho e hepático (Torstensen et al., 2009). Como discutido anteriormente, em peixes de hábitos sedentários como *E. marginatus*, o tecido que mais contribui para β -oxidação é o tecido hepático, e o alto percentual principalmente de AGs SAT, e proporcionalmente o baixo percentual de lcPUFA (substrato para a ação de ACADVL) na dieta, pode ter inibido a expressão deste gene nos animais do grupo OC.

Da mesma forma estudos *in vitro* com tecido hepático de *Salmo salar* indicaram que o aumento de lcPUFA da série n3 na dieta estimulou a β -oxidação peroxisomal (Torstensen and Stubhaug, 2004). Em *E. marginatus* a β -oxidação peroxisomal, representada pela expressão do gene ACOX, apresentou variações influenciadas pela composição da dieta. Da mesma forma, estudos nutricionais realizados com *Salmo salar* indicaram que MUFA, principalmente o 18:1n7 são considerados os principais AGs oxidados pela via peroxisomal no tecido hepático, e suas concentrações influenciaram diretamente na expressão de genes relacionados com a β -oxidação (Bell et al., 2003; Torstensen et al., 2004, Stubhaug et al., 2006). Este fato pode justificar a

maior expressão de ACOX nas fêmeas dos grupos OL, OP e OC, já que estes animais receberam dietas com maior percentual de 18:1n9 em sua composição. Outra hipótese que pode corroborar com os resultados observados para *E. marginatus* é que a maior expressão de ACOX nos animais dos grupos que receberam dietas suplementadas com óleos experimentais (OL, OP e OC), pode estar relacionado com a maior disponibilidade de substrato para a β -oxidação peroxisomal fornecidos por estas dietas, comparado a dieta composta apenas por sardinha (grupo S).

6. Conclusões

Os resultados observados neste estudo mostraram que a alteração no perfil de AGs das dietas experimentais afetou diretamente o metabolismo lipídico de *E. marginatus*, alterando a dinâmica entre os processos de deposição e retenção, assim como a expressão de genes relacionados com a lipogênese, síntese e oxidação de AGs. Claramente, esta espécie oxidou principalmente os AGs SAT para gerar energia metabólica, além disso a retenção seletiva de DHA na musculatura (grupo OP) demonstra a importância da utilização de compostos ricos em lcPUFA na nutrição de *E. marginatus*, e a inclusão de outras fontes de AGs, como óleos vegetais por exemplo, deve ser rigorosamente avaliada.

A expressão dos genes, tanto das vias de síntese como oxidação de AGs, foram diretamente afetados pela composição das diferentes dietas experimentais. No entanto diferente ao observado para outras espécies de teleósteos (geralmente juvenis) não foi verificado um padrão, dado pela elevação da expressão dos genes relacionados com a síntese e oxidação, em animais que receberam menor quantidade de lcPUFA, e inversamente maior quantidade de SAT, MUFA e PUFA de cadeia média nas dietas, e este fato pode ser justificado pela ação de outras variáveis como, interespecificidade e fase de vida do animal.

Por ser uma espécie com alto interesse comercial e criticamente ameaçada, experimentos relacionados com as necessidades nutricionais para AGs importantes como o DHA, EPA e ARA, são necessários para elaboração de dietas específicas, tanto para reprodutores como para juvenis de *E. marginatus*. Outro fato a ser considerado para compreender os mecanismos que controlam o metabolismo lipídico em *E. marginatus* é o maior investimento em estudos de expressão de outros genes que atuam no metabolismo, relacionados principalmente com o transporte de AGs, sinalização

celular e síntese de HUFA, e o depósito das sequencias provenientes do transcriptoma hepático no banco público do NCBI será de fundamental valia em/ pesquisas futuras.

Referências Bibliográficas

- Ackman, R. 1976. Fish oil composition. In: Objective Methods for Food Evaluation. Nat. Acad. Sci. Washington, pp. 103-132.
- Aedo, J.E., Maldonado, J., Aballai, V., Estrada, J.M., Bastias-Molina, M., Meneses, C., Gallardo-Escarate, C., Silva, H., Molina, A., Valdés, A. 2015. mRNA-seq reveals skeletal muscle atrophy in response to handling stress in a marine teleost, the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*). BMC Genomics 16, 1024.
- Alvarez, M.J., Diez, A., Lopez-Bote, C., Gallego, M., Bautista, J.M. 2000. Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Br. J. Nutr. 84, 619-628.
- Andrade, A.B., Machado, L.F., Hostin, M., Barreiros, J.P. 2003. Reproductive biology of the Dusky grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). Braz. Arch. Biol. Tech. 46, 373-381.
- Athanasios, E. 2013. Nutrigenomics in aquaculture research. OMICS, 5:2.
- Barreiros, J. P. 1995. Aspectos do comportamento e reprodução do *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834) nos Açores. Tese de doutorado. 95 pp.
- Bell, J.G., Dick, J.R., McVicar, A.H., Sargent, J.R., Thompson, K.D. 1993. Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Prostag. Leukotr. Ess. 49, 665-673.
- Bell, M.V., Tocher, D.R. 1995. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: Arts, M.T., Bret, M.T. Kainz, M.J. (Eds.). Lipids in aquatic ecosystems. Springer Science. New York. pp. 211-236.

- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R. 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. J. Nutr. 131, 1535-1543.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R., Sargent, J.R. 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue fatty acid compositions and hepatic fatty acid metabolism. J. Nutr. 132, 222-230.
- Bell, J.G., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R. 2003. Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out.” Aquaculture 218:515-528.
- Blake, W.L., Clarke, S.D. 1990. Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. J. Nutr. 34, 1726-1729.
- Bougnoux, P., Koscielny, S., Chajes, V., Descamps, P., Couet, C., Calais, G. 1994. Alpha-Linolenic acid content of adipose breast tissue: a host determinant of the risk of early metastasis in breast cancer. Br. J. Cancer 70, 330-334.
- Brodtkorb, T., Rosenlund, G., Lie, O. 1997. Effects of dietary levels of 20:5n-3 and 22:6n-3 on tissue lipid composition in juvenile salmon, *Salmo salar*, with emphasis on brain and eye. Aquacult. Nutr. 3, 175-187.
- Brolinson, A. 2009. Regulation of Elovl and fatty acid metabolism. Tese de doutorado. 58pp.
- Brown, P.B., Twibell, R., Jonker, Y., Wilson, K.A. 1997. Evaluation of three soybean products in diets fed to juvenile hybrid striped bass *Morone saxatilis* × *M. chrysops*. J. World Aquac. Soc. 28, 215-223.

- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 214:253-271.
- Calduch-Giner, J.A., Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Sitja-Bobadilla, A., Perez-Sanchez, J. 2013. Deep sequencing for *de novo* construction of a marine fish (*Sparus aurata*) transcriptome database with a large coverage of protein-coding transcripts. BMC Genomics 14, 178-189.
- Christie, W.W. 2003. Lipids analysis. The Oily Press, Bridgwater. 298 pp.
- Clarke, S. D., D. R. Romsos, Leveille, G. A. 1977. Differential effects of dietary methyl esters of long-chain saturated and polyunsaturated fatty acids on rat liver and adipose tissue lipogenesis. J. Nutr. 107, 1170-1181.
- Clarke, S. D., Armstrong, M. K., Jump, D. B. 1990. Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. J. Nutr. 120, 225-231.
- Clarke, S. D., Abraham, S. 1992. Gene expression: nutrient control of pre- and posttranscriptional events. FASEB J. 6, 3146-3152.
- Coppe, A., Pujolar, J.M., Maes, G.E., Larsen, P.F., Hansen, M.M., Bernatchez, L., Zane, L., Bortoluzzi, S. 2010. Sequencing, *de novo* annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel. BMC Genomics 11, 635.
- Cornish, A., Harmelin-Vivien, M. 2004. *Epinephelus marginatus*. IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.
- Crockett, E., Sidell, B.D. 1993. Peroxisomal beta-oxidation is a significant pathway for catabolism of fatty acids in a marine teleost. Am. J. Physiol. 33, R1004-R1009.

- Eldem, V., Zarars, G., Erkan, M., Bakir, Y. 2015. *De novo* assembly and comprehensive characterization of the skeletal muscle transcriptomes of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). Mar. Genomics. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2015.01.001>.
- Farndale, B.M., Bell, J.G.; Bruce, M.P., Bromage, N.R., Oyen, F., Zanuy, S., Sargent, J.R. 1999. Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid compositions and plasma eicosanoid concentrations in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. 179, 335-350.
- Folch, J., Less, M., Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-503.
- Francis, D.S., Turchini, G.M., Jones, P.L., De Silva, S.S. 2007. Growth performance, feed efficiency and fatty acid composition of juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*, fed graded levels of canola and linseed oil. Aquac. Nut. 13, 335-350.
- Fraser, T.W.K., Davies, S.J. 2009. Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. Aquac. Res. 40, 1219-1234.
- Fraser, B.A., Weadick, C.J., Janowitz, I., Rodd, F.H., Hughes, KA. 2011. Sequencing and characterization of the guppy (*Poecilia reticulata*) transcriptome. BMC Genomics 12, 202.
- Frings, C. S., Fendly, T. W., Dunn, R. T., Quenn, C. A. 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. Clin. Chem. 18, 673-674.
- Frøyland, L., Madsen, L., Eckhoff, K.M., Lie, O., Berge, R., 1998. Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyl transferase II, and Acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Lipids 33, 923-930.

- Frøyland, L., Lie, O., Berge, R.K. 2000. Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquacult. Nutr.* 6, 85-89.
- Garcia, C.E.O., Araújo, B.C., Mello, P.H., Narcizo, A.M., Rodrigues-Filho, J.A., Medrado, A.T., Zampieri, R.A., Floeter-Winter, L.M., Moreira, R.G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *Gen. Comp. Endoc.* 192,170-180.
- Glencross, B.D., Hawkins, W.E., Curnow, J.G. 2003. Evaluation of canola oils as alternative lipid resources in diets for juvenile red seabream, *Pagrus auratus*. *Aquacult. Nutr.* 9, 305-315.
- Glencross, D.B. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Aquaculture* 1, 71-124.
- Greene, D.H.S., Selivonchick, D.P. 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89, 165-182.
- Grisdale-Helland, B., Ruyter, B., Rosenlund, G., Obach, A., Helland, S.J., Sandberg, M.G., Standal, H., Rosjo, C. 2002. Influence of high contents of dietary soybean oil on growth, feed utilization, tissue fatty acid composition, heart histology and standard oxygen consumption of Atlantic salmon (*Salmo salar*) raised at two temperatures. *Aquaculture* 207, 311-329.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B. 1994. *The Lipid Handbook*. Cambridge University Press. Cambridge 1273pp.

- Gunstone, F.D. 2010. The world's oils and fats. In: Ng, W. and Tocher (Eds). Fish oil Replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press, Boca Raton. pp. 61-99.
- Gurr, M.I., James, A.T. 1975. Lipid Biochemistry: An Introduction. Halsted Press, New York, 3960pp.
- Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F. 2000. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Kluwer Academic. Dordrecht. 867pp.
- Hasting, N., Agaba, M., Tocher, D. R., Leaver, M. J., Dick, J. R., Sargent, J. R., Teale, A. J. 2001. A vertebrate fatty acid dessaturase with delta 5 and delta 6 activities. PNAS. 98, 14304-14309.
- Hemre, G.I., Juell, J.E., Hamre, K., Lie, Ø., Strand, B., Arnesen, P., Holm, J.C. 1997. Feeding av Atlantic mackerel: effect on muscle lipid content, fatty acid composition, oxidation status and vitamin E concentration. Aquat. Living Resour. 10:365-370.
- Henderson, R.J. 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. Arch. Anim. Nutr. 49, 5-22.
- Hillgartner, F.B., Salati, L.M., Goodridge, A.G., 1995. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. Physiol. Rev. 75, 47-76.
- Holub, D.J., Holub, B.J. 2004. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. Mol. Cell. Biochem. 263:217-225.
- Huang, S.S.Y., Oo, A.N., Higgs, D.A., Brauner, C.J., Satoh, S. 2007. Effect of dietary canola oil level on the growth performance and fatty acid composition of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture 271, 420-431.
- Iritani, N., Ikeda, Y., Fukuda, H., Katsurada, A. 1984. Comparative study of lipogenic enzymes in several vertebrates. Lipids 19, 828-835.

- Iritani, N. 1993. A review: Nutritional and hormonal regulation of lipogenic enzyme gene expression in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 205, 433-442.
- Iritani, N., Komiya, M., Fukuda, H., Sugimoto, T. 1998. Lipogenic enzyme gene expression is quickly suppressed in rats by a small amount of exogenous polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* 128, 967-972.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Rabaina, L., Rosenlund, G. 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 397-407.
- Johnson, L.J., Casillas, E. 1991. The use of plasma parameters to predict ovarian maturation stage in English sole *Parophrys vetulus*. *Girard. J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 151, 257-270.
- Jordal, A-E.O., Lie, O., Torstensen, B.E. 2007. Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Nutr.* 13:114-130.
- Jump, D. B., Clarke, S. D., Thelen, A., Liimatta, M. 1994. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 35, 1076-1084.
- Kakela, R., Ackman, R. G., Hyvarinen, H. 1995. Very long chain polyunsaturated fatty acids in the blubber of ringed seals (*Phoca hispida botnica*) from lake Saimaa, lake Lladoga, the Baltic Sea, and Spitsbergen. *Lipids.* 30, 319-325.
- Kennish, J.M., Sharpdahl, J.L., Chambers, K.A., Thrower, F. and Rice, S.D. 1992. The effect of a herring diet on lipid composition, fatty acid composition, and cholesterol levels in muscle tissue of pen-reared chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 108, 309-322.
- Kiessling, K-H., Kiessling, A. 1993. Selective utilization of fatty acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. *Can. J. Zool.* 71, 248-251.

- Kim, K.H. 1997. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 77-99.
- Leaver, M.J., Villeneuve, L.A.N., Obach, A., Jensen, L., Bron, J.E., Tocher, D.R., Taggart, J.B. 2008. Functional genomics reveals increased cholesterol and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9, 299 doi:10.1186/1471-2164-9-299.
- Leaver, M.J., Tocher, D.R., Obach, A. 2006. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on lipid composition, metabolism and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 145, 258-267.
- Lee, S.M., Cho, S.H., Kim, K.D. 2000. Effects of dietary protein and energy levels on growth and body composition of juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. World Aquac. Soc.* 31, 306-315.
- Li, Y., Liang, X., Zhang, Y., Gao, J. 2016. Effects of different dietary soybean oil levels on growth, lipid deposition, tissues fatty acid composition and hepatic lipid metabolism related gene expressions in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) juvenile. *Aquaculture* 451, 16-23.
- Lin, H.Z., Liu, Y.J., He, L.X. 2007. Alternative vegetable lipid sources in diets for grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton): effects on growth, and muscle and liver fatty acid composition. *Aquacult. Reser.* 38, 1605-1611.
- Liu, S., Zhou, Z., Lu, J. 2011. Generation of genome-scale gene-associated SNPs in catfish for the construction of a high-density SNP array. *BMC Genomics*, 12, 53.
- Lund, E.D., Sullivan, C.V., Place, A.R. 2000. Annual cycle of plasma lipids in captive reared striped bass: effects of environmental conditions and reproductive cycle. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 263-275.

- Madsen, L., Froyland, L., Dyroy, E., Helland, K., Berge, R.K. 1998. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation. *J. Lipid Res.* 39, 583-593.
- Maehre, H.K., Jensen, I., Elvevoll, E.O., Eilertsen, K. 2015. ω -3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance. *Int. J. Mol. Med.* 16, 22636-22661.
- Malachowicz, M., Kijewska, A., Wenne, R. 2015. Transcriptome analysis of gill tissue of Atlantic cod *Gadus morhua* L. from the Baltic Sea. *Mar. Genomics* 23, 37-40.
- Marino, G., Panini, E., Longobardi, A., Mandich, A., Finoia, M.G., Zohar, Y., Mylonas, C.C. 2002. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. *Aquaculture* 219, 841-858.
- Mazurais, D., Darias, M., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L. 2011. Transcriptomics for understanding marine fish larval development. *Can. J. Zool.* 89, 599-611.
- McGarry, J.D., Mannaerts, G.P., Foster, D.W., 1977. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* 60, 265-270.
- Moreira, R. G., Zapata, C. R. O., Bicudo, J. E. P. W., Parrish, C. C., Senhorini, J. A. 2003. Effects of broodstock diet on fatty acid composition of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) eggs and larvae. In: *Proceedings of World Aquaculture Society 2003*, Salvador. 500pp.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y. 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta-6, delta-5, and delta-9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 345-376.
- Navarro, I., Sanchez, J., Gutierrez, J., Planas, J. Some plasma hormones and metabolites in the pyrenean brown trout (*Salmo trutta fario*). *Comp. Biochem. Physiol.* 100A, 919-923.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2005. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Freeman, New York. 1.119pp.

- Ng, W.K., Gibon, V. 2010. Palm oil and saturated fatty acid-rich vegetable oils. In: Ng, W.; Tocher (Eds). Fish oil Replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press, Boca Raton. pp. 99-132.
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoeckl, J.P., Lan, H., Kendziorski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M., Attie, A.D. 2002. Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11482-11486.
- Oliveira, E.R.N., Agostinho, A.A., Matsushita, M. 2003. Effect of biological variables and capture period on the proximate composition and fatty acid composition of the dorsal muscle tissue of *Hypophthalmus edentatus* (Spix, 1829). Braz. Arch. Biol. Technol. 46, 105-114.
- Panserat, S., Kolditz, C., Richard, N., Plagnes-Juan, E., Piumi, F., Esquerre, D., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S. 2008. Hepatic gene expression profiles in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed fishmeal or fish oil-free diets. Br. J. Nutr. 100, 953-967.
- Qian X., Ba Y., Zhuang Q., Zhong G. 2014. RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. OMICS 18, 1-13.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Robin, J., Laroche, M., Kaushik, S.J. 2001. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis, and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 193, 291-309.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., Kaushik, S.J. 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. Aquaculture 217, 465-462.
- Robinson, J.S., Mead, J.F. 1973. Lipid absorption and deposition in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). Can. J. Biochem.. 51(7), 1050-1058.

- Rodrigues-Filho, J.A., Sanches, E. G., Garcia, C. E. O., Sebastini, E.F., Pannuti, C.V., Moreira, R. G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). Environ. Biol. Fishes 85, 301-302.
- Rollin, X., Peng, J., Pham, D., Ackman, R.G., Larondelle, Y. 2003. The effects of dietary lipid and strain difference on polyunsaturated fatty acid composition and conversion in anadromous and landlocked salmon (*Salmo salar* L.) parr. Comp. Biochem. Physiol. Part B 134, 349-366.
- Rosenlund, G., Obach, A., Sandberg, M.G., Standal, H., Tveit, K. 2001. Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aqua. Res. 32, 323-328.
- Ruyter, B., Andersen, O., Dehli, A., Farrants, A.K.O., Gjoen, T., Thomassen, M.S., 1997. Peroxisome proliferator activated receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects on PPAR transcription and acyl-CoA oxidase activity in hepatocytes by peroxisome proliferators and fatty acids. Biochim. Biophys. Acta 1348, 331-338.
- Ruyter, B., Moya-Falcon, C., Rosenlund, G., Vegusdal, A., 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of temperature and dietary soybean oil. Aquaculture 252, 441-452.
- Salini, M., Irvin, S., Bourne, N., Blyth, D., Cheers, S., Turchini, G., Glencross, B.D. 2015. Marginal efficiencies of long chain-polyunsaturated fatty acid use by barramundi (*Lates calcarifer*) when fed diets with varying blends of fish oil and poultry fat. Aquaculture 449, 48-57.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (3ªEds.). Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, pp. 181-257.
- São Paulo. 2008. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118 (187). Secretaria do Meio Ambiente.

- Schreiner, M., Andrade, V. X. L., Moreira, R. G., Scorvo-Filho, J. D., Romagosa, E. 2005. The influence of diet on the fatty acid composition of lipid storage tissues of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) (Pisces: Teleostei) reared in cages. In: Proc 26th World Congress and Exhibition of the International Society for Fat Research. Praga, 55pp.
- Sheridan, M. 1986. Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. Gen. Comp. Endocrinol. 64, 220-238.
- Sheridan, M.A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. Part B 107, 495-508.
- Silva, S.S., Francis, D.S., Tacon, A.G.J. 2010. Fish oil in Aquaculture, in: Turchini, G.M., Ng, W.K., Tocher, D.R., (1rd). Fish oil Replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds, CRC Press Boca Raton, London, pp. 1-20.
- Simopoulos, A.P. 1989. Summary of NATO advanced research workshop on dietary N-3 and N-6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. J. Nutr. 199:512-528.
- Sheridan, M. 1983. Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. Gen. Comp. Endocrinol. 32, 220-238.
- Sorbera, L. A., Astuarino, J. F., Carrillo, M., Zanuy, S. 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocytes maturation in a marine teleost, the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Biol. Reprod. 64, 382-389.
- Stephan, G., Guillaume, J., Lamour, F. 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. Aquaculture 130, 251-268.

- Stubhaug, I., Lie, O., Torstensen, B.E. 2006. β -oxidation capacity in liver increases during parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed vegetable and fish oil. J. Fish. Biol. 69, 504-517.
- Stubhaug, I., Lie, O., Torstensen, B.E. 2007. Fatty acid productive value and β -oxidation capacity in Atlantic salmon tissues (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. Aquacult. Nutr. 13, 145-155.
- Tan, X.Y, Luo, Z., Xie, O., Li, X.D., Liu, X.J., Xi, W.Q. 2010. Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on growth performance, body composition and hepatic intermediary metabolism in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Aquaculture, 310, 186-191.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Ver. Fish. Sci. 11(2), 107-184.
- Torstensen, B.E., Lie, O., Frøyland, L. 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid enriched sunflower oil as dietary lipid sources. Lipids 35, 653-664.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., Lie, O. 2004. Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil: effects on Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissue and lipoprotein composition and lipogenic enzyme activities. Aquacult. Nutr. 10, 175-192.
- Torstensen, B.E., Stubhaug I. 2004. β -Oxidation of 18:3n-3 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes treated with different fatty acids. Lipids 39, 153-160.
- Torstensen, B.E., Nanton, D., Olsvik, P.A., Sundvold, H., Stubhaug, I. 2009. Gene expression of fatty acid binding proteins (FABPs), fatty acid transport proteins (cd36 and FATP) and β -oxidation related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish oil or vegetable oil. Aquacult. Nutr. 15, 440-445.

- Torstensen, B.E., Tocher, D.R. 2010. The effects of fish oil replacement on lipid metabolism of fish. In: Ng, W.K.; Tocher, D.R. (Eds). Fish oil Replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press, Boca Raton. pp. 405-438.
- Turchini, G.M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M., Valfre, F. 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquaculture 225, 251-267.
- Turchini, G.M., Francis, D.S. 2009. Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and β -oxidation) in rainbow trout fed fish oil- or linseed oil-based diets. Brit. J. Nutr. 102, 69-81.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. Rev. Aquacult. 1, 10-57.
- Ustün, G., Guner, S., Arer, G., Turkay, S., Erciyes, A.T. 1997. Enzymatic hydrolysis of anchovy oil: Production of glycerides enriched in polyunsaturated fatty acids. Appl. Biochem. Biotech. 68, 171-186.
- Waagbo, R., Sandnes, K., Torrissen, O. J., Sandvin, A., Lie, O. 1993. Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of n-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. Food Chem. 46, 361-366.
- Wade, N.M., Skiba-Cassy, S., Dias, K., Glencross, B.D. 2014. Postprandial molecular responses in the liver of the barramundi, *Lates calcarifer*. Fish Physiol. Biochem. 40, 427-443.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K., Joshi, V.C. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. Ann. Rev. Biochem. 52, 537-579.

- Wassef, A.E. Shalaby, S.H., Saleh, N.E. 2015. Comparative evaluation of sunflower oil and linseed oil as dietary ingredient for gilthead seabream (*Sparus aurata*) fingerlings. OCL 22(2), A201.
- Willumsen, N., Vaagenes, H., Lie, O. Rustan, A.C., Berge, R.K. 1996. Eicosapentaenoic acid, but not docosahexaenoic acid, increases mitochondrial fatty acid oxidation and upregulates 2,4,-dienoyl-CoA reductase gene expression in rats. Lipids 31, 579-592.
- Wu, F.C., Ting Y.Y., Chen H.Y. 2002. Docosahexaenoic acid is superior to eicosapentaenoic acid as the essential fatty acid for growth of grouper, *Epinephelus malabaricus*. J. Nutr. 132, 72-79.
- Wu, F.C., Chen H.Y. 2012. Effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth, tissue fatty acid profile and immune response of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 324, 111-117.
- Zampelas, A., Morgan, L.M., Furlonger, N., Williams, C.M. 1995. Effects of dietary fatty acid composition on basal and hormone stimulated hepatic lipogenesis and on circulating lipids in the rat. Br. J. Nutr. 74, 381-392.
- Zar, J. H. 1984. Bioestatistical Analysis. New Jersey, Prentice Hall. 718pp.
- Zheng. X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O., Morais, S., Tocher, D.R. 2010. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture 290, 122-131.

Tabelas

Tabela 1. Média da massa corpórea (kg) e comprimento total (cm) das fêmeas de *Epinephelus marginatus* dos quatro grupos experimentais: (S) sardinha; (OL) óleo de linhaça; (OP) óleo de peixe e (OC) óleo de coco.

Grupos	Massa Corpórea (kg)	Comprimento Total (cm)
S	2,57 ± 0,5	53,8 ± 2,9
OL	2,55 ± 0,8	53,0 ± 4,7
OP	2,65 ± 0,6	53,9 ± 3,7
OC	2,70 ± 0,6	55,3 ± 3,1

Tabelas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 - Σ SAT (somatória dos ácidos graxos saturados), Σ MUFA (somatória dos ácidos graxos monoinsaturados), Σ PUFA (somatória dos ácidos graxos polinsaturados), Σ PUFA n6 (somatória dos ácidos graxos polinsaturados da série n6), Σ PUFA n3 (somatória dos ácidos graxos polinsaturados da série n3), Σ n3/ Σ n6 (razão dos ácidos graxos da série n3 e n6), **Outros** (representa ácidos graxos que não foram encontrados para todos os grupos, com exceção do 18:3n3). **S** (grupo sardinha), **OL** (grupo óleo de linhaça), **OP** (grupo óleo de peixe) e **OC** (grupo óleo de coco).

^{a,b} Letras diferentes representam valores significativamente diferentes entre os grupos experimentais.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (%) dos óleos experimentais: OL (óleo de linhaça); OP (óleo de peixe) e OC (óleo de coco).

AG	OL	OP	OC
10:0	-	-	4,06
12:0	-	-	48,56
14:0	-	2,01	21,35
16:0	4,79	16,62	10,19
18:0	3,60	5,09	3,59
Σ SAT	8,39	23,72	87,75
16:1	-	4,66	-
18:1n9	18,55	12,89	9,56
18:1n7	-	2,53	-
20:1n9	-	0,46	-
Σ MUFA	18,55	20,54	9,56
18:3n3	55,97	14,65	-
20:4n3	-	1,18	-
20:5n3	-	8,56	-
22:5n3	-	2,11	-
22:6n3	-	21,70	-
Σ PUFA n3	55,97	48,20	-
18:2n6	17,10	6,27	2,59
Σ PUFA n6	17,10	6,07	2,59
Σ PUFA	73,07	54,27	2,59
Outros	-	1,46	-
Σ n3/ Σ n6	3,27	8,11	-

Tabela 3. Perfil dos ácidos graxos (%) das dietas experimentais. S (sardinha), OL (óleo de linhaça), OP (óleo de peixe) e OC (óleo de coco).

AG	S	OL	OP	OC
10:0	-	-	-	1,38
12:0	-	-	-	19,42
14:0	10,07	5,75	8,21	15,99
16:0	32,56	29,98	24,39	25,77
18:0	5,97	6,75	4,78	5,83
20:0	0,42	0,59	0,37	0,45
Σ SAT	49,03	43,07	37,74	68,83
16:1	5,91	5,26	7,74	4,04
18:1n9	6,38	12,53	7,72	8,16
18:1n7	2,58	2,79	2,82	1,96
20:1n9	0,57	0,67	0,80	0,57
Σ MUFA	15,44	21,25	19,08	14,73
18:3n4	0,17	0,14	0,15	0,09
18:3n3	1,67	9,87	1,71	1,04
20:4n3	0,41	0,35	0,64	0,22
20:5n3	7,86	4,70	13,02	3,07
22:5n3	0,81	0,60	1,31	0,40
22:6n3	14,40	8,62	15,96	5,27
Σ PUFA n3	25,32	24,28	32,79	10,09
18:2n6	1,97	5,34	1,96	2,14
18:3n6	0,21	0,22	0,17	0,09
20:2n6	0,24	0,24	0,20	0,19
20:4n6	1,37	0,95	1,34	0,61
22:4n6	0,86	0,60	0,73	0,37
Σ PUFA n6	4,66	7,36	4,40	3,40
Σ PUFA	30,04	31,65	37,20	13,49
Outros	5,57	4,03	5,98	2,94
Σ n3/ Σ n6	5,44	3,30	7,45	2,96

Tabela 4. Massa total (kg) do alimento ofertado, retirado e consumido pelos animais dos diferentes grupos durante todo período experimental. S (sardinha), OL (óleo de linhaça), OP (óleo de peixe) e OC (óleo de coco).

Grupo	Alimento Ofertado (Kg)	Alimento Retirado (Kg)	Alimento Consumido (Kg)
S	13,65	3,09	10,56 ^a
OL	14,80	3,88	10,92 ^a
OP	14,74	4,74	10,00 ^a
OC	16,50	8,14	8,36 ^b

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas diferentes entre os grupos experimentais (P<0,05).

Tabela 5. Genes alvo da síntese e β -oxidação no tecido hepático de *E. marginatus*, e a sequência utilizada para analisar sua expressão.

Gene alvo	Abreviação		Sequência	Similarity (%)
Síntese				
<i>Elongase 5</i>	<i>Em ELOVL5</i>	For Rev	TCACACTCATCTTCCTCTTCTC GGTTTCTCAAATGTCAATCCAC	100
<i>Acetyl CoA Carboxylase</i>	<i>Em ACC</i>	For Rev	CATCTTGACTGAACTCACCC CATCCTGACAACCTGATTACTG	92,56
<i>Fatty Acid Synthase</i>	<i>Em FAS</i>	For Rev	CTCGCAACTTATTGATGGTG ATGTAAATAGCCTGAACCCT	89,48
<i>Stearoyl CoA Desaturase (Delta9)</i>	<i>Em SCD</i>	For Rev	TCACCAACTATTAGCCACAG TATTGCCTGTAGAGAAACCT	95,26
β-Oxidação				
<i>Carnitine palmitoyltransferase</i>	<i>Em CPT1A</i>	For Rev	CAACAATGATCTGCCTTCGT CACAAATCACAAACATTGAGCC	99,24
<i>Acyl CoA dehydrogenase (very long chain)</i>	<i>Em ACADVL</i>	For Rev	TTGCCATTCTTCAGTTACCA TTTCACTCTTCAACATCTCCA	96,30
<i>Acyl-CoA Oxidase</i>	<i>Em ACOX1</i>	For Rev	TTGTTTGTAGACCTCCACCA ATTGTGTCCTATCTGAATGAAC	86,44

Tabela 6. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) dos fosfolipídios do fígado dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	0,92 ± 0,33a	0,87 ± 0,50a	0,78 ± 0,11a	2,93 ± 1,44b	≤0,05
16:0	17,45 ± 2,26a	15,64 ± 4,70a	17,09 ± 3,35a	21,24 ± 3,55b	≤0,05
18:0	15,40 ± 1,41ab	18,20 ± 3,40a	16,53 ± 3,16ab	11,30 ± 4,80b	≤0,05
20:0	0,28 ± 0,08	0,25 ± 0,06	0,28 ± 0,12	0,20 ± 0,10	N.S.
Σ SAT	34,05 ± 1,49	34,96 ± 3,80	34,68 ± 1,49	35,67 ± 1,06	N.S.
16:1	3,20 ± 0,50ab	2,28 ± 1,39a	2,42 ± 0,32a	6,40 ± 4,8b	≤0,05
18:1n9	4,02 ± 0,75a	3,79 ± 0,67a	3,59 ± 0,50a	7,59 ± 3,46b	≤0,05
18:1n7	1,96 ± 0,54	1,61 ± 0,57	1,95 ± 0,38	2,43 ± 0,61	N.S.
20:1n9	0,35 ± 0,13	0,33 ± 0,22	0,39 ± 0,08	0,51 ± 0,18	N.S.
Σ MUFA	9,53 ± 1,65a	8,01 ± 2,70a	8,35 ± 1,60a	16,93 ± 8,70b	≤0,05
16:2n4	0,48 ± 0,15	0,50 ± 0,43	0,80 ± 0,41	0,39 ± 0,37	N.S.
18:3n4	0,28 ± 0,10	0,31 ± 0,12	0,32 ± 0,12	0,30 ± 0,02	N.S.
18:3n3	-	2,12 ± 1,78	-	0,85 ± 0,29	N.S.
20:5n3	6,71 ± 1,46	7,65 ± 2,30	6,96 ± 2,52	7,36 ± 2,11	N.S.
22:4n3	1,67 ± 0,73	1,49 ± 0,44	1,17 ± 0,53	1,18 ± 0,024	N.S.
22:5n3	1,19 ± 0,30	0,97 ± 0,40	1,18 ± 0,49	1,75 ± 0,81	N.S.
22:6n3	29,68 ± 1,43ab	27,26 ± 3,62ab	32,50 ± 5,22a	23,27 ± 6,20b	≤0,05
Σ PUFA n3	39,25 ± 1,87	39,50 ± 5,30	41,81 ± 1,87	34,07 ± 6,66	N.S.
18:2n6	0,98 ± 0,32a	3,40 ± 1,07b	0,80 ± 0,21a	1,42 ± 0,28a	≤0,05
18:3n6	1,37 ± 0,62	1,14 ± 0,48	1,01 ± 0,38	0,65 ± 0,29	N.S.
20:4n6	10,76 ± 2,40	8,89 ± 0,82	8,74 ± 1,89	7,12 ± 3,05	N.S.
22:4n6	1,04 ± 0,17	1,20 ± 0,53	1,15 ± 0,57	1,51 ± 0,34	N.S.
Σ PUFA n6	14,6 ± 2,32	14,63 ± 1,16	11,69 ± 2,32	10,71 ± 3,26	N.S.
Σ PUFA	54,61 ± 2,29	54,93 ± 6,5	54,63 ± 2,29	45,41 ± 9,15	N.S.
Outros	2,25 ± 0,41	2,07 ± 0,39	2,42 ± 0,41	2,37 ± 0,32	N.S.
Σ n3/ Σ n6	2,88 ± 0,89	2,70 ± 0,34	3,70 ± 0,89	3,31 ± 1,38	N.S.

Tabela 7. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) dos fosfolipídios do músculo dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	0,55 ± 0,17	1,09 ± 0,48	0,86 ± 0,74	0,72 ± 0,10	N.S.
16:0	20,32 ± 10,27	15,97 ± 2,60	23,26 ± 9,80	17,61 ± 2,83	N.S.
18:0	12,81 ± 2,83ab	13,54 ± 1,69ab	9,27 ± 2,29a	13,92 ± 3,19b	≤0,05
20:0	0,15 ± 0,04	0,21 ± 0,09	0,17 ± 0,10	0,36 ± 0,23	N.S.
Σ SAT	33,83 ± 8,05	30,81 ± 2,81	33,53 ± 10,47	32,61 ± 1,18	N.S.
16:1	1,96 ± 0,59	2,29 ± 0,57	3,56 ± 2,97	2,19 ± 0,49	N.S.
18:1n9	10,32 ± 2,25	9,88 ± 1,81	11,07 ± 3,67	12,81 ± 2,14	N.S.
18:1n7	2,22 ± 1,12	1,64 ± 0,22	2,07 ± 1,10	1,77 ± 0,14	N.S.
20:1n9	0,34 ± 0,13	0,32 ± 0,13	0,31 ± 0,09	0,42 ± 0,14	N.S.
Σ MUFA	14,85 ± 3,22	14,13 ± 2,41	17,01 ± 7,66	17,10 ± 2,25	N.S.
16:2n4	1,28 ± 0,75	1,46 ± 0,91	1,27 ± 0,69	0,33 ± 0,40	N.S.
18:3n4	0,18 ± 0,06	0,18 ± 0,10	0,21 ± 0,12	0,72 ± 0,18	N.S.
18:3n3	0,25 ± 0,25a	1,47 ± 0,44b	0,21 ± 0,12a	1,93 ± 0,92b	≤0,05
20:5n3	3,40 ± 1,13	3,64 ± 0,54	4,91 ± 2,00	2,93 ± 0,37	N.S.
22:4n3	2,40 ± 0,79	2,42 ± 0,37	2,62 ± 1,15	2,08 ± 0,29	N.S.
22:5n3	1,45 ± 0,57	1,30 ± 0,24	1,24 ± 0,56	1,67 ± 0,31	N.S.
22:6n3	32,48 ± 5,87	31,92 ± 3,95	30,33 ± 11,70	28,12 ± 1,11	N.S.
Σ PUFA n3	39,98 ± 8,36	40,76 ± 3,78	39,31 ± 14,93	35,95 ± 0,31	N.S.
18:2n6	1,14 ± 0,47a	2,87 ± 1,13bc	0,77 ± 0,22a	3,40 ± 0,89c	≤0,05
18:3n6	0,47 ± 0,15	0,48 ± 0,16	0,31 ± 0,13	0,53 ± 0,28	N.S.
20:2n6	0,14 ± 0,04	0,21 ± 0,09	0,16 ± 0,08	0,15 ± 0,04	N.S.
20:4n6	5,08 ± 1,63	5,46 ± 1,38	4,28 ± 1,98	7,08 ± 1,35	N.S.
22:2n6	0,20 ± 0,12	0,26 ± 0,12	0,29 ± 0,12	0,22 ± 0,18	N.S.
22:4n6	0,91 ± 0,43	1,02 ± 0,16	0,69 ± 0,46	0,92 ± 0,34	N.S.
22:5n6	0,19 ± 0,12	0,23 ± 0,10	0,33 ± 0,16	0,56 ± 0,29	N.S.
Σ PUFA n6	8,10 ± 2,56ab	10,54 ± 1,49ac	6,83 ± 2,59b	12,46 ± 1,82c	≤0,05
Σ PUFA	49,55 ± 10,95	52,95 ± 4,39	47,61 ± 17,76	49,32 ± 1,60	N.S.
Outros	1,78 ± 0,63	2,11 ± 0,70	1,85 ± 0,62	1,98 ± 0,72	N.S.
Σ n3/ Σ n6	5,19 ± 1,05a	3,92 ± 0,5b	5,76 ± 0,59a	2,93 ± 0,38c	≤0,05

Tabela 8. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) dos fosfolipídios das gônadas dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	1,21 ± 0,69	1,04 ± 0,26	1,18 ± 0,29	1,40 ± 0,46	N.S.
16:0	16,66 ± 3,14	17,47 ± 2,41	17,51 ± 2,53	20,49 ± 2,80	N.S.
18:0	17,22 ± 0,88	16,91 ± 3,55	18,71 ± 3,61	13,62 ± 2,81	N.S.
20:0	0,30 ± 0,15	0,47 ± 0,33	0,45 ± 0,12	0,34 ± 0,14	N.S.
Σ SAT	35,39 ± 3,06	35,89 ± 2,25	37,85 ± 3,73	35,85 ± 1,79	N.S.
16:1	3,05 ± 0,75ab	2,53 ± 0,63a	3,08 ± 0,71ab	4,26 ± 1,39b	≤0,05
18:1n9	8,62 ± 1,23a	9,57 ± 2,89ab	9,36 ± 2,73ab	13,09 ± 2,15b	≤0,05
18:1n7	2,28 ± 0,21a	1,88 ± 0,24b	2,00 ± 0,27ab	1,99 ± 0,10ab	≤0,05
20:1n9	0,62 ± 0,19	0,60 ± 0,15	0,69 ± 0,12	0,61 ± 0,08	N.S.
Σ MUFA	14,56 ± 1,42a	14,21 ± 3,20a	15,14 ± 3,61a	19,95 ± 3,27b	≤0,05
16:2n4	1,47 ± 1,14	1,48 ± 1,26	1,19 ± 0,75	0,44 ± 0,40	N.S.
18:3n4	0,41 ± 0,15	0,31 ± 0,06	0,28 ± 0,10	0,24 ± 0,14	N.S.
18:3n3	-	2,39 ± 0,82	-	-	N.S.
18:4n3	0,81 ± 0,75	0,38 ± 0,37	0,41 ± 0,29	0,29 ± 0,12	N.S.
20:4n3	1,15 ± 1,21	0,80 ± 0,91	0,55 ± 0,45	0,15 ± 0,03	N.S.
20:5n3	4,44 ± 0,43	4,11 ± 0,65	4,86 ± 1,16	3,81 ± 0,56	N.S.
22:4n3	2,19 ± 0,61	2,32 ± 0,50	2,02 ± 0,26	1,85 ± 0,43	N.S.
22:5n3	1,72 ± 0,50	1,39 ± 0,36	1,77 ± 0,17	1,69 ± 0,49	N.S.
22:6n3	18,69 ± 3,81	17,72 ± 2,90	17,54 ± 3,80	16,71 ± 1,74	N.S.
Σ PUFA n3	28,89 ± 3,39	28,77 ± 2,71	27,04 ± 4,99	24,46 ± 2,40	N.S.
18:2n6	1,27 ± 0,15a	3,70 ± 1,67b	1,86 ± 1,26ab	3,97 ± 1,57b	≤0,05
18:3n6	1,11 ± 0,44	0,71 ± 0,33	0,80 ± 0,24	0,51 ± 0,23	N.S.
20:2n6	0,93 ± 1,07	0,37 ± 0,30	0,45 ± 0,38	0,27 ± 0,13	N.S.
20:4n6	13,92 ± 4,20	12,55 ± 1,38	13,16 ± 1,06	11,96 ± 2,87	N.S.
22:4n6	1,45 ± 0,79	1,55 ± 0,42	1,70 ± 0,28	1,78 ± 0,59	N.S.
Σ PUFA n6	18,68 ± 4,09	18,87 ± 0,99	17,62 ± 1,08	18,49 ± 3,47	N.S.
Σ PUFA	49,56 ± 4,07	49,43 ± 2,44	46,48 ± 5,72	43,63 ± 4,38	N.S.
Outros	0,80 ± 0,40	0,45 ± 0,05	0,54 ± 0,09	0,55 ± 0,28	N.S.
Σ n3/ Σ n6	1,60 ± 0,32	1,53 ± 0,14	1,53 ± 0,28	1,33 ± 0,14	N.S.

Tabela 9. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) dos triglicerídios do fígado dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	3,71 ± 1,12a	2,74 ± 0,43a	4,13 ± 0,92 a	7,87 ± 2,52b	≤0,05
16:0	23,03 ± 2,36ab	18,72 ± 2,25a	25,98 ± 5,28ab	26,64 ± 1,07b	≤0,05
18:0	4,35 ± 1,19ab	3,93 ± 0,68ab	4,97 ± 1,37a	2,74 ± 0,29b	≤0,05
20:0	0,14 ± 0,04	0,11 ± 0,2	0,20 ± 0,07	0,11 ± 0,03	N.S.
22:0	0,19 ± 0,04	0,14 ± 0,04	0,23 ± 0,11	0,19 ± 0,04	N.S.
Σ SAT	31,42 ± 2,1a	25,60 ± 2,4b	35,51 ± 5,6ac	37,54 ± 2,8c	≤0,05
14:1	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,01	N.S.
15:1	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02	N.S.
16:1	11,05 ± 3,55a	6,42 ± 1,72b	9,84 ± 1,94abc	14,15 ± 3,11ca	≤0,05
18:1n9	12,42 ± 2,37	12,16 ± 0,84	9,71 ± 1,87	12,73 ± 1,47	N.S.
18:1n7	3,56 ± 0,40a	2,81 ± 0,38b	3,51 ± 0,47a	3,19 ± 0,35ab	≤0,05
20:1n9	0,80 ± 0,18	0,59 ± 0,10	0,73 ± 0,18	0,68 ± 0,07	N.S.
Σ MUFA	28,07 ± 5,0ab	22,20 ± 2,7a	24,06 ± 3,9ab	31,04 ± 4,3b	≤0,05
16:3n4	0,45 ± 0,12	0,30 ± 0,08	0,36 ± 0,03	0,52 ± 0,13	N.S.
18:3n4	0,22 ± 0,07	0,21 ± 0,08	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,03	N.S.
18:3n3	0,70 ± 0,23a	12,58 ± 3,12b	0,61 ± 0,12a	0,70 ± 0,22a	≤0,05
20:4n3	0,29 ± 0,15	0,39 ± 0,21	0,67 ± 0,50	0,49 ± 0,08	N.S.
20:5n3	6,76 ± 1,47	5,92 ± 1,18	6,87 ± 3,35	4,92 ± 0,53	N.S.
22:4n3	1,3 ± 0,23	1,06 ± 0,08	1,12 ± 0,26	0,96 ± 0,07	N.S.
22:5n3	3,40 ± 0,57a	2,15 ± 0,14b	3,22 ± 0,87a	2,73 ± 0,60ab	≤0,05
22:6n3	19,08 ± 3,98	16,48 ± 2,39	18,47 ± 4,73	13,37 ± 1,49	N.S.
Σ PUFA n3	31,53 ± 5,5ab	38,60 ± 4,7a	30,96 ± 7,5ab	23,17 ± 2,0b	≤0,05
18:2n6	1,44 ± 0,33a	7,12 ± 1,62b	1,58 ± 0,25a	1,70 ± 0,29a	≤0,05
18:3n6	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,11	0,27 ± 0,11	0,11 ± 0,03	N.S.
20:2n6	0,22 ± 0,16	0,35 ± 0,14	0,28 ± 0,06	0,21 ± 0,02	N.S.
20:4n6	2,33 ± 0,34	1,58 ± 0,29	2,30 ± 0,86	2,00 ± 0,51	N.S.
22:4n6	2,03 ± 0,74	1,71 ± 0,76	1,96 ± 1,07	1,42 ± 0,43	N.S.
Σ PUFA n6	6,20 ± 0,9a	11,00 ± 1,90b	6,40 ± 0,9a	5,50 ± 0,7a	≤0,05
Σ PUFA	38,40 ± 6,00a	50,10 ± 4,40b	37,96 ± 8,00a	29,40 ± 1,60a	≤0,05
Outros	2,12 ± 0,60	2,10 ± 0,30	2,47 ± 0,10	2,07 ± 0,30	N.S.
Σ n3/ Σ n6	5,08 ± 1,4	3,60 ± 1,00	4,70 ± 1,00	4,10 ± 0,08	N.S.

Tabela 10. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) dos triglicerídios do músculo dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	3,55 ± 0,46	3,62 ± 0,27	2,62 ± 1,18	3,15 ± 0,37	N.S.
16:0	22,67 ± 1,33	20,93 ± 3,15	18,56 ± 3,40	21,98 ± 2,29	N.S.
18:0	6,56 ± 0,70a	7,94 ± 1,30a	14,10 ± 3,82b	7,10 ± 0,40a	≤0,05
20:0	0,34 ± 0,04ab	0,36 ± 0,03ab	0,41 ± 0,07a	0,32 ± 0,04b	N.S.
22:0	0,24 ± 0,09	0,30 ± 0,06	0,45 ± 0,23	0,42 ± 0,19	N.S.
Σ SAT	33,36 ± 1,08	35,28 ± 6,96	36,15 ± 0,95	32,97 ± 2,30	N.S.
16:1	10,91 ± 1,88a	8,39 ± 1,62abc	6,48 ± 2,36b	10,43 ± 1,47ac	≤0,05
18:1n9	19,23 ± 2,60a	16,63 ± 2,08abc	13,71 ± 3,59b	19,92 ± 1,73ac	≤0,05
18:1n7	3,37 ± 0,38a	2,86 ± 0,35ab	2,39 ± 0,50b	3,09 ± 0,49ab	≤0,05
20:1n9	1,54 ± 0,35a	1,39 ± 0,31a	1,00 ± 0,52b	1,80 ± 0,43a	≤0,05
Σ MUFA	35,06 ± 4,32a	29,85 ± 3,83ab	23,58 ± 6,83b	35,24 ± 3,18a	≤0,05
16:2n4	0,33 ± 0,21	0,76 ± 0,56	1,22 ± 1,45	1,40 ± 1,31	N.S.
16:3n4	0,46 ± 0,15	0,34 ± 0,11	0,24 ± 0,13	0,44 ± 0,16	N.S.
18:3n4	0,17 ± 0,05	0,21 ± 0,14	0,42 ± 0,25	0,17 ± 0,02	N.S.
18:3n3	0,60 ± 0,21a	4,22 ± 4,20b	0,87 ± 0,46a	0,66 ± 0,49a	≤0,05
18:4n3	0,22 ± 0,10a	0,68 ± 0,40ab	0,59 ± 0,22ab	1,80 ± 2,47b	≤0,05
20:4n3	0,34 ± 0,13	0,31 ± 0,14	0,45 ± 0,30	0,24 ± 0,02	N.S.
20:5n3	4,27 ± 1,11	3,34 ± 1,09	3,94 ± 1,94	2,99 ± 0,43	N.S.
22:4n3	1,06 ± 0,19	1,08 ± 0,20	1,66 ± 0,89	0,99 ± 0,06	N.S.
22:5n3	3,23 ± 0,35a	2,64 ± 0,52a	1,90 ± 0,62b	3,00 ± 0,44a	≤0,05
22:6n3	13,88 ± 1,80a	12,64 ± 2,90a	21,71 ± 8,36b	11,24 ± 1,76a	≤0,05
Σ PUFA n3	23,61 ± 3,42	23,05 ± 9,28	26,80 ± 4,78	20,92 ± 2,54	N.S.
18:2n6	1,21 ± 0,25a	3,14 ± 1,56b	1,88 ± 0,72a	0,96 ± 0,16a	≤0,05
18:3n6	0,24 ± 0,08	0,32 ± 0,11	0,46 ± 0,22	0,37 ± 0,07	N.S.
20:2n6	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,47 ± 0,42	0,17 ± 0,08	N.S.
20:4n6	2,24 ± 0,32a	1,79 ± 0,21a	3,75 ± 1,28b	2,27 ± 0,39a	≤0,05
22:2n6	0,10 ± 0,06a	0,58 ± 0,37b	0,31 ± 0,16a	0,47 ± 0,42a	≤0,05
22:4n6	0,87 ± 0,17	0,85 ± 0,25	0,88 ± 0,08	0,99 ± 0,14	N.S.
22:5n6	0,18 ± 0,08a	0,60 ± 0,29b	0,43 ± 0,10a	0,53 ± 0,35a	≤0,05
Σ PUFA n6	5,02 ± 0,57a	7,23 ± 1,90b	8,18 ± 1,47b	6,17 ± 0,63ab	≤0,05
Σ PUFA	29,42 ± 3,93	31,71 ± 10,34	36,69 ± 6,91	29,10 ± 3,72	N.S.
Outros	1,99 ± 0,56	3,03 ± 0,72	3,59 ± 1,19	2,69 ± 1,67	N.S.
Σ n3/ Σ n6	4,71 ± 0,47a	3,18 ± 0,95b	3,34 ± 0,70b	3,39 ± 0,57b	≤0,05

Tabela 11. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) dos triglicerídios das gônadas dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	4,05 ± 1,22	2,50 ± 0,85	3,21 ± 0,72	4,71 ± 2,24	N.S.
16:0	22,38 ± 2,20	20,92 ± 2,23	23,26 ± 2,63	24,77 ± 2,46	N.S.
18:0	7,85 ± 1,59	12,03 ± 3,57	10,79 ± 1,51	8,12 ± 2,66	N.S.
20:0	0,38 ± 0,10	0,36 ± 0,17	0,55 ± 0,24	0,46 ± 0,20	N.S.
Σ SAT	34,66 ± 2,66	35,81 ± 2,70	37,67 ± 3,27	38,06 ± 3,67	N.S.
16:1	9,59 ± 1,48a	5,41 ± 2,27b	6,59 ± 1,51ab	7,69 ± 3,06ab	≤0,05
18:1n9	17,85 ± 2,32	16,58 ± 1,97	16,68 ± 1,26	16,40 ± 1,68	N.S.
18:1n7	3,22 ± 0,67	2,87 ± 0,73	2,28 ± 0,85	3,25 ± 0,45	N.S.
20:1n9	1,34 ± 0,57	0,84 ± 0,20	0,63 ± 0,13	0,67 ± 0,26	N.S.
Σ MUFA	32,00 ± 2,69a	25,71 ± 3,70b	26,17 ± 1,32b	28,00 ± 3,45ab	≤0,05
16:2n4	1,00 ± 0,81	1,34 ± 0,65	2,08 ± 1,64	0,65 ± 0,38	N.S.
16:3n4	0,35 ± 0,05	0,22 ± 0,13	0,23 ± 0,02	-	N.S.
18:3n4	0,27 ± 0,09	0,39 ± 0,14	0,75 ± 0,66	0,30 ± 0,11	N.S.
18:3n3	1,07 ± 0,79a	4,25 ± 2,41b	1,94 ± 1,61a	1,35 ± 0,73a	≤0,05
18:4n3	1,05 ± 1,04	1,18 ± 0,63	1,97 ± 0,88	0,84 ± 0,69	N.S.
20:4n3	0,55 ± 0,51a	1,07 ± 0,73a	1,91 ± 0,15b	0,51 ± 0,29a	≤0,05
20:5n3	3,77 ± 1,19	3,60 ± 0,82	3,67 ± 1,48	4,54 ± 1,34	N.S.
22:4n3	1,01 ± 0,33	0,98 ± 0,43	0,82 ± 0,49	1,12 ± 0,31	N.S.
22:5n3	3,03 ± 0,82a	1,62 ± 0,40b	1,47 ± 0,78b	2,08 ± 1,02ab	≤0,05
22:6n3	12,49 ± 2,77	10,90 ± 3,00	8,64 ± 3,27	12,46 ± 0,90	N.S.
Σ PUFA n3	22,96 ± 4,40	23,60 ± 4,02	21,10 ± 5,35	22,90 ± 1,15	N.S.
18:2n6	2,08 ± 1,19	4,61 ± 1,78	3,85 ± 2,27	3,82 ± 2,55	N.S.
18:3n6	0,49 ± 0,20	0,60 ± 0,29	0,73 ± 0,49	0,76 ± 0,52	N.S.
20:2n6	0,91 ± 0,87a	1,24 ± 0,53ab	2,00 ± 0,45b	0,54 ± 0,34a	≤0,05
20:4n6	2,90 ± 1,06	3,82 ± 1,90	2,93 ± 1,46	2,81 ± 0,99	N.S.
22:4n6	0,85 ± 0,42	0,86 ± 0,58	0,63 ± 0,42	0,90 ± 0,28	N.S.
22:5n6	0,82 ± 0,45	1,21 ± 0,80	1,42 ± 0,32	0,54 ± 0,38	N.S.
Σ PUFA n6	8,05 ± 1,76a	12,34 ± 3,01b	11,58 ± 1,68ab	9,23 ± 1,40ab	≤0,05
Σ PUFA	32,57 ± 1,59a	37,80 ± 3,88b	34,94 ± 4,05ab	33,12 ± 0,85ab	≤0,05
Outros	0,78 ± 0,35	0,69 ± 0,17	1,22 ± 0,69	0,81 ± 0,18	N.S.
Σ n3/ Σ n6	3,28 ± 1,55	2,02 ± 0,66	1,89 ± 0,62	2,30 ± 0,50	N.S.

Tabela 12. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) totais do plasma sanguíneo da coleta inicial dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	1,30 ± 0,19	1,62 ± 0,36	1,52 ± 0,53	1,93 ± 1,41	N.S.
16:0	19,88 ± 1,86	20,70 ± 1,10	20,44 ± 0,51	21,01 ± 1,82	N.S.
18:0	7,90 ± 1,13	6,04 ± 0,38	6,32 ± 0,73	5,94 ± 1,38	N.S.
20:0	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,17 ± 0,06	0,19 ± 0,08	N.S.
22:0	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,07	0,24 ± 0,06	N.S.
Σ SAT	29,08 ± 2,18	28,73 ± 0,99	28,70 ± 1,66	29,3 ± 1,50	N.S.
16:1	3,49 ± 0,33	3,71 ± 0,68	3,35 ± 0,32	4,96 ± 0,98	N.S.
18:1n9	8,23 ± 1,47	8,08 ± 0,61	6,86 ± 0,70	9,79 ± 1,26	N.S.
18:1n7	1,95 ± 0,25	1,75 ± 0,12	1,56 ± 0,11	2,20 ± 0,27	N.S.
20:1n9	0,65 ± 0,15	0,70 ± 0,29	0,59 ± 0,46	0,81 ± 0,27	N.S.
Σ MUFA	14,85 ± 1,78	14,24 ± 1,26	12,35 ± 1,29	17,8 ± 0,70	N.S.
16:2n4	0,41 ± 0,13	0,34 ± 0,08	0,35 ± 0,04	0,28 ± 0,04	N.S.
16:3n4	0,26 ± 0,09	0,20 ± 0,07	0,20 ± 0,04	0,27 ± 0,08	N.S.
18:3n4	0,26 ± 0,10	0,27 ± 0,07	0,26 ± 0,04	0,22 ± 0,06	N.S.
18:3n3	0,92 ± 0,09	1,21 ± 0,17	0,94 ± 0,42	1,02 ± 0,40	N.S.
20:4n3	0,36 ± 0,20	0,52 ± 0,29	1,09 ± 0,67	0,31 ± 0,20	N.S.
20:5n3	11,36 ± 0,87	10,80 ± 1,02	11,80 ± 1,38	9,71 ± 4,15	N.S.
22:4n3	1,04 ± 0,12	1,00 ± 0,17	1,09 ± 0,14	0,89 ± 0,13	N.S.
22:5n3	1,45 ± 0,27	1,26 ± 0,17	1,39 ± 0,24	2,03 ± 0,73	N.S.
22:6n3	26,37 ± 2,03	26,56 ± 1,42	27,16 ± 0,82	24,73 ± 2,16	N.S.
Σ PUFA n3	41,76 ± 2,38	41,35 ± 1,96	43,47 ± 1,72	38,7 ± 3,60	N.S.
18:2n6	1,71 ± 0,44	2,01 ± 0,27	1,44 ± 0,32	1,65 ± 0,53	N.S.
18:3n6	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,39 ± 0,13	N.S.
20:2n6	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,05	0,62 ± 0,91	0,20 ± 0,02	N.S.
20:4n6	5,48 ± 0,93	5,40 ± 0,79	5,03 ± 0,51	5,73 ± 2,44	N.S.
22:2n6	0,28 ± 0,12	0,26 ± 0,06	0,32 ± 0,14	0,22 ± 0,08	N.S.
22:4n6	3,97 ± 1,02	4,75 ± 1,00	4,61 ± 1,55	3,27 ± 1,87	N.S.
Σ PUFA n6	11,94 ± 1,74	12,91 ± 1,59	12,41 ± 2,26	11,5 ± 3,90	N.S.
Σ PUFA	54,28 ± 3,66	55,06 ± 2,19	56,68 ± 2,89	50,9 ± 1,30	N.S.
Outros	1,79 ± 0,17	1,97 ± 0,31	2,26 ± 0,42	2,0 ± 1,40	N.S.
Σ n3/ Σ n6	3,51 ± 0,39	3,24 ± 0,43	3,59 ± 0,68	3,8 ± 1,70	N.S.

Tabela 13. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) totais do plasma sanguíneo da coleta intermediária dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	1,17 ± 0,32a	1,22 ± 0,21a	1,40 ± 0,28a	2,15 ± 0,66b	≤0,05
16:0	20,39 ± 1,16	19,58 ± 1,54	20,18 ± 2,09	21,47 ± 2,27	N.S.
18:0	7,74 ± 0,14	7,45 ± 1,15	6,97 ± 1,31	7,68 ± 0,68	N.S.
20:0	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,03	N.S.
22:0	0,18 ± 0,08	0,17 ± 0,09	0,19 ± 0,08	0,21 ± 0,08	N.S.
Σ SAT	29,61 ± 1,02	28,91 ± 1,08	28,86 ± 2,17	31,62 ± 3,00	N.S.
16:1	3,68 ± 0,48	3,29 ± 1,36	3,43 ± 0,62	4,34 ± 1,25	N.S.
18:1n9	8,41 ± 3,62	7,73 ± 0,98	6,64 ± 1,33	7,84 ± 0,65	N.S.
18:1n7	1,82 ± 0,24	1,56 ± 0,33	1,70 ± 0,14	1,71 ± 0,10	N.S.
20:1n9	0,39 ± 0,15	0,40 ± 0,12	0,25 ± 0,23	0,31 ± 0,09	N.S.
Σ MUFA	14,30 ± 4,12	12,89 ± 2,27	12,02 ± 2,04	14,21 ± 1,66	N.S.
16:2n4	0,49 ± 0,18	0,37 ± 0,07	0,36 ± 0,15	0,47 ± 0,14	N.S.
16:3n4	0,24 ± 0,09	0,13 ± 0,04	0,22 ± 0,07	0,22 ± 0,07	N.S.
18:3n4	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,06	0,32 ± 0,06	0,22 ± 0,06	N.S.
18:3n3	0,94 ± 0,38a	4,44 ± 1,92b	0,92 ± 0,44a	1,11 ± 0,36a	≤0,05
20:4n3	0,40 ± 0,22	0,34 ± 0,14	0,55 ± 0,19	0,23 ± 0,08	N.S.
20:5n3	9,49 ± 1,56a	8,62 ± 1,99a	12,15 ± 1,94b	8,91 ± 0,96a	≤0,05
22:4n3	1,28 ± 0,19	1,16 ± 0,13	1,24 ± 0,26	1,28 ± 0,04	N.S.
22:5n3	1,47 ± 0,20	1,25 ± 0,36	1,41 ± 0,23	1,48 ± 0,30	N.S.
22:6n3	26,72 ± 4,21	24,41 ± 1,11	26,48 ± 2,22	25,98 ± 0,82	N.S.
Σ PUFA n3	40,31 ± 5,59	40,48 ± 3,36	42,76 ± 2,46	39,00 ± 0,72	N.S.
18:2n6	2,16 ± 1,51ab	4,80 ± 1,37a	1,57 ± 0,54b	1,81 ± 0,23ab	≤0,05
18:3n6	0,41 ± 0,12	0,40 ± 0,16	0,36 ± 0,13	0,37 ± 0,04	N.S.
20:2n6	0,33 ± 0,33	0,26 ± 0,19	0,51 ± 0,08	0,13 ± 0,02	N.S.
20:4n6	5,97 ± 0,80	5,62 ± 1,46	5,48 ± 0,32	5,90 ± 0,18	N.S.
22:2n6	0,34 ± 0,27	0,32 ± 0,18	0,54 ± 0,57	0,17 ± 0,02	N.S.
22:4n6	3,98 ± 1,22	4,67 ± 0,44	5,02 ± 1,00	4,25 ± 1,38	N.S.
Σ PUFA n6	13,20 ± 1,56	15,49 ± 1,55	13,49 ± 1,63	12,62 ± 1,53	N.S.
Σ PUFA	54,51 ± 4,52	56,78 ± 2,81	57,15 ± 3,79	52,52 ± 2,87	N.S.
Outros	3,12 ± 0,73	2,64 ± 0,42	3,20 ± 0,33	3,12 ± 0,34	N.S.
Σ n3/ Σ n6	1,58 ± 0,34	1,42 ± 0,16	1,98 ± 0,32	1,64 ± 0,40	N.S.

Tabela 14. *Epinephelus marginatus*. Perfil dos ácidos graxos (AG) (%) totais do plasma sanguíneo da coleta final dos animais experimentais.

AG	S	OL	OP	OC	P
14:0	1,57 ± 0,516a	1,43 ± 0,24a	1,61 ± 0,27a	3,35 ± 2,01b	≤0,05
16:0	22,87 ± 2,51	20,90 ± 1,84	22,02 ± 2,16	22,90 ± 1,13	N.S.
18:0	7,51 ± 1,37	8,00 ± 1,87	7,09 ± 1,82	6,64 ± 0,54	N.S.
20:0	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,22 ± 0,12	0,12 ± 0,03	N.S.
22:0	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,17 ± 0,07	N.S.
Σ SAT	32,27 ± 1,76	30,64 ± 1,46	31,15 ± 1,16	33,17 ± 3,21	N.S.
16:1	4,65 ± 1,39	3,66 ± 1,28	4,03 ± 0,71	5,25 ± 0,90	N.S.
18:1n9	8,06 ± 1,30	8,05 ± 0,70	8,57 ± 1,21	8,21 ± 0,72	N.S.
18:1n7	1,93 ± 0,25	1,63 ± 0,35	1,99 ± 0,17	1,93 ± 0,31	N.S.
20:1n9	0,42 ± 0,11	0,33 ± 0,14	0,44 ± 0,09	0,52 ± 0,16	N.S.
Σ MUFA	15,00 ± 2,53	13,66 ± 2,38	15,02 ± 1,94	15,92 ± 1,90	N.S.
16:2n4	0,53 ± 0,29	0,52 ± 0,20	0,33 ± 0,13	0,52 ± 0,08	N.S.
16:3n4	0,21 ± 0,07	0,19 ± 0,08	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,03	N.S.
18:3n4	0,28 ± 0,07	0,26 ± 0,06	0,30 ± 0,12	0,25 ± 0,11	N.S.
18:3n3	0,70 ± 0,16a	3,56 ± 1,56b	1,13 ± 0,27a	0,61 ± 0,20a	≤0,05
20:4n3	0,30 ± 0,15	0,21 ± 0,09	0,41 ± 0,20	0,20 ± 0,08	N.S.
20:5n3	7,63 ± 2,30	7,91 ± 1,92	7,84 ± 3,21	9,08 ± 1,48	N.S.
22:4n3	1,29 ± 0,16	1,29 ± 0,16	1,24 ± 0,10	1,23 ± 0,31	N.S.
22:5n3	1,51 ± 0,40	1,24 ± 0,43	1,50 ± 0,19	1,63 ± 0,35	N.S.
22:6n3	25,32 ± 2,12	24,25 ± 1,30	26,20 ± 3,64	23,77 ± 2,96	N.S.
Σ PUFA n3	36,78 ± 3,87	38,46 ± 3,52	38,32 ± 4,35	36,06 ± 2,07	N.S.
18:2n6	1,51 ± 0,17a	3,51 ± 1,67b	1,85 ± 0,39a	1,50 ± 0,28a	≤0,05
18:3n6	0,55 ± 0,12	0,56 ± 0,07	0,50 ± 0,11	0,43 ± 0,10	N.S.
20:2n6	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,29 ± 0,09	0,19 ± 0,02	N.S.
20:4n6	6,95 ± 0,79	6,00 ± 1,62	5,37 ± 0,85	6,13 ± 1,86	N.S.
22:2n6	0,16 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,25 ± 0,05	0,11 ± 0,04	N.S.
22:4n6	3,92 ± 0,60	4,16 ± 0,95	4,55 ± 0,82	3,23 ± 1,5	N.S.
Σ PUFA n6	13,10 ± 1,45	14,58 ± 1,25	12,79 ± 1,58	11,58 ± 3,33	N.S.
Σ PUFA	50,93 ± 3,58	54,01 ± 2,79	51,99 ± 2,86	49,07 ± 5,23	N.S.
Outros	1,71 ± 0,31	1,69 ± 0,10	1,83 ± 0,35	1,84 ± 0,40	N.S.
Σ n3/ Σ n6	2,84 ± 0,56	2,66 ± 0,41	3,06 ± 0,68	3,34 ± 1,05	N.S.

Tabela 15. Resumo dos dados brutos provenientes do sequenciamento por Illumina Miseq®, dados após os processos de *apara* e montagem *de novo*, utilizando *software* CLC Main Workbench, do tecido hepático de *E. marginatus*.

	<i>Total</i>
<i>Illumina Miseq</i>	
Número de <i>reads</i>	52.022.852
Nucleotídeos (Gb)	10.45
Média de comprimento dos <i>reads</i> (pb)	200.9
<i>Após apara</i>	
Número de <i>reads</i>	51.931.408
Nucleotídeos (Gb)	9.93
Média de comprimento dos <i>reads</i> (pb)	191.2
<i>Montagem De novo</i>	
<i>Contigs</i>	92.887
Média de comprimento dos <i>contigs</i> (pb)	646
N50	1.029

Figuras

Figura 3 – Estruturas construídas e adequadas para a realização do experimento no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar). (A) Sistema de captação de água, (B) sistemas de filtragem, (C) tanques experimentais e (D) base experimental.

Figura 4 – Preparação do alimento ofertado aos animais (A) Sardinha decapitada e eviscerada, (B) óleos experimentais utilizados na suplementação das diferentes dietas, (C) inserção de cápsula de óleo na cavidade abdominal da sardinha e (D) exemplar adulto durante coleta do sangue.

Figura 5 – *Epinephelus marginatus*. Concentração lipídica nos tecidos (mg/g) e no plasma sanguíneo (mg/mL). A) Fígado, B) Músculo, C) Gônadas, D) Plasma- coleta inicial, E) Plasma- coleta intermediária e F) Plasma- coleta final. (S) sardinha, (OL) óleo de linhaça, (OP) óleo de peixe e (OC) óleo de coco.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (P<0,05).

Figura 6 – *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos dos fosfolipídios do fígado. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácido graxo 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (P<0,05).

Figura 7 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos dos fosfolipídios do músculo. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácido graxo 22:6n3.

^{abc} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Figura 8 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos dos fosfolipídios das gônadas. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácido graxo 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Figura 9 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos dos triglicerídios do fígado. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácidos graxos 18:3n3 e 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Figura 10 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos dos triglicerídios do músculo. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácidos graxos 18:3n3 e 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (P<0,05).

Figura 11 - *Epinephelus marginatus* percentual de ácidos graxos dos triglicerídios das gônadas. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácidos graxos 18:3n3 e 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Figura 12 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos totais do plasma da coleta inicial. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácidos graxos 22:6n3.

Figura 13 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos totais do plasma da coleta intermediária. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácidos graxos 18:3n3 e 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Figura 14 - *Epinephelus marginatus*. Percentual de ácidos graxos totais do plasma da coleta final. **A)** Ácidos graxos saturados (SAT) e monoinsaturados (MUFA), **B)** Ácidos graxos polinsaturados (PUFA totais), **C)** Ácidos graxos da série n3 e série n6 dos PUFA, **D)** Razão n3/n6, **E)** Ácidos graxos 18:3n3 e 22:6n3.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($P < 0,05$).

Figura 15. *E. marginatus*. Distribuição da média dos *scores* de qualidade (PHRED) das seqüências brutas provenientes do sequenciamento por Illumina Miseq® do tecido hepático de *E. marginatus*.

Figura 16. *E. marginatus*. Distribuição da média de comprimento dos *reads* provenientes do sequenciamento por Illumina Miseq® do tecido hepático de *E. marginatus* antes e após *trimming* (apara) utilizando software CLC Genomic Workbench.

Figura 17. *E. marginatus*. Distribuição do tamanho (pb) dos *contigs* gerados pelo montagem *de novo* do sequenciamento por Illumina Miseq® do tecido hepático de *E. marginatus*, utilizando software CLC Genomics Workbench.

Figura 18. *Epinephelus marginatus*. Resumo dos resultados de anotação funcional (número de seqüências) do sequenciamento por Illumina Miseq® do tecido hepático de *E. marginatus* gerados pelo software Blast2GO. (A) Contra banco de dados de proteínas de zebrafish (*Danio rerio*) e (B) contra banco de proteínas de fugu (*Takifugu rubripes*).

Figura 19. *Epinephelus marginatus*. Percentual de anotações funcionais do sequenciamento por Illumina Miseq[®] do tecido hepático de *E. marginatus* usando software Blast2GO de acordo com processo biológico, função molecular e componente celular. (A) Contra banco de dados de proteínas de *zebrafish* (*Danio rerio*) e (B) contra banco de proteínas de fugu (*Takifugu rubripes*).

Figura 20. *Epinephelus marginatus*. Número de sequências funcionalmente anotadas do sequenciamento por Illumina Miseq® do tecido hepático de *E. marginatus* usando software Blast2GO de acordo com (A) processo biológico, (B) função molecular e (C) componente celular, contra banco de dados de proteínas de zebrafish (*Danio rerio*) e fugu (*Takifugu rubripes*).

Figura 21 - *Epinephelus marginatus* – Níveis da expressão relativa (log2 do Ct normalizado por endógeno EF1α) dos genes hepáticos relacionados com a síntese, *FAS* (*Fatty Acid Synthase*), *ACC* (*Acetyl CoA Carboxylase*), *SCD* (*Stearoyl CoA Desaturase*), *ELOVL5* (*elongase 5*) e β-oxidação de ácidos graxos, *CPT1a* (*Carnitine Palmitoyltransferase* tipo1a), *ACADVL* (*Acyl CoA Dehydrogenase very long chain*) e *ACOX* (*Acyl-CoA Oxidase*) nos animais dos diferentes grupos experimentais.

^{ab} Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (P<0,05)

Anexos

Anexo 1 – Parâmetros de Qualidade da Água

Tabela A. Média mensal das concentrações de nitrito, nitrato (ppm) na água dos tanques experimentais.

	Nitrito (ppm)						Nitrato (ppm)					
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
S	0,1±0,0	N.D.	0,1±0,0	0,4±0,2	N.D.	0,1±0,0	N.D.	N.D.	N.D.	0,1±0,0	N.D.	0,1±0,1
OL	0,1±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1	0,4±0,2	0,1±0,0	0,1±0,0	N.D.	N.D.	0,1±0,2	0,4±0,2	0,1±0,1	0,1±0,1
OP	0,4±0,2	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	N.D.	N.D.	0,1±0,1	0,2±0,1	N.D.	0,1±0,0
OC	N.D.	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,5±0,0	0,1±0,0	N.D.	N.D.	0,3±0,0	0,4±0,2	N.D.	N.D.

S – grupo sardinha; OL – grupo óleo de linhaça; OP – grupo óleo de peixe; OC – grupo óleo de coco; Out – outubro; Nov – novembro; Dez - dezembro; Jan – Janeiro; Fev – Fevereiro; Mar – março; N.D. – não detectado; ppm – partes por milhão.

Tabela B. Média mensal das concentrações de amônia e fosfato (ppm) na água dos tanques experimentais.

	Amônia (ppm)						Fosfato (ppm)					
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
S	0,6±0,3	0,8±0,2	0,8±0,2	1,2±0,6	0,2±0,2	0,7±0,5	0,4±0,0	0,2±0,2	0,1±0,1	0,5±0,1	0,3±0,2	0,4±0,0
OL	0,5±0,0	0,8±0,3	0,3±0,1	0,7±0,4	0,6±0,5	0,3±0,1	0,4±0,0	0,2±0,0	0,1±0,1	0,5±0,2	0,3±0,2	0,4±0,2
OP	0,3±0,0	0,6±0,3	0,8±0,3	0,4±0,0	0,9±0,1	N.D.	0,2±0,0	0,4±0,3	0,3±0,1	0,4±0,3	0,5±0,2	0,1±0,0
OC	0,5±0,0	0,5±0,0	0,8±0,3	0,9±0,0	0,2±0,2	N.D.	0,6±0,0	0,1±0,0	0,1±0,1	0,6±0,3	0,4±0,3	0,1±0,1

S – grupo sardinha; OL – grupo óleo de linhaça; OP – grupo óleo de peixe; OC – grupo óleo de coco; Out – outubro; Nov – novembro; Dez - dezembro; Jan – Janeiro; Fev – Fevereiro; Mar – março; ppm – partes por milhão.

Tabela C. Média mensal de pH, alcalinidade e salinidade (ppm) da água dos tanques experimentais.

pH							Alcalinidade (ppm)						Salinidade (ppm)					
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
S	7,8±0,0	7,8±0,1	7,8±0,1	7,8±0,1	8,0±0,1	7,8±0,2	1,9±0,2	1,8±0,1	1,7±0,1	1,8±0,0	1,7±0,0	1,7±0,0	35±0,8	37±2,3	39±1,1	40±0,8	37±1,1	39±1,0
OL	7,8±0,0	7,8±0,1	7,7±0,2	7,8±0,2	7,9±0,2	7,6±0,0	1,9±0,1	1,8±0,2	1,7±0,2	1,8±0,2	1,7±0,2	1,7±0,0	35±0,5	37±2,4	39±1,0	40±1,4	37±1,5	37±0,0
OP	7,8±0,0	7,8±0,1	7,7±0,2	7,8±0,1	7,9±0,1	7,6±0,1	1,9±0,0	1,8±0,1	1,7±0,2	1,8±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	35±1,0	37±2,9	39±0,8	40±0,5	38±0,8	38±0,7
OC	7,8±0,1	7,9±0,1	7,7±0,2	7,6±0,2	8,0±0,1	7,9±0,1	1,9±0,1	1,8±0,1	1,7±0,2	1,8±0,2	1,7±0,1	1,8±0,1	35±1,2	37±2,4	39±0,8	40±1,0	39±0,0	39±0,0

S – grupo sardinha; OL – grupo óleo de linhaça; OP – grupo óleo de peixe; OC – grupo óleo de coco; Out – outubro; Nov – novembro; Dez - dezembro; Jan – Janeiro; Fev – Fevereiro; Mar – março; ppm – partes por milhão.

Tabela D. Média mensal de temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) na água dos grupos experimentais.

	Temperatura (°C)						Oxigênio Dissolvido (mg/L)					
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
S	22,5±0,5	22,6±1,3	23,5±0,9	24,1±0,6	24,4±0,1	24,3±0,1	8,4±0,3	8,1 ±0,2	8,2±0,4	7,5± 0,7	8,0±0,7	7,7±0,6
OL	22,4±0,5	22,5±1,3	23,6±0,8	24,1±0,4	25,8±0,2	24,9±0,2	8,4±0,4	8,2±0,4	7,9±0,6	7,8±0,7	7,7±0,8	7,6±0,7
OP	22,5±0,6	22,6±1,3	23,6±0,3	24,1±0,7	24,5±0,1	24,8±0,1	8,3±0,5	8,1±0,6	7,8±0,8	7,7±1,0	7,6±0,8	7,6±0,5
OC	22,6 ±0,7	22,5±1,4	24,8±0,6	24,6±0,9	25,6±0,1	24,9±0,1	8,1±0,8	8,1±0,9	7,5±1,1	7,6±0,9	7,7±0,8	7,7±0,6

S – grupo sardinha; OL – grupo óleo de linhaça; OP – grupo óleo de peixe; OC – grupo óleo de coco; Out – outubro; Nov – novembro; Dez - dezembro; Jan – Janeiro; Fev – Fevereiro; Mar – março; ppm – partes por milhão.

Anexo 2 - Resultados Qualidade do RNA (Bioanalyzer)

Anexo 2 – *E. marginatus*. Número de integridade do RNA (RIN) do pool de RNA do tecido hepático de todos os animais experimentais em diferentes concentrações, gerados por 2100 Bioanalyzer.