



AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO NEUROPEPTÍDEO Y DURANTE 24 HORAS NO LINGUADO *Paralichthys orbignyanus*

CAMPOS, Vinicius Farias^{1*}; COLLARES, Thaís¹; KAEFER, Cristian¹; LEON, Priscila Marques¹; LANES, Carlos Frederico²; SANDRINI, Juliana²; MARINS, Luis Fernando²; OKAMOTO, Marcelo³; SAMPAIO, Luis Andre³; DESCHAMPS, João Carlos¹; COLLARES, Tiago¹; ROBALDO, Ricardo Berteaux⁴

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

²Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

³Laboratório de Piscicultura Marinha, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

⁴Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

*Autor para correspondência: Tel (53) 3275 7350
E-mail: vcampos_ib@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O controle da fome em vertebrados é um processo que envolve várias rotas neurais e endócrinas, onde o neuropeptídeo Y (NPY) desempenha um papel chave. Este neurotransmissor é abundantemente expresso no sistema nervoso onde atua como um dos mais potentes indutores da fome em mamíferos (Chee & Colmers, 2008). Os efeitos estimulatórios na ingestão de alimento causados por injeções centrais de NPY têm sido demonstrados em várias espécies de peixes (Aldegunde & Mancebo, 2006). Recentemente foi demonstrado que a expressão do RNAm do NPY é significativamente aumentada em torno do momento de alimentação no bacalhau (Kehoe & Volkoff, 2007) e no peixe dourado (Narnaware et al., 2000). Também tem sido demonstrado que a restrição alimentar altera os níveis de RNA mensageiro do NPY, como demonstrado em arraiais, onde duas semanas de jejum aumentam significativamente estes níveis (MacDonald & Volkoff, 2009a). Por outro lado, seis dias de jejum não alteram a expressão gênica do NPY no salmão (Murashita et al., 2009). Apesar destes avanços, o presente conhecimento sobre a regulação da fome em peixes é limitado e baseado em poucas espécies e ainda, evidências recentes sugerem diferenças espécies-específicas (Volkoff et al., 2009).

O linguado *Paralichthys orbignyanus* torna-se um interessante modelo experimental por ser a espécie com maior valor econômico na região sul do Brasil e com alto potencial produtivo (Lanes et al., 2008). Entretanto, a regulação da ingestão de alimentos nesta espécie ainda não foi examinada assim como o papel do NPY neste processo, com isso o este conhecimento poderá contribuir para o a melhora da cultura em cativeiro do linguado.

Este trabalho objetivou avaliar o papel do NPY na regulação da alimentação analisando a expressão gênica deste gene no cérebro de linguados durante um período de 24 horas através de PCR em tempo real.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Os peixes usados neste estudo foram obtidos de desova artificial no Laboratório de Piscicultura Marinha na Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Para avaliar a expressão gênica do NPY durante 24 horas os animais foram alocados em sete tanques com 5 animais em cada e foram aclimatados durante 2 semanas em água do mar. Os peixes foram alimentados com pellets comerciais (Supra Salmonídeos™/Alisul/Brasil) contendo 46% de proteína bruta e 6% de lipídeos, uma vez ao dia (17:00) sob temperatura natural do inverno ($15 \pm 3^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (11L: 13D). A expressão foi avaliada em sete diferentes tempos (0 – 10 minutos antes da alimentação, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após a alimentação).

2.2. Avaliação da expressão durante 24 h do NPY no cérebro por PCR em tempo real

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 mg.L^{-1}) e eutanasiados pela roptura da medula espinhal e após o cérebro foi imediatamente dissecado, congelado e armazenado em nitrogênio líquido até o uso. O RNA total foi isolado usando TRIzol® (Invitrogen™, USA) e o tratamento com DNase foi realizado com o kit DNA-free® (Ambion™, USA) seguindo as instruções do fabricante. Duas microgramas do RNA foram usadas para a síntese de cDNA realizada com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems™, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Primers para o NPY do linguado (GenBank nº **FJ705358**) e para a referência endógena β -actina (GenBank nº **EU542580**) foram desenhados no software Primer Express v. 3.0 (Applied Biosystems™, USA). Experimentos iniciais foram realizados para garantir que os primers construídos possuíam eficiências equivalentes. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 10 min., seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C for 1 min. seguido pelas condições para calcular a curva de dissociação. Cada amostra de cDNA foi avaliada em triplicata. Os dados da PCR em tempo real fora analisados usando o método conhecido como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de acordo com Livak and Schmittgen (2001).

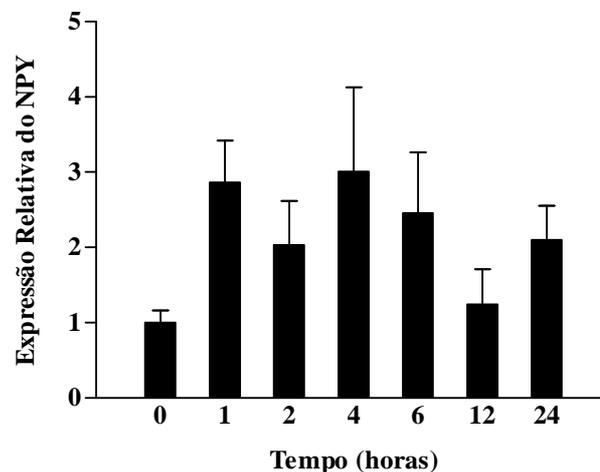
2.3. Análise dos dados

A expressão gênica do NPY durante as 24 h foi comparada usando análise de variância seguida do teste de Tukey. Níveis de significância foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Todos os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o nosso conhecimento, neste trabalho é demonstrada pela primeira vez, em peixes, a avaliação da expressão gênica do NPY durante um período de 24 horas após a alimentação. Os resultados deste estudo, realizado durante o inverno, demonstrou que não existem diferenças significativas nos níveis de RNA mensageiro durante o período de avaliação (Figura 1). Estes resultados sugerem que o NPY pode não ter ação em curto prazo na regulação da fome no linguado, contrastando com relatos anteriores no peixe dourado, onde a expressão do NPY no hipotálamo é aumentada 1-3 horas antes da alimentação e diminui 1-3 após a alimentação (Narnaware et al., 2000).

Figura 1. Avaliação da expressão gênica do NPY no cérebro do linguado através da PCR em tempo real durante um período de 24 horas. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5).



Fatores como a temperatura podem diminuir a ingestão de alimento e modificar a fisiologia digestiva em várias espécies de peixes. O linguado é uma espécie euritérmica que sofre severas flutuações de temperatura no ambiente e pode sobreviver numa ampla gama de temperaturas, alimentando-se normalmente entre 10 e 27°C (Wasielisky et al., 1997). Entretanto, a temperatura adequada para o crescimento desta espécie em cativeiro é em torno de 23°C (Bianchini et al. 2005). No presente estudo a baixa temperatura ($15 \pm 3^\circ\text{C}$) pode ter aumentado o tempo para a digestão e absorção do alimento e este fato pode ter influenciado os níveis do RNA mensageiro do NPY. Recentemente foi demonstrado que diferentes temperaturas diminuem a ingestão de alimento no bacalhau, mas não os níveis de RNA mensageiro no NPY (Kehoe & Volkoff, 2008). Outra espécie de peixe pleuronectiforme, o *Pleuronectes americanus* interrompe completamente a alimentação durante o inverno e também não cresce durante os meses desta estação (Stoner et al., 1999) e ainda a expressão do NPY no hipotálamo também não é alterada pelo jejum no inverno (MacDonald & Volkoff, 2009b). Com isso, baixas temperaturas podem reduzir a atividade de alimentação, fazendo com que a expressão do NPY fique inalterada.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de RNA mensageiro do NPY durante um período de 24 horas após a alimentação. Nossos resultados sugerem que o linguado requer mais do que 24 horas para alterar a expressão gênica no NPY em baixas temperaturas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDEGUNDE, M., MANCEBO, M. Effects of neuropeptide Y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Peptides**, v. 27, p. 719-727, 2006.
- BIANCHINI, A., ROBALDO, R.B., SAMPAIO, L.A. O cultivo do linguado *Paralichthys orbignyanus*, in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Ed. UFSM, Santa Maria, pp. 445-470. 2005.
- CHEE, M.J., COLMERS, W.S. Y eat? **Nutrition**, v. 24, p. 869-877, 2008.
- KEHOE, A.S., VOLKOFF, H. Cloning and characterization of neuropeptide Y (NPY) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 146, p. 451-461, 2007.
- KEHOE, A.S., VOLKOFF, H. The effects of temperature on feeding and expression of two appetite-related factors, neuropeptide Y and cocaine- and amphetamine-regulated transcript, in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 39, p. 790-796, 2008.
- LANES, C.F.C., OKAMOTO, M., CAVALCANTI, P.V., COLLARES, T., CAMPOS, V.F., DESCHAMPS, J.C., ROBALDO, R.B., MARINS, L.F., SAMPAIO, L.A. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. **Aquaculture**, v. 275, p. 361-365, 2008.
- LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MACDONALD, E., VOLKOFF, H. Cloning, distribution and effects of season and nutritional status on the expression of neuropeptide Y (NPY), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **Hormones and Behavior**, v. 56, p. 58-65, 2009b.
- MACDONALD, E., VOLKOFF, H. Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Raja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, p. 252-261, 2009a.
- MURASHITA, K., KUROKAWA, T., EBBERSSON, L.O.E., STEFANSSON, S.O., RØNNESTAD, I. Characterization, tissue distribution, and regulation of agouti-related protein (AgRP), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), and neuropeptide Y (NPY) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 162, p. 160-171, 2009.
- NARNAWARE, Y.K., PEYON, P.P., LIN, X., PETER, R.E., Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. R1025-R1034, 2000.
- STONER, A.W., BEJDA, A.J., MANDERSON, J.P., PHELAN, B.A., STEHLIK, L.L., PESSUTTI, J.P. Behavior of winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*,

during the reproductive season: laboratory and field observations on spawning, feeding, and locomotion. **Fish Bulletin**. v. 97, p. 999-1016, 1999.

VOLKOFF, H., XU, M., MACDONALD, E., HOSKINS L. Aspects of the hormonal regulation of appetite in fish with emphasis on goldfish, Atlantic cod and winter flounder: Notes on actions and responses to nutritional, environmental and reproductive changes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 153, p. 8-12, 2009.

WASIELESKY, W.J., BIANCHINI, A., MIRANDA, F.K. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. **Frente Marítimo**, v. 17, p. 43-48, 1998.