



RAQUEL TATIANE PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE
GASTRINA, COLECISTOQUININA,
NEUROPEPTÍDEO Y E PEPTÍDEO
RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA
NO SISTEMA DIGESTÓRIO DO DOURADO
*Salminus brasiliensis***

LAVRAS-MG

2012

RAQUEL TATIANE PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE
GASTRINA, COLECISTOQUININA,
NEUROPEPTÍDEO Y E PEPTÍDEO
RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA
NO SISTEMA DIGESTÓRIO DO DOURADO**

Salminus brasiliensis

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção e Nutrição de Não Ruminantes/Piscicultura, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profª. Dra. Priscila Vieira e Rosa

Coorientadores

Prof. Dr. Fabricio Andrés Vigliano

Dr. Daniel Okamura

LAVRAS-MG

2012

**Ficha catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pereira, Raquel Tatiane.

Caracterização imunofenotípica de gastrina, colecistoquinina, neuropeptídeo Y e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina no sistema digestório do dourado *Salminus brasiliensis* / Raquel Tatiane Pereira. – Lavras : UFLA, 2012.

96 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Priscila Vieira Rosa.

Bibliografia.

1. Peptídeos. 2. Peixes. 3. Células endócrinas. 4. Intestino. 5. Imunohistoquímica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.375204132

RAQUEL TATIANE PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE GASTRINA,
COLECISTOQUININA, NEUROPEPTÍDEO Y E PEPTÍDEO
RELACIONADO AO GENE DA CALCITONINA NO SISTEMA
DIGESTÓRIO DO DOURADO *Salminus brasiliensis***

APROVADA em 3 de agosto de 2012

Dra. Priscila Vieira e Rosa	UFLA
Dr. Luis David Solis Murgas	UFLA
Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dr. Márcio Zangerônimo	UFLA
Dr. Enio Ferreira	UFMG

Profa. Dra. Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

LAVRAS-MG

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e proteção.

Aos meus queridos pais Vander e Diva, luz do meu viver, que com muito amor, paciência, esforço e dedicação guiam meus caminhos e são a razão principal desta conquista.

Às minhas irmãs Eliane e Vânia por estarem sempre ao meu lado. E aos meus sobrinhos Gabriel e Pedro Henrique que muito me divertem. Aos meus cunhados Alexandre e Ernani pelo apoio e amizade. A toda minha família pelo carinho.

À UFLA e ao Departamento de Zootecnia pela formação acadêmica e profissional.

A todos os professores, em especial a minha orientadora Priscila Vieira e Rosa, exemplo de professora e pesquisadora, pela oportunidade, incentivo, compreensão e cumplicidade.

Ao meu coorientador Fabricio Vigliano que me ensinou a técnica de imuno e muitíssimas outras coisas sempre com dedicação e paciência.

Aos meus fiéis escudeiros Jamile da Costa Araújo, Leandro Santos Costa, Maria Júlia Spini Logato e Tainára Mendes sem os quais este trabalho nunca teria sido realizado.

A todos os grandes amigos que fiz em Casilda – Argentina pela hospedagem e carinho, em especial Jennifer Orfei, Berenice Gossweiler, Evelin Manfron, Noelia Biyovich, Juan Ignacio Mutti, Tatyana Gomez, Noelia Fredes, Nadia Asplindh e a todos da Unidad Veterinaria e da Cátedra de Histología.

Ao Eleci, funcionário da piscicultura, por cuidar dos peixes sempre que eu estava no laboratório. A todos os alunos, estagiários e funcionários da piscicultura UFLA.

Muito obrigada!

“Investir em conhecimento rende sempre melhores juros”

Benjamin Franklin

RESUMO

O sistema neuroendócrino difuso (SNED) compreende vários tipos de células do sistema gastrointestinal que produzem e secretam diferentes peptídeos, os quais exercem diversos efeitos sobre o processo digestório e o comportamento alimentar. O objetivo foi estudar, utilizando imunohistoquímica, a distribuição de células endócrinas do SNED imunopositivas aos peptídeos GAS, CCK-8, NPY e CGRP no sistema digestório de dourado *Salminus brasiliensis*. Foram utilizados 12 juvenis de dourado com peso de $144,8 \pm 21,7$ g e comprimento total de $25,5 \pm 3,5$ cm. Após 24 horas de jejum, os peixes foram eutanasiados e retiradas amostras em cinco diferentes segmentos: estômago: região pilórica estomacal (PE); intestino médio: cecos pilóricos (CP), alça 1 (A1) e alça 2 (A2) e intestino posterior (IP). As amostras de tecido foram fixadas em Bouin por 12 horas, colocadas em álcool 70% e processadas segundo métodos histológicos de rotina. Para a imunohistoquímica todas as reações foram feitas em câmara úmida e, nos procedimentos de lavagem, utilizou-se PBS 0,1 M. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena e de ligações inespecíficas foi feito utilizando-se reagentes comerciais Dako[®]. As amostras foram incubadas com anticorpos primários policlonais (Bachem, EUA) contra GAS, CCK-8, NPY e CGRP. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário anticoelho EnVision+System/HRP, reveladas pelo método enzimático utilizando 3,3 tetra-hidrocloroeto diaminobenzidina, DAB, e contracoradas com hematoxilina de Carazzi. O número médio de células endócrinas imunorreativas para cada peptídeo em cada segmento amostrado e em cada peixe foi determinado pela contagem total de células imunomarcadas. O número total de células foi contado, utilizando-se o microscópio, enquanto a área foi mensurada a partir da captura da imagem (objetiva de 20x) correspondente à área total de mucosa epitelial determinada usando o programa Image J. Os dados resultantes foram submetidos à ANOVA em esquema fatorial e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. A utilização de anticorpos desenvolvidos contra peptídeos de mamíferos foi mostrada, pela primeira vez, ser eficiente na imunolocalização de GAS, CCK-8, NPY e CGRP no dourado. Todos os peptídeos foram identificados em todos os segmentos amostrados, ainda que escassos em determinados segmentos. O maior número de células endócrinas imunopositivas a GAS, CCK-8 e CGRP estava principalmente na região pilórica estomacal e nos cecos pilóricos. Já para o NPY, as células imunomarcadas estavam notavelmente restritas ao intestino médio do dourado.

Palavras - chave: Peptídeos. Células endócrinas. Intestino. Imunohistoquímica. Peixes.

ABSTRACT

The diffuse neuroendocrine system (DNES) constitutes various types of cells of the gastrointestinal system. These cells produce and secrete different peptides, which exert several effects on the digestive process and feeding behavior. The objective was to study, using immunohistochemistry, the distribution of endocrine cells of the DNES, immunoreactive to the peptides GAS, CCK-8, NPY and CGRP in the digestive system of dourado (*Salminus brasiliensis*). Twelve juvenile fish with weight of 144.8 ± 21.7 g and total length of 25.5 ± 3.5 cm were used. After 24 hours of fasting, the fish were euthanized and samples were collected of five different segments: stomach: pyloric region (PE); medium intestine: pyloric caeca (CP), loop 1 (A1) and loop 2 (A2); and posterior intestine (IP). The tissue samples were fixed in Bouin solution for 12 hours, placed in 70% alcohol and processed according to routine histological methods. For the immunohistochemistry, all the reactions were performed in a humid chamber and, in the washing procedures, PBS 0.1 M was used. The obstruction of the endogenous peroxidase and of non-specific bonds was done using commercial reagents Dako[®]. The samples were incubated with polyclonal primary antibody (Bachem, USA) against GAS, CCK-8, NPY and CGRP. Subsequently, they were incubated with anti-rabbit secondary antibody EnVision+System/HRP, revealed by the enzymatic method using 3,3'-tetrahydrochloride diaminobenzidine, DAB, and counterstained with Carazzi hematoxylin. The average number of immunoreactive endocrine cells for each peptide in each sampled segment and in each fish was determined by the total count of immunostained cells. The total number of cells was determined using a microscope, while the area was measured capturing the image (20x objective) correspondent to the total area of epithelial mucosa ascertained using the program Image J. The resulting data were submitted to ANOVA in factorial scheme and the means compared by the Tukey test at 5%. The use of developed antibodies against mammal peptides was shown, for the first time, to be efficient in the immunolocalization of GAS, CCK-8, NPY and CGRP in dourado. All the peptides were identified in all the samples segments, despite being scarce in certain segments. The largest number of endocrine cells immunoreactive to GAS, CCK-8 and CGRP were, mainly, in the pyloric region of the stomach and in the pyloric caeca. As for the NPY, the immunostained cells were notably restricted to the medium intestine of the dourado.

Key-words: Peptides. Endocrine cells. Intestine. Immunohistochemistry. Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Desenho esquemático dos mecanismos de atuação da célula endócrina	19
Figura 2	Exemplar de dourado <i>Salminus brasiliensis</i> (Cuvier, 1816).....	38
Figura 3	Desenho esquemático do aparelho digestório de <i>Salminus brasiliensis</i>	46
Figura 4	Fotomicrografia da imunorreação de CGRP na camada muscular...	51
Figura 5	Fotomicrografia da imunorreação de NPY em fibras nervosas da camada muscular e lâmina própria submucosa.....	51
Figura 6	Fotomicrografia de CEs do SNED imunorreativas a GAS, CCK-8, NPY e CGRP no estômago e intestino	56
Figura 7	Número médio, obtido pela transformação inversa de $xt = (x + 0,5)^{0,3}$, de células endócrinas imunorreativas por mm^2 de mucosa epitelial para cada anticorpo empregado nos diferentes segmentos do tubo digestório.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de anticorpos utilizados neste estudo.....	48
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α -CGRP	CGRP isoforma alfa
β -CGRP	CGRP isoforma beta
+CCK-8	Imunorreação para CCK-8
+CGRP	Imunorreação para CGRP
+GAS	Imunorreação para GAS
+NPY	Imunorreação para NPY
°C	Graus Celsius
A1	Alça intestinal 1
A2	Alça intestinal 2
AGRP	Peptídeo relacionado à proteína agouti
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANAVA	Análise de variância
APUD	Amine precursor uptake and decarboxylation
CART	Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CCK _A	Receptor da família das gastrinas tipo A
CCK _B	Receptor da família das gastrinas tipo B
cDNA	DNA complementar
CE	Célula endócrina
CEs/mm ²	Células endócrinas por milímetro quadrado
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLR	Receptor semelhante ao receptor da calcitonina
Cm	Centímetro
CP	Cecos pilóricos
CRF	Fator de liberação de corticotropinas
EP	Região pilórica estomacal
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós
G	Grama
GAS	Gastrina
GH	Hormônio do crescimento
GIP	Polipeptídeo liberador de gastrina insulino-dependente
GLP	Peptídeo semelhante ao glucagon
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
IP	Intestino posterior
mm ²	Milímetro quadrado
M	Molar
MHC	Hormônio concentrador de melanina
mg l ⁻¹	Miligrama por litro

NH ₂	Amina
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
PBS	Tampão fosfato salina
POMC	Proopiomelancortina
PM	Pico molar
PP	Polipeptídeo pancreático
PY	Peptídeo Y
PYY	Peptídeo YY
RAMP	Receptor activity-modifying protein
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
SNED	Sistema neuroendócrino difuso
UFLA	Universidade Federal de Lavras
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
Y1	Receptor da família de NPY subtipo 1
Y2	Receptor da família de NPY subtipo 2
Y4	Receptor da família de NPY subtipo 4
Y5	Receptor da família de NPY subtipo 5
Y6	Receptor da família de NPY subtipo 6
Y7	Receptor da família de NPY subtipo 7
Y8a	Receptor da família de NPY subtipo 8a
Y8b	Receptor da família de NPY subtipo 8b

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Sistema neuroendócrino difuso (SNED) gastrintestinal.....	16
2.2	Gastrina (GAS).....	20
2.3	Colecistoquinina (CCK).....	24
2.4	Neuropeptídeo Y (NPY).....	29
2.5	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP).....	35
2.6	Dourado <i>Salminus brasiliensis</i>	38
2.7	Perspectivas no estudo dos peptídeos.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Peixes e coleta de amostras.....	45
3.2	Imunohistoquímica e microscopia de luz.....	46
3.3	Análise e mensurações.....	49
3.4	Análise estatística.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Sistema nervoso entérico.....	50
4.2	Sistema neuroendócrino difuso (SNED) gastrointestinal.....	52
4.2.1	CEs imunopositivas à gastrina (+GAS).....	53
4.2.2	CEs imunopositivas à colecistoquinina (+CCK-8).....	54
4.2.3	CEs imunopositivas ao neuropeptídeo Y (+NPY).....	59
4.2.4	CEs imunopositivas ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (+CGRP).....	60
5	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICE.....	92

1 INTRODUÇÃO

O sistema neuroendócrino difuso (SNED) gastrointestinal compreende vários tipos de células endócrinas que produzem e secretam diferentes peptídeos. Esses peptídeos possuem diversos efeitos sobre o comportamento alimentar e o controle da digestão, estimulando a secreção de enzimas digestórias e de substâncias ácidas ou básicas para promover condições ideais para a atividade enzimática. Efeitos sobre a motilidade gastrointestinal também são relacionados a essas substâncias.

As células endócrinas da mucosa gastrointestinal formam o maior sistema endócrino celular do corpo, tanto em termos de número de células quanto em variedade de substâncias produzidas.

Essas células endócrinas constituem um sistema extremamente complexo e integrado que, em conjunto com o sistema nervoso central e entérico (plexo mioentérico e submucoso), regula a atividade do sistema gastrointestinal em relação à secreção de bile e enzimas pancreáticas, secreção estomacal, motilidade, renovação epitelial e metabolismo glicolítico. O entendimento do papel fisiológico, assim como dos mecanismos de modulação exercidos pelo sistema neuroendócrino intestinal em mamíferos vem sendo amplamente revisado. Por outro lado, há pouca informação disponível em peixes e, em muitos casos, não é possível extrapolar as informações obtidas entre espécies em função da grande diversidade de hábitos alimentares, além da variação intrínseca a cada espécie.

A compreensão da forma de atuação desses peptídeos na modulação da digestão e da absorção de nutrientes do sistema gastrointestinal é importante para estudos futuros no desenvolvimento de dietas artificiais adequadas à necessidade e à capacidade digestória dos peixes. O primeiro passo a ser dado nessa área é a identificação de células endócrinas produtoras desses peptídeos e

a distribuição dessas células ao longo do tubo digestório para a espécie de interesse, já que ainda pouco se sabe sobre este tema em peixes e a maioria dos estudos existentes se concentra em espécies como *Carassius auratus*, *Salmo salar* e *Oncorhynchus mykiss*. Nesse contexto, o uso da técnica de imunohistoquímica constitui um bom método qualitativo de estudo desses peptídeos, uma vez que confere especificidade e sensibilidades às reações.

Em relação ao estudo do SNED gastrintestinal em peixes nativos brasileiros, os trabalhos disponíveis avaliaram apenas a presença de células endócrinas utilizando o método histoquímico de impregnação por prata e coloração de Grimelius no intestino de piracanjuba *Brycon orbignyanus*, piau *Leporinus friderici* e surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (SEIXAS FILHO et al., 2001). No caso do dourado *Salminus brasiliensis*, células do SNED também foram identificadas no estômago pelo método de Grimelius (CASTRO et al., 2003), contudo, ainda se desconhece quais peptídeos são produzidos e qual é a distribuição ao longo do tubo digestório. Portanto, há pouca informação disponível para peixes nativos carnívoros/piscívoros e extrapolar dados obtidos para diferentes espécies pode não ser adequado tendo em vista a grande diversidade de hábitos alimentares.

Objetivou-se estudar, pela primeira vez, a distribuição relativa, utilizando a técnica de imunohistoquímica, de células endócrinas imunopositivas aos peptídeos moduladores gastrina (GAS), colecistoquinina (CCK-8), neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), em diferentes segmentos do sistema digestório do dourado *Salminus brasiliensis*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistema neuroendócrino difuso (SNED) gastrointestinal

As primeiras células endócrinas intestinais foram identificadas em mamíferos, por Cármeo Ciaccio (1906) e chamadas de células enterocromafins, devido à sua afinidade de ligação com sais de cromo. Alguns anos depois, também foi demonstrada a capacidade das células enterocromafins de reduzir íons de prata e, em razão dessa característica, foram nomeadas células argirófilas (MASSON, 1914). Contudo, a função dessas células permaneceu desconhecida até o final da década de 1930.

O papel dessas células foi determinado com o surgimento do conceito de “sistema neuroendócrino difuso” (SNED), proposto por Friedrich Feyrter, em 1938, devido à inter-relação entre nervos e células endócrinas (antes descritas como enterocromafins e argirófilas) na regulação da atividade secretora e motora do aparelho gastrointestinal e do pâncreas (ilhotas de Langerhans). Em seu manuscrito, Feyrter (1938) estabeleceu um novo conceito no campo da endocrinologia, propondo a existência do SNED em oposição ao dogma previamente aceito, que considerava glândulas e órgãos endócrinos. Mais tarde, em 1968, Pearse reuniu uma grande variedade de células endócrinas distribuídas difusamente com base nas principais características bioquímicas, citoquímicas e ultraestruturais comuns a todas elas, sobretudo com ênfase na capacidade de processar aminas, introduzindo o termo células do sistema APUD (do inglês *amine precursor uptake and decarboxylation*). Essa população de células não engloba somente células endócrinas do tubo digestório, mas também células de glândulas endócrinas clássicas, como a tireoide e o hipotálamo (PEARSE, 1969; 1968).

O SNED compreende vários tipos diferentes de células, conhecidas como células endócrinas/enteroendócrinas/enterocromafins/neuroendócrinas, distribuídas na mucosa do tubo digestório e que produzem e secretam vários peptídeos, os quais exercem efeitos sobre o controle da digestão e o comportamento alimentar de peixes (TONI, 2004; JENSEN, 2001). As células endócrinas da mucosa gastrintestinal formam o maior sistema endócrino celular do corpo, tanto em termos de número de células quanto em variedade de substâncias produzidas (AHLMAN; NILSSON, 2001). Células do SNED também estão no fígado, no coração e no rim (MODLIN et al., 2006).

Assim como em mamíferos, em peixes, o sistema neuroendócrino difuso desempenha importante papel na modulação de vários processos gastrintestinais, como secreção, absorção, motilidade e fluxo sanguíneo (OLSSON; HOLMGREN, 2001; OLSSON; HOLMBERG; HOLMBERG, 2008, OLSSON et al., 1999; HOLMGREN; JÖNSSON, 1988).

A origem embrionária das células endócrinas gerou algumas controvérsias. Alguns cientistas sugeriram, a princípio, a mesma origem que células do sistema nervoso, na crista neural (FEYRTER, 1938; PEARSE, 1968; 1969), enquanto outros sugerem que elas provêm da endoderme. No entanto, em vários estudos de rastreamento de linhagens celulares foi demonstrado, convincentemente, que todos os tipos de células da mucosa epitelial do tubo digestório (incluindo células endócrinas) se diferenciam a partir de células estaminais pluripotentes localizadas na região das criptas e são, portanto, derivadas da endoderme. Dessa forma, mesmo que neurônios e células endócrinas sejam capazes de expressar genes em comum, elas são provenientes de origem embrionária distinta (BARKER; CLEVERS, 2007; BARKER et al., 2007, BARKER; WETERING; CLEVERS 2008; ANDREW; KRAMER, 1998; RAWDON; ANDREW; KRAMER; RAWDON, 1983; LE DOUARIN, 1988;

LE DOUARIN; TEILLET, 1987; FONTAINE et al., 1977; CHENG; LEBLOND, 1974).

As células endócrinas do tubo digestório estão distribuídas entre as células da mucosa epitelial. A maioria delas está em contato direto com o lúmen (intestinal, gástrico ou da glândula gástrica), e são dotadas de quimiosensores na membrana apical, capazes de detectar a composição do conteúdo no lúmen e, assim, modular a função dessas células (ENGELSTOFT et al., 2008; SUNDLER, 2004; BORDI et al., 2000).

Morfológicamente, a célula endócrina pode ser caracterizada por seu formato triangular típico, no qual a base é mais larga que o ápice e possui núcleo arredondado ou oval que pode estar posicionado no meio ou na base da célula (HERNÁNDEZ; FÄNDRIKS, 2012; VIGLIANO et al., 2011; PEARSE, 1968; 1969). Células encontradas no estômago mostram formato mais arredondado ou, mesmo, poliédrico com núcleo arredondado posicionado no meio ou na base da célula (PAN et al., 2000).

As células endócrinas produzem e secretam uma série de peptídeos e aminas biogênicas com capacidade de sinalização. Essas células são especializadas na síntese de pequenos peptídeos que são armazenados em vesículas e secretados a partir de estímulos específicos (DIMALINE; DOCKRAY, 1994; PFEFFER; ROTHMAN, 1987). Entre os vários peptídeos produzidos e secretados pelas células endócrinas citam-se gastrina, colecistoquinina, secretina, somatostatina, motilina, grelina, galanina, bombesina, neuropeptídeo Y, peptídeo YY, polipeptídeo pancreático (PP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), peptídeo semelhante ao glucagon (GLP), polipeptídeo liberador de gastrina insulino dependente (GIP) e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (HELANDER; FÄNDRIKS, 2012; GUTIERREZ-AGUILAR; WOODS, 2011; VIGLIANO et al., 2011; AHLMAN; NILSSON, 2001; DIMALINE; DOCKRAY, 1994).

O mecanismo de atuação das células endócrinas gastrintestinais inclui a liberação de seus peptídeos de forma endócrina, parácrina, autócrina e neurócrina (Figura 1). Assim, seus produtos podem exercer efeitos locais ou em tecidos distantes (REHFELD, 1998).

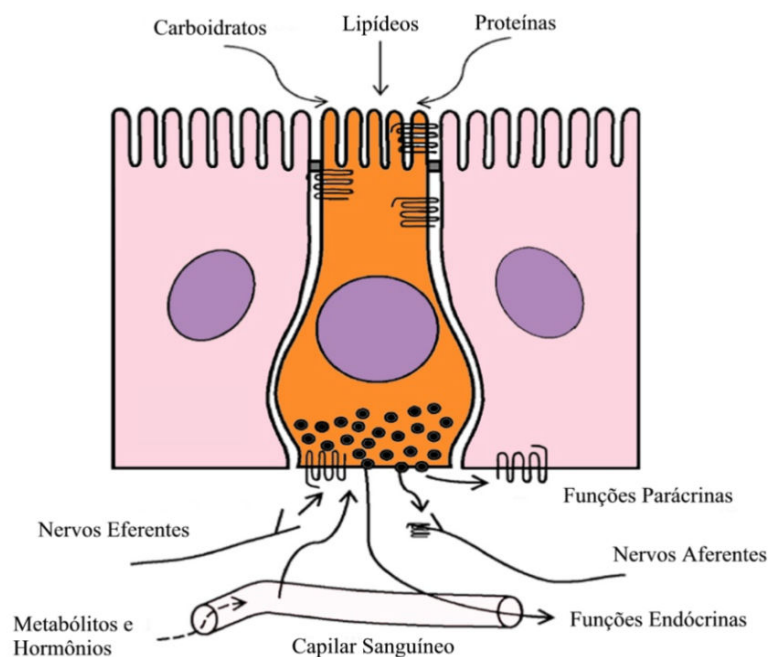


Figura 1 Desenho esquemático dos mecanismos de atuação da célula endócrina. As células endócrinas estão localizadas na mucosa epitelial e expressam microprojeções que alcançam o lúmen intestinal. Os quimiorreceptores dessas projeções são capazes de detectar classes específicas de nutrientes e, assim, controlar a secreção de peptídeos contidos em grânulos localizados no lado oposto do citoplasma da célula endócrina. Esses peptídeos ativam receptores em células adjacentes (função parácrina), no sangue via capilares locais (função endócrina) e estimulam receptores de nervos do sistema autônomo ou do plexo mioentérico modificado por Gutierrez-Aguilar; Woods (2011) de Engelstoft et al. (2008).

As células endócrinas compreendem cerca de 1% do total de células epiteliais do tubo digestório e constituem pelo menos 15 tipos diferentes de

células que podem ser classificadas com base na substância produzida. Antes do advento da imunohistoquímica, as células endócrinas também foram classificadas por meio das características de seus grânulos de secreção (RINDI et al., 2004).

Embora, numericamente, a quantidade de células endócrinas seja escassa, essas células constituem um sistema extremamente complexo e integrado que, em conjunto com o sistema nervoso central e entérico (plexo mioentérico e submucoso), regula a atividade do sistema gastrointestinal em relação à secreção de bile e enzimas pancreáticas, motilidade, renovação epitelial e metabolismo glicolítico (SKIPPER; LEWIS, 2000; YOUNG; HEALTH, 2000). No âmbito molecular, existem muitas semelhanças entre o SNED gastrointestinal e o sistema nervoso entérico. Em particular, tanto células endócrinas como neurônios entéricos exercem suas ações por meio da liberação de peptídeos pequenos que atuam em receptores que podem ser agrupados em famílias, devido à similaridade entre a sequência de aminoácidos (DIMALINE; DOCKRAY, 1994). Além disso, há muitos peptídeos secretados pelas células endócrinas, como colecistoquinina, grelina e neuropeptídeo Y, que também são sintetizados por neurônios do sistema nervoso central (THOMPSON; FLEMING; EVANS, 1990; CHENG; LEBLOND, 1974).

2.2 Gastrina (GAS)

As funções biológicas do peptídeo gastrointestinal GAS, e também da colecistoquinina (CCK), foram reconhecidas há mais de 80 anos (EDKINS, 1905; IVY; GOLDBERG, 1928). Contudo, somente em 1964 foi possível isolar e determinar a sequência de aminoácidos (GREGORY et al., 1964; GREGORY; TRACY, 1964; TRACY; GREGORY, 1964; GREGORY; TRACY, 1961). O advento da biologia molecular, na década de 1980, permitiu a realização do

sequenciamento de cDNA que codifica a gastrina (BOEL; VUUST; NORRIS, 1983; DESCHENES; LORENZ; HAUN, 1984) e seu gene correspondente (WIBORG; BERGLUND; BOEL, 1984; DESCHENES; HAUN; FUNCKES, 1985).

A GAS e a CCK constituem uma família de peptídeos caracterizados por um tetrapeptídeo carboxi-terminal, comum em mamíferos (CHANDRA; LIDDLE, 2007; REHFELD et al., 2007) e em peixes (JOHNSEN, 1998; KUROKAWA; SUZUKI; ANDO, 2003). Em mamíferos, a GAS é expressa como pré-pro-hormônio com 101 resíduos de aminoácidos que, posteriormente, é processado em produtos com 17 e 34 resíduos. As duas isoformas de GAS compartilham uma amina na carboxila terminal e também resíduos de tirosina, os quais são 50% sulfatados (DOCKRAY; VARRO; DIMALINE, 2001). A gastrina-34 é a forma mais comum produzida pelas células do tubo digestório (HADLEY; LEVINE, 2006).

A amina (NH₂) terminal que compõe a gastrina influencia a potência do peptídeo e também pode ser responsável, em parte, por promover a especificidade com a célula alvo. A GAS apresenta resíduos de tirosina sulfatada na posição 6 (numerando a partir do C-terminal), e essa forma corresponde a, aproximadamente, metade da GAS isolada da mucosa gástrica (HADLEY; LEVINE, 2006).

A GAS circulante possui pelo menos três formas moleculares diferentes, na maioria de espécies de mamíferos. A forma macromolecular da GAS conhecida como *big big gastrin*, forma não circulante, parece constituir um precursor biossintético intracelular de uma ou mais formas da GAS. Acredita-se que a *big big gastrin* sirva como pré-pro-gastrina para a gastrina-34 (*big gastrin*), a qual pode, em algumas células, funcionar como um hormônio ou como uma prógastrina. A gastrina-17 (*little gastrin*) pode ser a forma fisiologicamente relevante para a secreção de hormônios por algumas células,

enquanto a gastrina-14 (*mini gastrin*) é considerada um produto de degradação da gastrina-34 (HADLEY; LEVINE, 2006).

Os dois receptores para a família das gastrinas (GAS e CCK) são o CCK_A (ou CCK₁) e CCK_B (CCK₂). Ambos os tipos de receptores apresentam sete domínios transmembrana e atuam por meio do mecanismo acoplado à proteína G (DUFRESNE; SEVA; FOURMY, 2006). O receptor CCK_A requer o heptapeptídeo carboxi-terminal (Glu-Ala-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-CO-NH₂) da GAS, que inclui a tirosina sulfatada na posição 6, para ter alta afinidade de ligação e atividade biológica. Por outro lado, a ativação do receptor CCK_B compartilhado por GAS e CCK somente necessita do tetrapeptídeo carboxi-terminal para ligar-se a ambos os peptídeos com a mesma afinidade e ainda não faz distinção entre formas sulfatadas ou não (MILLER; GAO, 2008). Em peixes parece haver um único tipo de receptor, o CCK X (OLIVER; VIGNA, 1996). Acredita-se que esse receptor seja o ancestral de CCK_A e CCK_B de mamíferos e suas funções na digestão já foram revisadas em peixes (RØNNESTAD; ROJAS GARCIA; SKADAL, 2000).

A distribuição de GAS está restrita ao sistema gastrintestinal. Células endócrinas produtoras de GAS, células G, estão distribuídas somente no tubo digestório e a sua presença no sistema nervoso central (SNC) ainda é controversa (RAYBOULD, 2007). A imunorreatividade de GAS no estômago e no intestino de peixes está bem mostrada em espécies como *Rhamdia quelen* (HERNÁNDEZ et al., 2012), *Odontesthes bonariensis* (VIGLIANO et al., 2011), *Psetta maxima* (BERMÚDEZ et al., 2007) e *Salmo salar* (BJENNING; HOLMGREN, 1988). A sequência do RNAm para GAS foi identificada em poucas espécies de peixes teleósteos. como *Diplodus sargus* (CAMPO et al., 2011), *Tetraodon nigroviridis* e *Paralichthys olivaceus* (KUROKAWA; SUZUKI, T.; HASHIMOTO, 2003), e duas de condrictes *Squalus acanthias* e

Lamna cornubica (JOHNSEN et al., 1997) mostrando semelhanças entre a gastrina em peixes, mamíferos e humanos.

As principais funções fisiológicas da GAS são estimular a secreção de HCl e pepsinogênio no estômago e ativar enzimas que iniciam a digestão de proteínas. Outros efeitos biológicos são atribuídos a esse peptídeo, como estimulação da contração do esfíncter esofágico, relaxamento do esfíncter pilórico, estímulo à secreção de enzimas pancreáticas, aumento da atividade motora intestinal e estímulo moderado à secreção de bicarbonato pelo pâncreas. Essas respostas são mediadas pela liberação de histamina por células endócrinas e de ácido pelas células parietais (HADLEY; LEVINE, 2006; MEZEY; PALKOVITS, 1992). Esse peptídeo parece estar também envolvido no crescimento do epitélio da mucosa gástrica (VIGNA, 2000).

A presença do alimento no estômago, especialmente fragmentos de peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos livres, é o estímulo fisiológico primário para secreção de GAS e ainda há influência do controle proveniente do sistema nervoso autônomo (HADLEY; LEVINE, 2006).

A GAS, em peixes, é um peptídeo localizado em células endócrinas do estômago e do intestino e sua secreção ocorre em resposta à ingestão de alimento, regulando a secreção estomacal e a motilidade (VOLKOFF et al., 2005). Embora o papel da gastrina na regulação da ingestão de alimento não seja conhecido, o tratamento de gastrina no intestino de *Oncorhynchus tshawytscha*, *in vitro*, promoveu contração, sugerindo que ela desempenhe um papel na motilidade intestinal em peixes (FORGAN; FOSTER, 2007).

A regulação da secreção de HCl pela célula parietal envolve interações complexas entre vários fatores hormonais e neuro-hormonais (MAKHLOUF, 1974). A estimulação das secreções gastrintestinais é, assim como a maioria dos processos secretórios, regulada pelo aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Embora a GAS seja um potente estímulo à

secreção de ácido gástrico, acetilcolina e histamina também promovem liberação dessa substância. A histamina está presente em grande quantidade em glândulas oxínticas da mucosa de humanos e mamíferos e tem suas ações mediadas por AMPc. Embora GAS e acetilcolina também estimulem células parietais a secretar HCl, suas ações não envolvem AMPc e, sim, a ativação de fosfolipase C e a produção de inositol trifosfato e diacilglicerol como segundos mensageiros (TSUNODA; MODLIN, 1996; MODLIN; TANG, 1993).

2.3 Colecistoquinina (CCK)

A CCK foi um dos primeiros hormônios gastrintestinais descobertos. O peptídeo contendo 33 resíduos de aminoácidos (CCK-33) foi, inicialmente, isolado do duodeno de suíno e o seu sequenciamento em 1968, revelou a semelhança estrutural com a gastrina, outro hormônio que já havia sido caracterizado quatro anos antes (MUTT; JORPES, 1968; GREGORY et al, 1964; TRACY; GREGORY, 1964).

Em mamíferos, o processo proteolítico diferencial gera múltiplas formas da CCK, e as biologicamente dominantes no plasma são CCK-22, CCK-33, CCK-58 e a CCK-8, a qual é a forma mais abundante. A estrutura do octapeptídeo C-terminal da CCK é muito conservada entre os vertebrados e a sulfatação dos resíduos de tirosina desempenha papel importante na ativação biológica do peptídeo. Em animais, como a galinha, a tartaruga e o sapo, a estrutura da CCK é idêntica, enquanto, em peixes, parece haver apenas a substituição de um único aminoácido (MORAN; KINZIG, 2004; JOHNSEN, 1998).

Amplamente distribuída no sistema nervoso central, periférico e em células endócrinas (células I) na mucosa do tubo digestório de mamíferos e peixes, a CCK desempenha múltiplas funções no tubo digestório (OLSSON, et

al., 1999; ALDMAN et al., 1989). As principais funções que são atribuídas a CCK envolvem a contração da vesícula biliar, a secreção de enzimas pancreáticas, o estímulo à motilidade gastrointestinal, a inibição do esvaziamento gástrico e a inibição do consumo (CRAWLEY; CORWIN, 1994; GRIDER, 1994; JENSEN; HOLMGREN, 1994). Coletivamente, essas ações permitem melhor digestão de lipídeos e proteínas no intestino por meio do equilíbrio entre a capacidade de secretar enzimas e bile e o fornecimento de nutrientes. Embora existam ações diretas de CCK em células acinares no pâncreas e células da musculatura lisa do estômago, os neurônios aferentes presentes no nervo vago são o maior alvo da CCK para a estimulação do reflexo de liberação da secreção pancreática e a inibição do esvaziamento gástrico, via receptores CCK_A (DOCKRAY, 2009; MORAN, 2004; LI; OWYANG, 1994; FOSTER et al., 1990).

Dois tipos de receptores para CCK foram descritos, pela primeira vez, no início de 1980, a partir de homogenatos de cérebro e pâncreas de ratos radiomarcados (INNIS; SNYDER, 1980). O isolamento e a clonagem dos dois tipos de receptores observados mostraram que ambos são membros da família de receptores transmembrana acoplados a proteína G, havendo 48% de homologia entre os subtipos CCK_A e CCK_B (KOPIN et al., 1992; PISEGNA et al., 1992).

O receptor CCK_A (ou CCK₁) está presente, principalmente, no sistema gastrointestinal, em ramos aferentes do nervo vago e em áreas cerebrais relacionadas ao controle do consumo. Já o receptor CCK_B (ou CCK₂) se localiza, em sua maioria, no cérebro e está também em aferências do nervo vago e, ainda, no estômago (DUFRESNE; SEVA; FOURMY, 2006).

O principal estímulo à liberação de CCK pelas células endócrinas ocorre pela presença intraluminal de alimento. Os níveis basais plasmáticos de CCK são em torno de 1 pM para a maioria da espécie de mamíferos e, após a ingestão de alimento, esse nível aumenta para 5 a 8 pM. O aumento dos níveis

plasmáticos do peptídeo ocorre gradualmente de 10 a 30 minutos após o início da ingestão e diminui gradualmente cerca de 3 a 5 horas após o consumo de alimento. Dietas ricas em lipídeos e proteínas, e os produtos da digestão desses nutrientes, são os mais potentes estimuladores da liberação de CCK, enquanto carboidratos mostram-se fracos estimuladores (LIDDLE et al., 1985). É importante salientar que a quantificação plasmática de CCK pode não refletir totalmente todos os nutrientes que induzem a liberação do peptídeo. Algumas ações da CCK são mediadas por mecanismos parácrinos, havendo evidências de que essa liberação local de CCK pode ativar fibras nervosas do nervo vago e, assim, desempenhar seus efeitos biológicos sem que haja aumento significativo dos níveis plasmáticos (MORAN; KINZIG, 2004).

A CCK é, provavelmente, o peptídeo mais bem estudado e seu envolvimento na modulação do sistema de saciedade periférico e central tem sido foco de interesse para os pesquisadores, nos últimos anos. Em relação ao consumo de alimento, a CCK é um dos fatores de saciedade mais potentes, tendo um papel claramente anorexigênico. A rápida liberação desse peptídeo pelas células endócrinas do tubo digestório, de forma local ou vascular, em resposta à chegada de alimento, promove diminuição no tempo de consumo e na quantidade de alimento ingerido. Atualmente, sugere-se que, efetivamente, a CCK é um regulador a curto prazo, incapaz de alterar o balanço energético a longo prazo e, portanto, de induzir modificações no peso corporal (SANZ; CERDÁ-REVERTER, 2009).

Assim como observado em mamíferos, nos peixes, a ingestão de alimento estimula a liberação de CCK pelas células endócrinas do tubo digestório; a CCK, por sua vez, estimula inervações aferentes do nervo vago que levam a informação ao centro da saciedade hipotalâmico, para inibir a ingestão de alimento.

Foi relatada a implicação da CCK no sistema periférico e central para o controle dos processos digestórios e do consumo de alimentos. Estudos realizados com *O. mykiss* demonstraram que a chegada do alimento ao intestino estimula a liberação de CCK para a corrente sanguínea entre 4 e 6 horas após a ingestão. Por sua vez, a CCK promoveu o esvaziamento gástrico e estimulou a contração da vesícula biliar e a motilidade nessa espécie (JONSSON et al., 2006).

O papel da CCK no esvaziamento gástrico e na motilidade estomacal foi demonstrado em *O. mykiss*, na qual a infusão vascular de CCK-8 promoveu atraso no esvaziamento gástrico e diminuição da frequência e da amplitude das contrações rítmicas da musculatura lisa do estômago (OLSSON et al., 1999).

A presença de ácidos graxos, aminoácidos ou acidificação do conteúdo luminal no início do intestino promoveu a liberação de CCK, que resultou em indução à motilidade da vesícula biliar em *O. mykiss* (ALDMAN; GROVE; HOLMGREN, 1992; ALDMAN; HOLMGREN, 1987; 1995).

Foi demonstrado em estudos que a CCK pode ser uma substância regulatória também no SNC, atuando em receptores centrais para promover a redução do consumo (REIDELBERGER, 1994; SILVER; MORLEY, 1991). Conforme observado por Himick e Peter (1994), injeções intraperitoniais ou intracerebroventriculares de CCK-8 em goldfish *Carassius auratus* produziram uma supressão dose-dependente da ingestão de alimento, sugerindo o papel da CCK no sistema de saciedade periférico e central, em peixes. Contudo, ainda pouco se sabe sobre esse mecanismo de ação que promove efeitos na saciedade.

Em outros estudos com *C. auratus* (HIMICK; PETER, 1994; HIMICK; VIGNA; PETER, 1996) foram demonstradas fibras nervosas imunorreativas a CCK em áreas de SNC envolvidas no controle da ingestão. Sítios com alta afinidade de ligação para CCK foram localizados em áreas onde estão distribuídos nervos que contêm CCK. Além disso, também em *C. auratus*,

observou-se que injeções intracerebroventriculares de CCK resultaram em diminuição da ingestão de alimento, fundamentando, assim, o papel da CCK como um fator inibidor no sistema de saciedade central, em peixes (HIMICK; PETER, 1994; HIMICK; VIGNA; PETER, 1996).

Estudos recentes indicam que a CCK é capaz de modular o fenótipo neuroquímico de neurônios vagais aferentes entre dois estados. Em baixas concentrações plasmáticas (através da restrição de energia), as vias do nervo vago aferente sofrem aumento da capacidade de estimular o apetite, enquanto altas concentrações pós-prandiais de CCK levam a aumento na capacidade para sinalização de saciedade. Assim, uma função como substância chave pode ser atribuída a CCK na medida em que a sua presença ou ausência influencia a capacidade do sistema em responder a outros sinais neuro-hormonais (DOCKRAY, 2009; BURDYGA et al., 2008; DE LARTIGUE et al., 2007; WHITED; TSO; RAYBOULD, 2007).

Variações pós-prandiais na expressão de CCK foram relatadas em peixes. Diminuição significativa nos níveis de expressão de CCK RNAm ocorreram, após a alimentação, no cérebro de *Ictalurus punctatus* (PETERSON et al., 2012) e *C. auratus* (PEYON et al., 1999) e nos cecos pilóricos de *Seriola quinqueradiata* (MURASHITA et al., 2007).

A ação da CCK de estimular descargas em neurônios do nervo vago aferente e assim inibir a ingestão de alimento é potencializada pela distensão gástrica, leptina e urocortina (PETERS et al., 2004; BARRACHINA et al., 1997; SCHWARTZ; MCHUGH; MORAN, 1993; SCHWARTZ; MCHUGH; MORAN, 1991). Em contraste, orexina-A e grelina inibem a ação da CCK nesses neurônios (DATE et al., 2005; BURDYGA et al., 2003). Assim, neurônios do nervo vago aferente são capazes de modular sua resposta, inibição ou estimulação, ao consumo de alimentos, associada à expressão de moléculas de sinalização, com ênfase nos peptídeos gastrintestinais (DOCKRAY, 2009).

2.4 Neuropeptídeo Y (NPY)

O NPY é um peptídeo constituído por 36 resíduos de aminoácidos, que foi isolado, pela primeira vez, do cérebro de suíno (TATEMOTO, 1982). Posteriormente, o sequenciamento dos aminoácidos do NPY foi realizado em outras espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. O sequenciamento mostrou que 22 posições são idênticas entre as espécies e todas contêm o aminoácido prolina como base para manter a dobra PP da estrutura do peptídeo, indicando um nível de conservação estrutural notável (LARHAMMAR et al., 1997, LARHAMMAR, 1996a; LARHAMMAR; BLOMQVIST; SÖDERBERG, 1993). Até o momento, o NPY é o mais potente fator orexigênico conhecido em mamíferos (CHEE; COLMERS, 2008; DUMONT et al., 1992) e o peptídeo mais preservado, em termos de tamanho, sugerindo uma conservação de suas funções durante a evolução (LARHAMMAR, 1996a).

A família do neuropeptídeo Y inclui os peptídeos NPY, peptídeo YY (PYY) e polipeptídeo pancreático (SUNDSTROM et al., 2008; CERDÁ-REVERTER; LARHAMMAR, 2000). Esses peptídeos exercem seus efeitos em mamíferos por meio da ligação com os receptores Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6 (KAMIJI; INUI, 2007; MICHEL et al., 1998). No caso dos demais vertebrados, os receptores são em dobro, adicionando-se os receptores Y7, Y8a e Y8b (LARSSON et al., 2009). Em algumas espécies de peixes, sete subtipos de receptores, Y1, Y2, Y4, Y5, Y6 e Y8a e b, foram identificados para NPY e PYY, contudo, há deleções dos subtipos Y1, Y5 e Y6 no genoma de duas espécies de *pufferfish* (LARHAMMAR, 1996b; SALANECK et al., 2008).

De acordo com a similaridade nos aminoácidos, os receptores podem ser divididos em três subfamílias. A subfamília de receptores Y1 inclui Y1, Y4, Y6, Y8a e Y8b; a subfamília Y2 corresponde aos receptores Y2 e Y7 e a terceira subfamília é composta apenas pelo receptor Y5 (LARHAMMAR; SALANECK,

2004). Embora todos os receptores de NPY possam interagir com todos os peptídeos, cada receptor tem um único peptídeo ligante e o mesmo acontece para a ligação de antagonistas não peptídicos (MICHEL et al., 1998). O receptor Y2 para NPY/PYY é farmacologicamente caracterizado por alta afinidade pelo fragmento N-terminal do peptídeo, ou seja, alta habilidade de ligação com NPY (3 - 36), NPY (13 - 36), PYY (3 - 36) e PYY (13 - 36) (MICHEL et al., 1998). Todos os receptores da família NPY pertencem à superfamília de receptores de sinalização celular acoplados à proteína G e mais especificamente associados à proteína transmembrana rodopsina (LINDNER; STICHEL; BECK-SICKINGER, 2008; LARHAMMAR; SALANECK, 2004). Em estudos realizados com humanos foi relatado que todos os receptores para NPY estão envolvidos na regulação do apetite, sendo que os receptores Y1 e Y5 sinalizam para vias orexigênicas, enquanto Y2 e Y4 sinalizam para vias anorexigênicas (WALTHER et al., 2011).

NPY está amplamente distribuído no SNC, periférico e sistema nervoso entérico de mamíferos (BALASUBRAMANIAM, 1997). No SNC, esse peptídeo está particularmente presente no núcleo paraventricular hipotalâmico (HENDRY, 1993), no qual está envolvido na regulação da ingestão de alimento (STANLEY; LEIBOWITZ, 1984; 1985).

NPY está envolvido no controle de muitos processos biológicos, como atividade cardiovascular, atividade neuroendócrina, funções psicofisiológicas e no comportamento reprodutivo, mas a principal atenção tem sido dada ao papel orexigênico exercido por esse peptídeo (PEDRAZZINI, 2004; SAJDYK; SHEKHAR; GEHLERT, 2004). Em particular, NPY é considerado o mais potente fator orexigênico já visto com atuação no cérebro de mamíferos via receptor Y1 (EVA et al., 2006; GERALD et al., 1996). Entretanto, em peixes, com exceção de *C. auratus*, espécie para a qual foi realizado maior volume de

estudos, os efeitos do NPY sobre o comportamento alimentar ainda são pouco conhecidos.

A região hipotalâmica, que corresponde ao núcleo arqueado em mamíferos e área preóptica, no caso de peixes, é um ponto chave na integração de sinais metabólicos que regulam a fome. Essa região é considerada um sensor metabólico que recebe informação periférica endócrina sobre o consumo e o gasto energético. O acesso aos diversos sistemas endócrinos é possível graças à ausência de barreira hematoencefálica, demonstrada pelo acesso direto que muitas substâncias, como hormônios, têm aos neurônios do núcleo arqueado via receptores específicos. Dentro do núcleo arqueado parecem existir dois circuitos neuronais relacionados à alimentação, um encarregado de inibir a ingestão via expressão de peptídeos derivados de proopiomelancortina (POMC) e de transcrito estimulado por cocaína e anfetamina (CART) e outro encarregado de estimular o consumo por meio da expressão de NPY e peptídeo relacionado à proteína agouti (AGRP). Por outro lado, a maior entrada de informação viscerossensorial provém através da porção aferente do nervo vago, que termina no núcleo do trato solitário (NTS) e a área postrema. O NTS também recebe informações sensoriais através do nervo glossofaríngeo, facial e do trigêmio. Em contraste, acesso direto é obtido via neurônios preganglionares vagais com o tubo digestório, fígado e pâncreas, permitindo a modulação da assimilação do alimento nesses sistemas (SANZ; CERDÁ-REVERTER, 2009).

O gene ou cDNA de NPY foi caracterizado em algumas espécies de peixes, como *Danio rerio* (YOKOBORI et al., 2012), *Takifugu rubripes* (KAMIJO et al., 2011) e *Paralichthys orbignianus* (CAMPOS et al., 2010), *S. salar* (MURASHITA et al., 2009), *Siniperca chuatsi* (LIANG et al., 2007), *Gadus morhua* (KEHOE; VOLKOFF, 2007), *Oncorhynchus mykiss* (DOYON et al., 2003) e *C. auratus* (BLOMQVIST, 1992) e mostrou grande conservação de sua estrutura entre mamíferos, humanos e peixes.

Semelhante ao relatado em mamíferos, porém de maneira mais ampla, o NPY também está presente no SNC e periférico e, ainda, em células endócrinas na mucosa epitelial no intestino de peixes. Em estudos imunohistoquímicos identificou-se imunorreatividade de NPY no cérebro e/ou sistema gastrintestinal de várias espécies de peixes, como *D. rerio* (YOKOBORI et al., 2012), *R. quelen* (HERNÁNDEZ et al., 2012), *O. bonariensis* (VIGLIANO et al., 2011), *P. orbignyanus* (CAMPOS et al., 2010), *Raja ocellata* (MACDONALD; VOLKOFF, 2009) *P. maxima* (BERMÚDEZ et al., 2007), *G. morhua* (KEHOE; VOLKOFF, 2007), *Dicentrarchus labrax* (CERDÁ-REVERTER et al., 2000), *Pseudophoxinus antalyae* (ÇINAR; SENOL; OZEN, 2006), *C. auratus* (PONTET et al., 1989), *O. mykiss* (DANGER et al., 1991), *Protopterus annectens* (VALLARINO et al., 1995), *Polypterus senegalus* (CHIBA, 1997) e *Acipenser transmontanus* (CHIBA; HONMA, 1994). A maioria desses estudos se dedicou a expressão cerebral e aos efeitos do NPY no controle da ingestão de alimentos em peixes.

No caso dos peixes, apenas as subfamílias NPY e PYY estão presentes. Em um primeiro momento, os estudos indicaram a presença do peptídeo Y (PY) restrito a espécies de peixes (HOYLE, 1999), contudo, em estudos recentes, apontou-se que o PY, na realidade, constitui uma isoforma da subfamília do PYY (SUNDSTRÖM et al., 2008). A duplicação que ocorreu durante a evolução em peixes gerou genes duplicados que, por sua vez, culminaram na expressão das isoformas NPYa e NPYb, PYYa e PYYb (SUNDSTRÖM et al., 2008).

Em vários estudos com mamíferos e humanos foi evidenciado o papel do NPY como um peptídeo envolvido no controle fisiológico da ingestão de alimentos. Em mamíferos, injeções hipotalâmicas e intracerebroventriculares de NPY estimulam a ingestão de alimento e em estudos imuno-histoquímicos foi demonstrada a presença de NPY em projeções neuronais hipotalâmicas envolvidas na regulação do apetite. A expressão e a liberação de NPY aumentam

durante o jejum e em momentos próximos ao início da alimentação. Além disso, o uso de antagonistas específicos para NPY causa diminuição do apetite. Nervos contendo NPY são capazes de interagir com muitas substâncias regulatórias no sistema central de alimentação, assim como também são capazes de receber sinais provenientes de sistemas periféricos, como interações vistas com leptina e insulina (INUI, 1999; KALRA et al., 1999; SCHWARTZ; SEELEY, 1997).

Estudos com peixes nos últimos vinte anos relacionam os efeitos do NPY na regulação do apetite. Até então, a espécie mais bem estudada é *C. auratus*. Injeções intrecerebroventriculares e intraperitoneais em *C. auratus* mostram aumento significativo no consumo de alimento (LÓPEZ-PATIÑO et al., 1999; DE PEDRO et al., 2000; NARNAWARE et al., 2000; NARNAWARE; PETER 2001). Esse mesmo efeito foi demonstrado em *S. salar* (SILVERSTEIN et al., 1998) e *Ictalurus punctatus* (SILVERSTEIN et al., 2001).

Injeções de NPY no cérebro estimulam de forma muito potente o consumo em *C. auratus* (LÓPEZ-PATIÑO et al., 1999; DE PEDRO et al., 2000; NARNAWARE et al., 2000) e em *S. salar* (SILVERSTEIN et al., 1998) sendo que a realimentação após 72 horas normaliza a expressão (NARNAWARE et al., 2001). A expressão de NPY também sofre aumentos pré-prandiais em animais submetidos a restrito horário de alimentação, diminuindo após a ingestão do alimento (NARNAWARE et al., 2000; NARNAWARE; PETER, 2001). A administração de antagonistas de NPY reduz a alimentação compensatória induzida pelo jejum, sugerindo que a elevação dos níveis de NPY no cérebro pode, em parte, ser responsável pela alimentação compensatória, em peixes (LÓPEZ-PATIÑO et al., 1999).

Injeções de NPY em *C. auratus* induziram significativamente o aumento do consumo de alimento, enquanto esses efeitos estimulatórios do NPY são interrompidos pelo uso de antagonistas [D-Tyr^{27,36}, D-Thr³²] e NPY (27 - 36).

Em *C. auratus*, a liberação de NPY no hipotálamo parece ser devido ao jejum, uma vez que foi observado aumento na ingestão de alimento após jejum de 24 ou 72 horas, contudo o uso do antagonista de NPY não parece exercer efeitos sobre os níveis basais de consumo (LÓPEZ - PATIÑO et al., 1999). Semelhante ao observado por esses autores, Silvestein et al. (1999) mostraram que a expressão gênica de NPY na área preóptica do hipotálamo (equivalente a região paraventricular de mamíferos) aumentou significativamente durante o jejum em *Oncorhynchus kisutch*, em comparação aos peixes que foram alimentados, fornecendo fortes evidências do envolvimento de NPY na regulação do apetite em peixes.

Estudos mostram que os níveis cerebrais de expressão de RNAm para NPY aumentam significativamente após o jejum em *C. auratus* (NARNAWARE; PETER, 2001), *R. ocellata* (MACDONALD; VOLKOFF, 2009), *Oncorhynchus tshawytscha* e *O. kisutch* (SILVERSTEIN et al., 1999). Os níveis de expressão de NPY também sofrem aumentos pré-prandiais e diminuição pós-prandial em *I. punctatus* (PETERSON et al., 2012), *Oreochromis mossambicus* (PEDDU et al., 2009), *G. morhua* (KEHOE; VOLKOFF, 2007) e *C. auratus* (NARNAWARE; PETER, 2001). Além disso, aumentos na expressão cerebral de NPY RNAm foram observados em *Oncorhynchus* sp. (SILVERSTEIN et al., 1998) e *C. auratus* alimentados com dietas contendo baixo nível de nutrientes (NARNAWARE; PETER, 2002).

Em peixes, assim como em mamíferos, as ações de NPY no apetite ocorrem, em parte, moduladas por outros fatores de regulação, como fator de liberação de corticotropinas (CRF) e cortisol (BERNIER; BEDARD; PETER, 2004), transcrito regulado de cocaína e anfetamina (CART) (VOLKOFF; PETER, 2000), leptina (VOLKOFF; EYKELBOSH; PETER, 2003), hormônio concentrador de melanina (MCH) (MATSUDA et al., 2009), orexinas e galanina

(VOLKOFF; PETER, 2001), hormônio do crescimento (GH) (MAZUMDAR et al., 2006) e grelina (MIURA et al., 2007).

2.5 Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

O CGRP é um peptídeo de 37 aminoácidos, originado do processo diferencial (*splicing* alternativo) tecido-específico de RNAm transcrito a partir do mesmo gene da calcitonina (ROSENFELD et al., 1983, AMARA et al., 1982). Assim, o transcrito pode ser traduzido em calcitonina ou CGRP, dependendo do tecido. O peptídeo existe em duas isoformas, em peixes e mamíferos, α -CGRP (ou CGRP I) e β -CGRP (ou CGRP II), com atividades biológicas muito semelhantes e codificadas por genes diferentes, é expresso em neurônios sensoriais e entéricos respectivamente (OGOSHI et al., 2006; AMARA et al., 1982).

A família CGRP é composta por CGRP, calcitonina, adrenomedulina, adrenomedulina-2 (ou intermedina), amilina, polipeptídeo amiloide e, mais recentemente, foi identificado o peptídeo estimulador do receptor da calcitonina (OGOSHI et al., 2006; SAWADA et al., 2006). Todos os peptídeos dessa família possuem uma estrutura em anel de seis resíduos de aminoácidos (sete para a calcitonina) próxima de sua extremidade N-terminal, formado por uma ligação dissulfeto intramolecular, que consiste na região biologicamente ativa dos peptídeos (POYNER et al., 2002).

Evolutivamente, CGRP é um peptídeo muito conservado, sendo a sequência primária e as ações entre peixes e humanos similares (MARTINÉZ - ÁLVAREZ et al., 2009; SHAHBAZI; HOLMGREN; JENSEN, 1998).

Há pouco mais de uma década foi possível identificar a molécula do receptor de CGRP. Esse peptídeo atua via associação do receptor RAMP (*receptor activity-modifying protein*) e receptor semelhante ao receptor da

calcitonina (*calcitonin receptor-like receptor*, CLR), para formar um receptor do CGRP funcional que atua via mecanismo de sinalização acoplado a proteína G. Esse receptor funcional é alvo potencial de várias drogas para diversas doenças, incluindo enxaqueca (DOODS et al., 2007) e doença cardiovascular (BRAIN; GRANT, 2004).

O CGRP é expresso em vários tecidos, como fibras nervosas associadas a vasos sanguíneos, neurônios motores, junções neuromusculares, hipotálamo, pituitária, fibras e corpos neuronais da musculatura lisa do tubo digestório. O CGRP exerce vasta gama de efeitos biológicos, incluindo neuromodulação, vasodilatação, regulação do apetite e modulação da motilidade gastrointestinal (TAM; BRAIN, 2006; MARTINÉZ; TACHÉ, 2006; REIDELBERGER, 2002; REIDELBERGER; KELSEY; HEIMANN, 2002; LUTZ et al., 1997). Estudos em ratos evidenciam os efeitos de CGRP no sistema gastrointestinal, uma vez que a administração periférica de CGRP diminui o consumo, a motilidade e a secreção gástrica (MORLEY; FARR; FLOOD, 1996; REIDELBERG; KELSEY; HEIMANN, 2002).

Em peixes, moléculas de cDNA que codificam CGRP já foram isoladas para algumas espécies, incluindo *C. auratus* (MARTÍNEZ - ÁLVAREZ et al., 2008), *Cyprinus carpio* (KONO; SAKAI, 2004), *D. rerio* (OGOSHI et al., 2006; OGOSHI; INOUE; TAKEI, 2003), *Oryzias latipes* e *T. rubripes* (OGOSHI et al., 2006), e *P. olivaceus* (SUZUKI; SUZUKI; KUROKAWA, 2000). Em peixes, assim como em mamíferos, o gene da calcitonina codifica tanto molécula de calcitonina como de CGRP (OGOSHI et al., 2006; CLARK et al., 2002). Em *C. auratus*, o CGRP também é expresso no cérebro, estômago, intestino, coração, glândula pituitária, gônada, fígado baço, rim, músculo e ultimobrânquial (MARTINÉZ - ÁLVAREZ et al., 2008; VIGLIANO et al., 2011; LAFONT; DUFOUR; FOUCHEREAU-PERON, 2004; CLARK et al.,

2002). Contudo, as maiores expressões de CGRP em peixes foram identificadas no cérebro e na medula espinhal (MARTINÉZ - ÁLVAREZ et al., 2008).

Assim como em mamíferos, estudos com peixes demonstram semelhanças nas funções biológicas desempenhadas por CGRP, evidenciando a expressão de CGRP no cérebro de *C. auratus* (MARTINÉZ - ÁLVAREZ et al., 2008) e em corpos de células e fibras nervosas do plexo mioentérico no estômago e no intestino de *G. morhua* (SHAHBAZI et al., 1998; KARILA, 1998). De forma similar, em *D. rerio*, o CGRP está presente em fibras nervosas vagais que inervam o intestino proximal e parece haver nervos extrínsecos e intrínsecos na parte distal do intestino (OLSSON; HOLMBERG; HOLMGREN, 2008). O CGRP foi encontrado em fibras nervosas de outros peixes, como *Lampreta japônica* (YUI; NAGATA; FUJITA, 1988) e *Neoceratodus forsteri* (HOLMGREN et al., 1994). Em estudos imunohistoquímicos foi detectado CGRP em células endócrinas da mucosa epitelial do intestino de *G. morhua* (SHAHBAZI et al., 1998) e *N. forsteri* (HOLMGREN et al., 1994), *O. bonariensis* (VIGLIANO et al., 2011) e *R. quelen* (HERNÁNDEZ et al., 2012), além de haver receptores para CGRP expressos no intestino de *P. olivaceus* (SUZUKI; SUZUKI; KUROKAWA, 2000).

Os efeitos inibitórios de CGRP na musculatura lisa do intestino em peixes já foram relatados, uma vez que o CGRP inibe as contrações espontâneas no intestino de *G. morhua* (SHAHBAZI et al., 1998).

O papel vasodilador de CGRP foi observado em *G. morhua* (SHAHBAZI; HOLMGREN; JENSEN, 2009), *Callorhinchus milii* (JENNINGS et al., 2007) e em *O. mykiss* (LE MÉVEL et al., 2002; KAGSTRÖM; HOLMGREN, 1998).

Em estudos com peixes indicaram o papel neuroendócrino e associado ao comportamento alimentar (CLARK et al., 2002; SUZUKI; SUZUKI; KUROKAWA, 2001). Entretanto, ainda há pouca informação sobre a função

central de CGRP como fator anorexigênico em teleóteos, com exceção de *C. auratus*. Em estudos conduzidos recentemente foi demonstrado que injeções intracerebroventriculares de CGRP resultam em diminuição significativa da ingestão de alimentos, em *C. auratus* (MARTINÉZ - ÁLVAREZ et al., 2009).

2.6 Dourado *Salminus brasiliensis*

O dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) é uma espécie muito apreciada pela excelente qualidade de sua carne, pela beleza de tegumento, por seu potencial de cultivo como peixe de produção, na pesca esportiva e também como peixe ornamental (Figura 2) (KUBITZA, 1995). É o maior peixe de escamas encontrado na bacia do Prata, formada pelos rios Paraguay, Paraná e Uruguai e na bacia do rio São Francisco, onde habita preferencialmente ambientes lóticos e encaichoerados (MORAIS FILHO; SCHUBART, 1955).

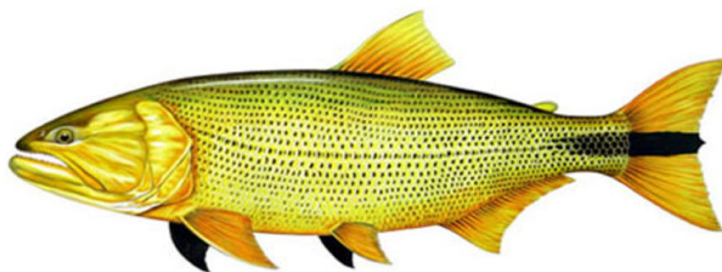


Figura 2 Exemplo de dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816).
Fonte: <http://www.hodelua.com.br/site/dourado>.

O dourado apresenta crescimento acentuado e rendimento de filé superior ao de outras espécies nativas. Em estudos sobre o rendimento de cortes de filé entre diferentes espécies foi demonstrado que o dourado possui rendimento maior, quando comparado aos rendimentos obtidos para o jundiá

Rhamdia quelen e a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, com médias de 43,54%, 30,34% e 32,33%, respectivamente (VEIVERBERG et al., 2008).

Atualmente, são conhecidas quatro espécies de peixe que popularmente recebem o nome de dourado. A espécie *Salimonus affinis* é encontrada no norte da Colômbia e em algumas regiões do Equador. *Salminus brasiliensis*, anteriormente chamada de *Salimonus maxillosus* e *Salminus brevidens*, é a espécie mais conhecida habitando toda a porção sul da América do Sul. *Salminus hilarii*, que no Brasil é conhecida como tabarana, é encontrada nos rios São Francisco, Paraná, Tocantins, Amazonas e Orinoco (RODRIGUEZ-OLARTE; TAPHORN, 2006 citado por DAIRIKI, 2009). A quarta espécie de dourado catalogada recebeu o nome de *Salminus franciscanus* e foi identificada na bacia do São Francisco, com diferenças marcantes entre as demais espécies, em relação a características anatômicas nos dentes e na nadadeira caudal (LIMA; BRITSKI, 2007 citado por DAIRIKI, 2009).

Larvas e juvenis de dourado são conhecidos como animais carnívoros generalistas, ou seja, predam uma ampla variedade de alimentos de origem animal. Nesse grupo destacam-se larvas de peixes de outras espécies, larvas de insetos, microcrustáceos e organismos do zooplâncton, como cladóceros e copépodos, entre outros (RODRIGUEZ-OLARTE; TAPHORN, 2006; RIBEIRO; NUÑER, 2008 citado por DAIRIKI, 2009). Estudos sobre o comportamento alimentar e canibalismo em sistemas de produção intensiva, mostraram que larvas de dourado proporcionam melhor desempenho quando alimentadas com larvas *Prochilodus lineatus* e canibalismo menor que 30%. Enquanto o uso de náuplios e microcrustáceos *Artemia salina* resultou em menor crescimento e sobrevivência menor que 6%, além de promover acentuado canibalismo, próximo a 92%. Dessa forma, em pisciculturas comerciais o uso de peixes “fORAGEIROS” tem ganhado espaço como estratégia para alimentação de larvas de dourado (SCHUTZ; NUÑER, 2007).

Considerado um predador visual, a atividade de caça do dourado tem sucesso pela sua intensa locomoção e pela incidência de luz no ambiente para facilitar a visualização e o ataque à presa. Por outro lado, no caso de ambientes com ausência de luz, o dourado adota um comportamento atípico de espera e detecta suas presas por meio de receptores mecânicos localizados na linha lateral (SCHUTZ; NUÑER, 2007). O comportamento alimentar do dourado sofre influências sazonais, sendo que a maior atividade alimentar se concentra no período chuvoso e quente compreendido entre os meses de outubro a março, especialmente novembro e dezembro (ESTEVES; PINTO LÔBO, 2001).

O dourado na fase adulta é um peixe icitiófago ou piscívoro restrito de água doce, ou seja, alimenta-se exclusivamente de peixes e para isso é anatomicamente adaptado a predação (RODRIGUES; MENIN, 2006). A fenda oral ampla, o alargamento caudal da cavidade oral e a reduzida espessura do aparelho dentário faríngeo favorecem a tomada e a ingestão de presas de maior porte. Em função do tipo das denticões oral e faríngea, não há preparação pré-digestiva do alimento. Esses dentes, pontiagudos e encurvados, juntamente com a língua, relativamente móvel, previnem o escape da presa da cavidade bucofaríngea. O trânsito do alimento é facilitado pela ausência de relevos pronunciados na mucosa desta cavidade e pela disposição dos dentes orais e faríngeos (RODRIGUES; MENIN, 2006).

O dourado é uma espécie tipicamente reofílica ou migratória que necessita percorrer grandes distâncias rio acima para atingir os sítios de reprodução conhecidos chamados de tributários. O aumento da pluviosidade, temperatura e fotoperíodo são os principais fatores ambientais que estimulam o dourado ao processo migratório de reprodução. O fenômeno de migração conhecido, popularmente como piracema, ocorre no sudeste do Brasil durante os meses quentes e chuvosos, compreendidos entre outubro e março (ZANIBONI-FILHO, 2000; MACHADO, 2003).

Os peixes alimentam-se de maneiras distintas e também com alimentos diferentes e, segundo as particularidades de cada espécie, existem, basicamente, cinco tipos de hábitos alimentares: herbívoro, carnívoro, onívoro, dentritívoro e iliófago (HYATT, 1979). A alimentação tem por finalidade obter energia e acrescentar elementos necessários para a manutenção e o crescimento de tecidos e organismos (NIKOLSKI, 1963). Essa atividade ocorre no aparelho digestório (LOVE, 1970).

O aparelho digestório dos peixes é constituído por cavidade bucofaringeana, esôfago, estômago, intestino e glândulas anexas. Já o termo sistema gastrintestinal enquadra os órgãos compreendidos entre boca e intestino e o que se denomina de tubo digestório corresponde aos órgãos do esôfago até o reto (ZAVALA-CAMIN, 1996).

Há algumas variações anatômicas e histomorfológicas que podem ocorrer no aparelho digestório das muitas espécies de peixes, dependendo do filo ao qual pertencem, assim como em associação com o hábito alimentar (BUDDINGTON; KUZ'MINA, 2000a;b). Em peixes, o tubo digestório pode ser subdividido em intestino anterior, que compreende boca, faringe e estômago; em intestino médio, com adição de cecos pilóricos, quando for o caso, e em intestino distal ou posterior que, no caso de haver valva ileorretal, termina em reto e, por último, desemboca no ânus (JOBLING, 1995).

As características morfoanatômicas do tubo digestório do dourado são tipicamente específicas de peixes carnívoros. As principais características que podem ser citadas incluem estômago grande e com capacidade de distensão, devido à espessa camada muscular; intestino curto e com padrão de mucosa complexo e a presença dos cecos pilóricos. O dourado possui esôfago em forma tubular, ligeiramente deprimido e curto, situado dorsalmente ao coração, contínuo à faringe e desembocando na região cárdica do estômago. O estômago é do tipo cecal, em Y, e apresenta três regiões morfológicas distintas, sendo a

cárdica, a cecal e a pilórica (CASTRO, 2003). Na extremidade da região pilórica se encontra o esfíncter pilórico, que acarreta uma pronunciada constrição entre o estômago e o intestino médio. O intestino médio possui forma tubular e, em razão da sua disposição na cavidade peritoneal, pode ser dividido em alças 1, 2 e 3 e mantém, aproximadamente, o mesmo calibre ao longo de sua extensão. Os cecos pilóricos estão inseridos na porção inicial do intestino médio, imediatamente após o esfíncter pilórico. O intestino posterior, por sua vez, continua o intestino médio sem interrupção por constrição ou valva e, após curto trajeto dorsiventrocaudal, desemboca no ânus (RODRIGUES; MENIN, 2008).

O único trabalho relacionado ao SNED do dourado foi realizado por Castro et al. (2003), que utilizou dourados adultos para identificar células endócrinas do SNED no estômago pelo método histoquímico de Grimelius. Devido à complexidade e importância do SNED nos processos digestórios, estudos mais aprofundados são fundamentais para que seja possível, no futuro, aplicar os conhecimentos em programas nutricionais para a melhoria dos sistemas de cultivo do dourado.

2.7 Perspectivas no estudo dos peptídeos

É interessante salientar que alguns peptídeos muito familiares encontrados em tetrápodes estão ausentes em peixes. Antes do desenvolvimento e aplicação de técnicas biológicas e genômicas com especificidade suficientemente rigorosa, os sistemas de detecção baseados em anticorpos com especificidade imperfeita antigamente utilizados podem ter detectado por reação cruzada moléculas muito próximas, mas diferentes, que, na verdade, constituem peptídeos diferentes dos buscados. Outra situação é a ausência de evidências claras de sua existência em peixes, já que peptídeos comumente aceitos e funcionalmente caracterizados em outras espécies foram considerados

incorretamente existir também em peixes (HOSKINS; VOLKOFF, 2012). Por exemplo, após estudos do genoma de cinco espécies de peixe, foi verificado que tanto a secretina quanto seu receptor estão ausentes em teleósteos (ROCH; WU; SHERWOOD, 2009). Da mesma forma, o polipeptídeo pancreático, um membro da família NPY, também está ausente em teleósteos (SUNDSTRÖM et al., 2008).

Apesar de haver tendência de comparar os resultados obtidos em peixes com o que se sabe sobre mamíferos, aos poucos está se tornando mais e mais evidente que grandes diferenças, principalmente nas funções de peptídeos relacionados ao controle do apetite e digestão, existam entre peixes e mamíferos e também entre espécies de peixes (HOSKINS; VOLKOFF 2012). Os peixes constituem um grupo de vertebrados extremamente diversificado que, como consequência apresentam ampla variedade de adaptações anatômicas, morfológicas, fisiológicas e comportamentais (NELSON, 2006; VOLFF, 2004).

Outro ponto importante está no fato de que os peixes, como outros vertebrados, passaram por duas rodadas de tetraploidização (teoria 2R da duplicação do genoma inteiro), entretanto, a subclasse de peixes actinopterygians, que representam mais de 95% das espécies de peixes, passou por uma rodada extra de duplicação, um evento chamado 3R (SUNDSTRÖM; DREBORG; LARHAMMAR, 2010; LARSSON et al., 2009; MEYER; PEER, 2005). Este número maior de cópias de genes torna a caracterização de genes que codificam peptídeos em peixes ainda mais complexa.

Com base em espécies de peixes estudadas até esta data, parece que a estrutura dos peptídeos reguladores é conservada entre mamíferos e peixes, no que diz respeito à estrutura do gene, à composição de aminoácidos e à configuração 3D da proteína (HOSKINS; VOLKOFF, 2012; SUNDSTRÖM et al., 2008).

Nexte contexto, os peixes exibem grande diversidade de hábitos alimentares, bem como de formas de alimentação capazes de orquestrar respostas quando são submetidos a desafios nutricionais e ambientais. Além disso, dentro de uma única espécie de peixe, os padrões de síntese e as ações de um dado peptídeo parecem ser dependentes do estado nutricional, da hora do dia e da época do ano e do estado reprodutivo. O número de espécies de peixe estudadas ainda é relativamente muito pequeno. Esse fato ainda é agravado pelo uso de peixes em diferentes estágios fisiológicos e por diferentes métodos de avaliação que, muitas vezes, fornece informações fragmentadas, o que dificulta conclusões gerais e a extrapolação dos resultados (revisados por HOSKINS; VOLKOFF, 2012).

Ainda que, na última década, muitos estudos sobre o sistema neuroendócrino e seus peptídeos em peixes tenham sido realizados, muito ainda precisa ser investigado para completar o inventário de peptídeos intestinais e, assim, aprofundar os conhecimentos sobre o papel fisiológico desses peptídeos no sistema gastrointestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 juvenis de dourado *S. brasiliensis* com 14 meses de idade, sem distinção de sexo, comprimento inicial de $25,5 \pm 3,5$ cm e peso de $144,83 \pm 21,7$ g, obtidos da Unidade de Reprodução da CEMIG, Itutinga, Minas Gerais, Brasil.

3.1 Peixes e coleta de amostras

Os peixes foram mantidos no Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em um mesmo tanque de alvenaria com dimensões de 8 m x 5 m e 1,6 m de profundidade, com taxa de renovação de água de 6,67 litros a cada 60 segundos e oxigênio dissolvido entre 4 e 6 mg/L. A temperatura média da água no inverno é de 16 °C e de 28 °C no verão. Os parâmetros temperatura, oxigênio dissolvido e amônia tóxica foram monitorados diariamente, no início e no final do dia e se mantiveram dentro dos padrões de bem-estar adequados aos peixes.

Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 40% de proteína bruta (Guabi: www.guabi.com.br), ofertada duas vezes ao dia até saciedade aparente, durante os 6 meses antecedentes à coleta de amostras. Durante o mês de janeiro de 2011, no verão, após 24 horas de jejum, os peixes foram eutanasiados, utilizando-se uma sobredose de benzocaína de 250 mg l⁻¹ (Sigma: www.sigmaldrich.com), seguida de secção da medula espinhal. Amostras da região pilórica estomacal (PE), de diferentes segmentos do intestino médio: cecos pilóricos (CP), alça 1 (A1), alça 2 (A2) e do intestino posterior (IP), conforme descrito por Rodrigues e Menin (2008), foram retiradas para análise imunohistoquímica (Figura 3). Todos os procedimentos aplicados aos peixes foram devidamente analisados e autorizados pela Comissão de Ética

no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras, conforme protocolo número 013/2012.

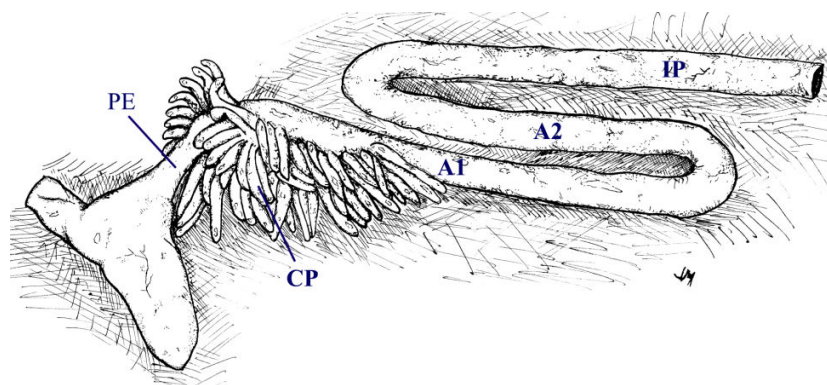


Figura 3 Desenho esquemático do aparelho digestório de *Salminus brasiliensis*. As regiões amostradas do tubo digestório foram: pilórica estomacal (PE) e em diferentes segmentos do intestino médio: cecos pilóricos (CP), alça 1 (A1), alça 2 (A2) e intestino posterior (IP).

Fonte: Desenho Marina Louzada.

3.2 Imunohistoquímica e microscopia de luz

Os ensaios imunohistoquímicos foram realizados no Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica do Departamento de Zootecnia da UFPA. Foram retirados fragmentos biológicos com cerca de 4 mm de comprimento e 5 mm de espessura, em corte transversal, em diferentes segmentos do tubo digestório.

As amostras de tecido foram fixadas em Bouin, por 12 horas e, em seguida, colocadas em álcool 70% até o processamento. Posteriormente, foram desidratadas em bateria com gradiente alcoólico crescente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (ponto de fusão de 56 a 58 °C). Foram obtidos cortes histológicos de 3 a 5 μ m de espessura, colocados em lâminas histológicas

silanizadas e secas em estufa a 37 °C *overnight*. Para avaliar a morfologia das estruturas ao microscópio de luz e mensurar a área de mucosa epitelial, os cortes histológicos foram desparafinados, reidratados, segundo métodos histológicos de rotina e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (BANCROFT; STEVENS; TURNER, 2008).

Para a imunohistoquímica, todas as incubações foram realizadas em câmara úmida e todos os procedimentos de lavagem foram constituídos de três sucessivas imersões de 5 minutos em solução tampão fosfato salina 0,1 M pH 7,20 (PBS). O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi feito pela incubação em reagente Peroxidase Block (DakoCytomation, EUA) por 30 minutos, seguido de uma lavagem em PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas do anticorpo foi feito de duas formas, primeiro utilizando-se 5% de leite desnatado em pó no PBS durante 5 minutos e, em seguida, pelo tratamento dos cortes com reagente Block Serum (DakoCytomation, EUA), por 10 minutos. Posteriormente, os cortes histológicos foram novamente lavados em PBS, incubados com cada anticorpo primário policlonal (VIGLIANO et al., 2011) desenvolvido em coelho específico para cada peptídeo (Tabela 1), lavados em PBS, incubados por 30 minutos com anticorpo secundário anticoelho EnVision+System/HRP (DakoCytomation, EUA). Após mais uma lavagem, os cortes histológicos foram revelados pelo método enzimático utilizando-se 3,3 tetra-hidrocloro diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, EUA), imersos em água destilada para parar a reação após 25 segundos. Foi feita contracoloração com hematoxilina de Carazzi e as lâminas montadas com laminula.

Cortes histológicos de intestino de jundiá *Rhamdia quelen* foram incluídos como controles positivos, para avaliar a especificidade do ensaio. Cortes histológicos de intestino do dourado e de *R. quelen* foram incluídos a

cada reação como controle branco, no qual o anticorpo primário foi substituído por PBS.

A escolha desses anticorpos foi fundamentada no fato de que, mesmo tendo sido desenvolvidos em mamíferos, esses anticorpos apresentaram sucesso na identificação por imunohistoquímica desses mesmos peptídeos em células do SNED de *R. quelen* (HERNÁNDEZ et al., 2012), *O. bonariensis* (VIGLIANO et al., 2011) e *P. maxima* (BERMÚDEZ et al., 2007), indicando a semelhança e a conservação desses peptídeos entre mamíferos e peixes.

Tabela 1 Lista de anticorpos utilizados neste estudo

Anticorpo policlonal desenvolvido em coelho contra	Diluição de uso do anticorpo	Parâmetros de incubação	Laboratório e código do anticorpo
GAS (humana)	1:600	3 horas à temperatura ambiente (22 a 25 °C)	Bachem ¹ T-4347
CCK-8 (sintética)	1:1000	3 horas à temperatura ambiente (22 a 25 °C)	Bachem ¹ T-4254
NPY (suíno)	1:1500	<i>Overnight</i> a 4 °C	Bachem ¹ T-4454
CGRP (rato)	1:800	<i>Overnight</i> a 4 °C	Bachem ¹ T-4032

GAS, gastrina; CCK-8, colecistoquinina; NPY, neuropeptídeo Y; CGRP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina.

¹Bachem www.bachem.com

A reatividade cruzada sugere fortemente que peptídeos em peixes teleósteos compartilham epítomos semelhantes, ou mesmo idênticos, aos seus equivalentes em vertebrados superiores (LANGER et al., 1979).

Adicionalmente, uma vez que os anticorpos empregados não foram desenvolvidos contra os peptídeos do dourado, antes deste estudo, foi realizado um teste de comparação das sequências proteicas disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information*, (NCBI:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), para avaliar se as semelhanças entre as sequências de aminoácidos se devem ao acaso ou não. Até o momento, nenhuma sequência para os peptídeos do dourado está disponível e, assim, foi necessário utilizar sequências de outras espécies de peixes. Na comparação, utilizou-se a sequência do imunógeno empregada na fabricação do anticorpo, comparando-a com a sequência de aminoácidos para o mesmo peptídeo em várias espécies de peixes ou, pelo menos, as que estavam disponíveis no NCBI. A comparação foi feita utilizando-se a ferramenta de alinhamento local BLAST protein para proteínas. NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, NIMH (2011).

Em todos os casos, foram obtidos valores de similaridades superiores a 80% e, na maioria das comparações, o valor de E foi muito pequeno, indicando que as variações nas sequências não ocorrem ao acaso (veja Apêndice). Além disso, em cada ensaio imunohistoquímico, a morfologia do tipo celular imunomarcado apresentou características típicas esperadas, em comparação a outras espécies de peixes e mamíferos anteriormente estudadas.

3.3 Análise e mensurações

Todas as lâminas foram fotografadas utilizando-se microscópio óptico de luz CX31 (Olympus, Japão) acoplado a câmera digital Altra SC30 (Olympus, Japão). Realizou-se a contagem do número total de células imunopositivas para cada anticorpo e a área completa da secção transversa que corresponde à mucosa epitelial foi determinada utilizando-se o microscópio e o programa livre de análises morfométricas Image J versão 1.46a (WAYNE, RESEARCH SERVICES BRANCH, 2011), respectivamente.

Por fim, foi determinado o número médio de células endócrinas (CEs) imunopositivas por mm² de mucosa epitelial (CEs mm⁻²) para os quatro peptídeos e os cinco segmentos do tubo digestório amostrados.

3.4 Análise estatística

As diferenças entre o número médio de CEs mm⁻² foram estudadas utilizando-se uma combinação entre os peptídeos (GAS, CCK-8, NPY e CGRP) e os segmentos do tubo digestório (PE, CP, A1, A2 e IP) e aplicando-se, após transformação dos dados originais, ANOVA em um esquema fatorial usando o programa estatístico SAS versão 9.1 (SAS INSTITUTE, 2000). Foram usados 12 peixes como repetição e o nível de significância considerado em todos os testes foi de 5% (P<0,05). Diferenças significativas foram analisadas pelo teste F da ANOVA e as diferenças entre médias comparadas pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi determinada, pela primeira vez, a imunolocalização de GAS, CCK-8, NPY e CGRP em diferentes tipos de células no tubo digestório do dourado *S. brasiliensis*. Todos os anticorpos detectaram seus respectivos peptídeos demonstrando a imunorreação cruzada no dourado. A imunomarcagem para os peptídeos foi observada em células do sistema neuroendócrino difuso e também do sistema nervoso entérico.

4.1 Sistema nervoso entérico

Imunorreação positiva para CGRP e NPY foi observada no plexo mioentérico. Neurônios e fibras nervosas imunorreativas para CGRP foram vistas no plexo mioentérico de todos os segmentos amostrados PE, CP, A1, A2 e IP (Figura 4a, b, c, d, e). Essa localização pode indicar a origem intrínseca dos sinais periféricos a partir do sistema nervoso entérico.

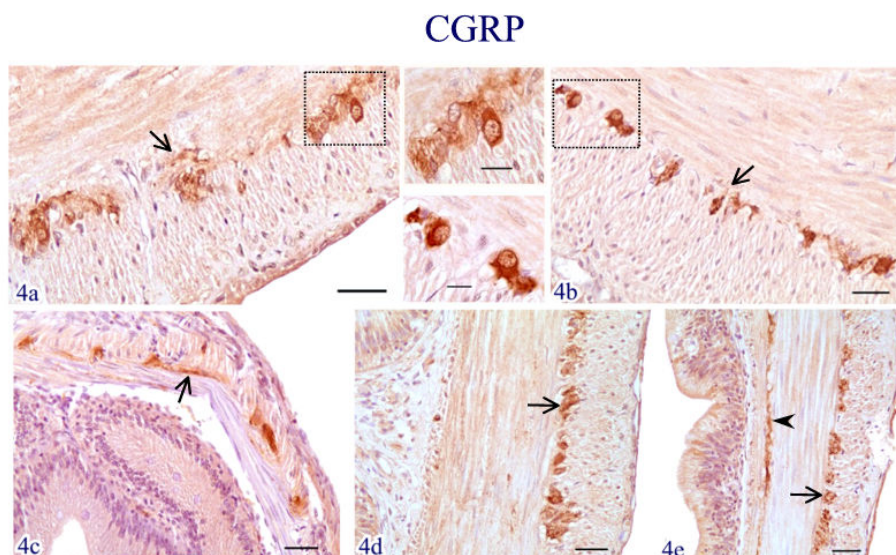


Figura 4 Fotomicrografia da imunorreação de CGRP na camada muscular. (**4a**: alça 2; **4b**: pilórica estomacal; **4c**: cecos pilóricos; **4d**: alça 2; **4e**: intestino posterior). As setas em todas as fotos apontam a imunorreação em neurônios no plexo mioentérico e a cabeça de seta a imunorreação em fibras nervosas dispostas na camada muscular circular interna (Barra = 50 μ m). Note os neurônios ampliados em 3a e 3b (Barra = 20 μ m).

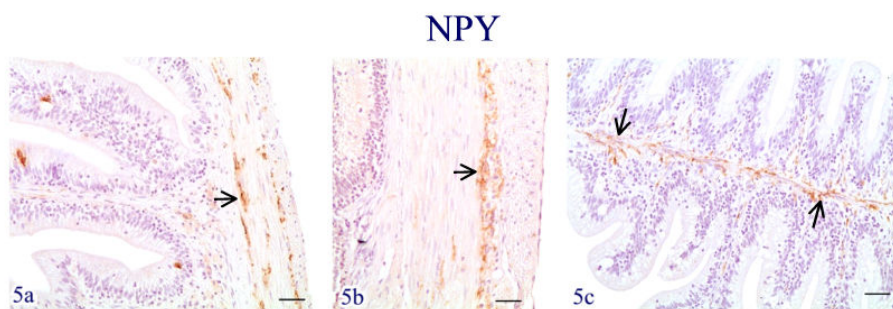


Figura 5 Fotomicrografia da imunorreação de NPY em fibras nervosas da camada muscular e lâmina própria submucosa (**5a**: alça 1; **5b**: alça 2; **5c**: intestino posterior). As setas apontam fibras nervosas imunorreativas a NPY na camada muscular circular interna (**5a**), no plexo mioentérico (**5b**) e na lâmina própria submucosa (**5c**). Barra=50 μ m.

Por sua vez, no plexo mioentérico e na lâmina própria submucosa, só fibras nervosas exibiram imunomarcção positiva para NPY nos segmentos da A1, A2 e IP (Figura 5a, b, c). Imunomarcção semelhante de alguns peptídeos, incluindo NPY e CGRP, no plexo mioentérico foi descrita em espécies de peixes, como *R. quelen* (HERNÁNDEZ et al., 2012), *O. bonariensis* (VIGLIANO et al., 2011), *Salmo trutta* (DEZFULI et al., 2000) e *Anguilla anguilla* (DOMENEGHINI et al., 2000) dentre outras. Entretanto, ainda não existem relatos do papel fisiológico do NPY na regulação local dos processos digestórios em peixes de água doce.

4.2 Sistema neuroendócrino difuso (SNED) gastrintestinal

Imunorreatividade para cada anticorpo empregado foi observada em CEs dispersas entre células epiteliais gástricas e entre enterócitos no epitélio intestinal do dourado (Figura 6). As CEs apresentaram morfologia distinta, sendo que, na região do PE, exibiram formato poliédrico com núcleo arredondado e localizadas principalmente na base das pregas da mucosa estomacal (Figuras 6a, 6c e 6g). Por outro lado, CEs presentes no intestino médio (CP, A1, A2) e posterior (IP) possuíam formato triangular ou alongado, no qual a base é mais larga que o ápice, com núcleo arredondado ou oval situado no centro ou na posição basal (Figuras 6b, 6d, 6e, 6f e 6h). Algumas CEs no intestino apresentaram um ou dois processos citoplasmáticos em direção ao lúmen e no sentido contrário em direção à base da célula (Figuras 6d e 6c). Observações semelhantes em relação ao padrão morfológico de CEs mm^{-2} foram também descritas para outras espécies de peixes (HERNÁNDEZ et al., 2012; VIGLIANO et al., 2011; LEE et al., 2004, PAN et al., 2000).

Diferenças significativas no número médio de CEs mm^{-2} foram detectadas para todos os peptídeos e em todos os segmentos, mostrando que há

interação na densidade de CEs mm^{-2} entre os peptídeos e os diferentes segmentos do tubo digestório estudado (Figura 7). A variação na distribuição de CEs mm^{-2} em função das diferentes regiões do tubo digestório e em associação as variações de hábitos alimentares foi relatada em espécies de peixes e outros animais (BOSI et al., 2006; LEE et al., 2004; PAN et al., 2000; PAN; FANG; ZHAO, 2004; ANDREOZZI et al., 1997; ALUMETS; SUNDLER; HÅKANSON, 1977; SOLCIA et al., 1975; GABE, 1972).

4.2.1 CEs imunopositivas à gastrina (+GAS)

A imunolocalização da GAS mostrou que há CEs desde a PE até o IP. O maior número de CEs mm^{-2} +GAS estava, principalmente, na PE, seguido da A1, com 62% e 13% do total, respectivamente (Figura 7). Considerando os segmentos amostrados, a densidade de CEs mm^{-2} +GAS diminuiu cerca de 79% entre a PE e A1, a partir da qual se manteve relativamente constante e tendeu a diminuir novamente no IP. Dessa forma, à medida que o final do intestino se aproximou menor número de CEs mm^{-2} +GAS foram identificadas.

Em *Gadus morhua*, CEs +GAS foram mais numerosas no CP, seguido da PE e início do intestino médio. Poucas CEs estavam presentes em outras partes do intestino (JONSSON; HOLMGREN; HOLSTEIN, 1987). No caso de *Myoxocephalus scorpius*, poucas CEs +GAS estavam presentes na PE, porém, grande quantidade foi observada no início, no meio e no final do intestino médio (HOLMGREN; OLSSON, 2009; BJENNING; HOLMGREN, 1988).

Um estudo realizado em diferentes porções do estômago de *Oncorhynchus mykiss* (BARRENECHEA; LOPEZ; MARTÍNEZ, 1994) identificou numerosas CEs +GAS somente na PE. Análises imunohistoquímicas do tubo digestório em outros peixes carnívoros como a *S. trutta*, também relataram CEs +GAS nas regiões cecal e pilórica estomacal, nos cecos pilóricos

e no início do intestino médio. Nesse estudo em *S. trutta*, as CEs +GAS foram mais numerosas na PE e na CP. Poucas CEs estavam presentes na região cecal e no início do intestino, enquanto nenhuma célula foi determinada no segmento distal do intestino médio e do intestino posterior (BOSI et al., 2004).

Histologicamente, o estômago de *O. mykiss* (BARRENECHEA; LOPEZ; MARTÍNEZ, 1994) e do dourado (CASTRO et al., 2003) tem três regiões: a cárdica e a cecal, contendo glândulas tubulares e a presença de células oxíntico-pépticas (secretam pepsinogênio e HCl) e região pilórica que não apresenta glândulas. As principais formas de sinalização para a redução na taxa de esvaziamento gástrico após a chegada de alimento no intestino são a liberação duodenal de CCK e de GAS no estômago (LIDDLE et al., 1986). Dessa forma, o padrão de distribuição de CEs +GAS concentrado na PE e adjacente aos CP no intestino observado no dourado, pode dar indícios de uma localização estratégica para que a GAS exerça suas funções fisiológicas de estímulo à secreção gástrica, ao relaxamento do esfíncter pilórico e ao aumento na atividade motora (HOLMGREN; OLSSON, 2009).

4.2.2 CEs imunopositivas à Colecistoquinina (+CCK-8)

A CCK-8 foi identificada em CEs em todos os segmentos amostrados. A maior densidade de CEs mm^{-2} +CCK-8 foi encontrada na PE com 45% do total, assim como observado para GAS, em relação a todos os outros segmentos (Figura 7). Contudo, o número de CEs mm^{-2} +CCK-8 entre CP, A1, A2 e IP não apresentou diferenças significativas entre si e, assim, a quantidade de células se manteve constante do CP até o IP. Redução por volta de 70% foi notada entre a PE e os segmentos do intestino médio e posterior. Apesar de haver diferenças significativamente maiores no número de CEs mm^{-2} +CCK-8 da PE em relação ao intestino, os segmentos amostrados nos intestinos médio e posterior

apresentaram distribuição constante entre si e juntos compreendem 55% do total de CEs +CCK-8.

Em *G. morhua*, similar ao dourado, CEs +CCK foram mais numerosas primeiro no CP, seguido da PE e início do intestino médio. Poucas CEs estavam presentes em outras partes do intestino (JONSSON; HOLMGREN; HOLSTEIN, 1987). Em um estudo realizado em diferentes porções do estômago de *O. mykiss* (BARRENECHEA; LOPEZ; MARTÍNEZ, 1994) identificou numerosas CEs +CCK somente na PE.

Em estudos imunohistoquímicos do tubo digestório em *Salmo trutta* foram encontradas CEs +CCK-8 nos cecos pilóricos e no intestino médio. A maior densidade de células em *S. trutta* foi descrita no segmento inicial do intestino médio, enquanto quantidade moderada estava presente nos cecos pilóricos e no segmento distal do intestino médio. Nesse estudo não foram encontradas CEs +CCK no estômago e no intestino posterior (BOSI et al., 2004). Similar a *S. trutta*, em *Coreoperca herzi*, CEs +CCK-8 somente foram detectadas no intestino médio (LEE et al., 2004). No caso de *P. maxima*, CEs +CCK-8 foram mais numerosas e, principalmente presentes nos cecos pilóricos e no segmento inicial do intestino médio em relação ao segmento final do intestino médio. Nenhuma CE +CCK-8 foi detectada no estômago e no intestino posterior de *P. maxima* (BERMÚDEZ et al., 2007). Relatos da precoce presença de CEs +CCK-8 em larvas de *Sciaenops ocellatus* com 26 dias indicam que CEs são mais abundantes no CP, escassas CEs no intestino médio e ausentes no estômago e IP (WEBB JR et al., 2010).

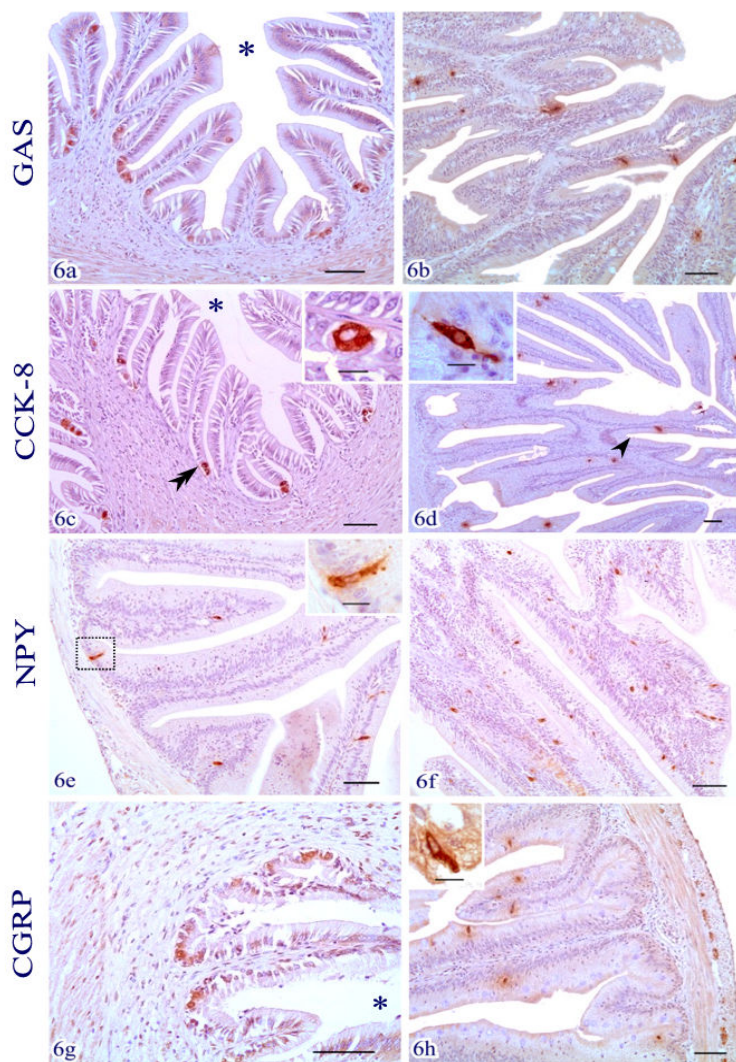


Figura 6 Fotomicrografia de CEs do SNED imunorreativas a GAS, CCK-8, NPY e CGRP no estômago e intestino, Barra = 50 μ m. CEs +GAS no epitélio da PE (6a) e A2 (6b). CEs +CCK-8 no epitélio da PE (6c) e A2 (6d). A cabeça de seta dupla aponta CEs na PE (6c). Note morfologia poliédrica na ampliação em 6c, Barra = 20 μ m. A cabeça de seta aponta CEs no intestino (6d). Note morfologia alongada na ampliação em 6d, Barra = 20 μ m. CEs +NPY no epitélio do CP (6e) e A2 (6f). Note a morfologia alongada da CE na ampliação em 6e, Barra=20 μ m. CEs +CGRP na PE (6g) e A1 (6h). Note a morfologia alongada da CE na ampliação em 6h, Barra = 20 μ m. O asterisco indica o lúmen intestinal ou estomacal.

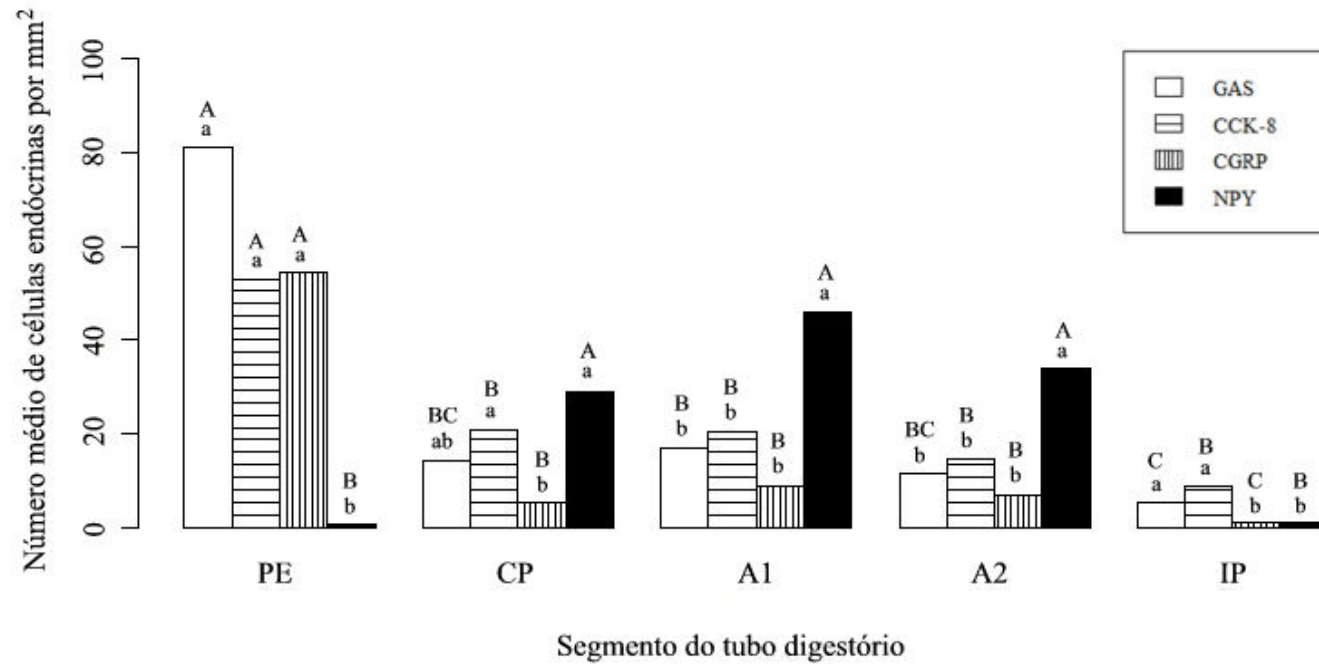


Figura 7 Número médio, obtido pela transformação inversa de $xt = (x + 0,5)^{0,3}$, de células endócrinas imunorreativas por mm^2 de mucosa epitelial para cada anticorpo empregado nos diferentes segmentos do tubo digestório: (PE) região pilórica estomacal, (CP) cecos pilóricos, (A1) alça 1, (A2) alça 2 e (IP) intestino posterior. (GAS) gastrina, (CCK-8) colecistoquinina, (NPY) neuropeptídeo Y e (CGRP) peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Letras maiúsculas comparam cada peptídeo entre os diferentes segmentos. Letras minúsculas comparam cada segmento entre os diferentes peptídeos, Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (ANAVA em esquema fatorial 4x5, Teste Tukey, $P < 0,05$).

Características anatômicas e morfológicas do tubo digestório vêm sendo utilizadas para explicar o padrão de distribuição da CCK em peixes durante e após o desenvolvimento larval. Um modelo de distribuição esperado foi proposto com base em intestino enovelado *versus* intestino reto (WEBB JR et al., 2010; RØNNESTAD et al., 2007). Nesse modelo, a distribuição padrão de células +CCK está intimamente relacionada à presença ou à ausência de um intestino enovelado (RØNNESTAD et al., 2007; KAMISAKA et al., 2005; RØNNESTAD et al., 2003). Em larvas de peixe que têm um intestino enovelado, células +CCK são concentradas, principalmente, no segmento inicial do intestino médio e nos cecos pilóricos de peixes na fase larval (KAMISAKA et al., 2002, 2001; KUROKAWA; SUZUKI; ANDO, 2000). Em peixes como o *Clupea harengus*, que possuem um intestino reto, hibridização *in situ* revelou que as células que contêm mRNA para CCK são encontradas dispersas em todo o intestino, sem áreas com concentração significativa (KAMISAKA et al., 2005), assim como observado neste trabalho para o dourado.

A alta concentração de CEs +CCK na região da PE e adjacente ao CP no dourado sugere a importância da CCK para a função dessa porção do tubo digestório em peixes (WEBB JR et al., 2010). Esses segmentos do tubo digestório representam uma região estratégica, uma vez que compreendem o final do estômago, o início do intestino, a inserção dos cecos pilóricos e é onde desembocam os ductos biliar e pancreático. Considerando as principais funções atribuídas à CCK, de contração da vesícula biliar, secreção de enzimas pancreáticas, estímulo à motilidade gastrointestinal e inibição do esvaziamento gástrico (CRAWLEY; CORWIN, 1994; GRIDER, 1994; JENSEN; HOLMGREN, 1994), é possível que a maior densidade de CEs +CCK-8 próxima ao esfíncter pilórico e CP no dourado seja um local chave para regular a passagem da digesta do estômago para os cecos pilóricos e para promover a liberação adequada da secreção pancreática e biliar, de forma similar ao relatado

para larvas de *S. ocellatus* (WEBB JR et al., 2010). Além disso, a CCK foi indicada ser um dos estímulos ao peristaltismo reverso, o qual pode servir de mecanismo para favorecer o enchimento dos cecos pilóricos e contribuir para a mistura entre ingesta e enzimas (RØNNESTAD et al., 2007; RØNNESTAD; ROJAS GARCIA; SKADAL, 2000; OLSSON; HOLMGREN, 2001; BARTHÓ et al., 1982).

4.2.3 CEs imunopositivas ao neuropeptídeo Y (+NPY)

A imunohistoquímica mostrou que CEs +NPY exibiram uma distribuição restrita. O maior número de CEs mm⁻² +NPY estava concentrado nos segmentos do intestino médio que compreendem o CP, A1 e A2 com diferenças significativas em relação a PE e IP. Além disso, os três segmentos juntos representaram 98% do total de CEs +NPY. Por outro lado, pequeno número de CEs mm⁻² +NPY foi observado na PE e IP, os quais não possuem diferenças significativas entre si (Figura 7).

Em estudos do tubo digestório de *Ictalurus punctatus* (MIN; KAI-YU; YU, 2009) e *Pseudophoxinus antalyae* (ÇINAR; SENOL; OZEN, 2006) também demonstrou que, apesar de raras, CEs +NPY se concentraram na mucosa epitelial do intestino médio e nenhuma célula foi determinada no estômago ou IP. Em *Anguilla anguilla*, CEs +NPY foram também raras e presentes no intestino médio e posterior, igualmente sem imunorreação no estômago (DOMENEGHINI et al., 2000). Similar ao observado em *I. punctatus*, *P. antalyae*, *A. anguilla* e em dourado neste estudo, em *R. quelen* CEs +NPY foram bastante numerosas no intestino médio, principalmente em sua porção inicial (HERNÁNDEZ et al., 2012) e não houve imunorreatividade para NPY no estômago.

O intestino médio constitui o segmento do tubo digestório com maior eficiência na absorção de nutrientes, embora haja diferenças entre espécies e, em algumas delas, todo o intestino possua capacidade de absorção, a distribuição de transportadores diminui e, conseqüentemente, a taxa de absorção, nos segmentos mais distais (BAKKE et al., 2010; BUDDINGTON et al., 1987; BUDDINGTON; DIAMOND, 1987). Por esta razão, a grande densidade de CEs +NPY restritas ao intestino médio estariam estrategicamente localizadas em uma região de maior taxa de absorção e permitiria, assim, monitorar com eficiência o tipo e a quantidade de nutrientes absorvidos. A principal expressão de NPY ocorre no cérebro de peixes (YOKOBORI et al., 2012; MACDONALD; VOLKOFF, 2009; CERDÁ-REVERTER et al., 2000), uma vez que esse peptídeo é um potente fator orexigênico no SNC. Contudo, a sua expressão no sistema gastrointestinal também é evidente (HERNÁNDEZ et al., 2012; VIGLIANO et al., 2011; ÇINAR; SENOL; OZEN, 2006).

Entretanto, o NPY não parece exercer um papel específico nos processos digestórios (HOSKINS; VOLKOFF, 2012; LÓPEZ-PATIÑO et al., 1999; NARNAWARE; PETER 2001; SILVERSTEIN et al., 2001; VOLKOFF, 2006). Neste contexto, considerando o padrão de distribuição de CEs e fibras no plexo mioentérico +NPY em dourado e achados similares em outros peixes carnívoros, é possível sugerir que CEs produtoras de NPY no intestino constituem uma fonte de sinalização e monitoramento periférica para o centro hipotalâmico de regulação da ingestão de alimento.

4.2.4 CEs imunopositivas ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (+CGRP)

O peptídeo CGRP apareceu em CEs de todos os segmentos estudados. A maior densidade de CEs mm^{-2} +CGRP foi localizada na PE (assim como visto

para GAS e CCK-8), correspondendo a 72%. Os segmentos CP, A1 e A2 apresentaram número de CEs mm^{-2} +CGRP intermediário, sem diferenças significativas entre si (Figura 7). Redução de 90% no número CEs é visto da PE para o CP. Quando considerados somados, os segmentos CP, A1 e A2 corresponderam a 27% do total de CEs mm^{-2} +CGRP. Por outro lado, a menor densidade de CEs foi detectada no IP, com cerca de 1% do total. Portanto, pode-se observar que a densidade de CEs +CGRP foi alta na PE, manteve-se estável nos segmentos do CP, A1 e A2 e, por fim, diminuiu significativamente mais uma vez no IP.

Resultados semelhantes obtidos em *P. antalyae* demonstraram CEs +CGRP mais abundantes no estômago e no intestino médio, enquanto diminuição significativa ocorreu no intestino posterior (ÇINAR; SENOL; OZEN, 2006).

Em oposição, em *P. maxima* CEs +CGRP foram mais abundantes nos cecos pilóricos e no segmento inicial do intestino médio, enquanto poucas células foram vistas no segmento intermediário do intestino médio. Nenhuma CE +CGRP foi encontrada no estômago e no intestino posterior (BERMÚDEZ et al., 2007). Similar a *P. maxima*, em *R. quelen* as CEs +CGRP foram observadas, ainda que escassas, somente nos dois primeiros segmentos do intestino médio, sendo mais numerosas no primeiro segmento. Contudo, não foram visualizadas CEs +CGRP no estômago, no segmento final do intestino médio e no reto (HERNÁNDEZ et al., 2012).

O peptídeo CGRP, neste estudo, estava distribuído no plexo mioentérico em todos os segmentos amostrados do tubo digestório e em CEs especialmente concentradas na PE do dourado. Os principais efeitos do CGRP em peixes incluem inibição da motilidade gastrintestinal e inibição do consumo de alimento (SHAHBAZI et al., 1998; MARTINÉZ-ÁLVAREZ et al., 2009). A partir dos resultados da análise imunohistoquímica no dourado e em outros

peixes, o padrão de distribuição das CEs +CGRP próximo ao final do estômago (região do esfíncter pilórico) e início do intestino médio pode indicar uma imunolocalização chave. Isso porque essas regiões constituem um ponto crítico de controle do fluxo da digesta entre o estômago e o intestino. Dessa forma, a maior concentração de CEs +CGRP estaria principalmente nessa porção para monitorar a presença de quimo no lúmen e, assim, sinalizar ao sistema nervoso entérico que regula a atividade motora.

5 CONCLUSÃO

A utilização de anticorpos desenvolvidos contra peptídeos de mamíferos foi eficiente na imunolocalização de GAS, CCK-8, NPY e CGRP no dourado. Todos os peptídeos foram identificados em todos os segmentos amostrados, ainda que escassos em determinados segmentos. GAS, CCK-8 e CGRP se concentraram, principalmente, na região pilórica estomacal e nos cecos pilóricos. Já o NPY foi notavelmente restrito ao intestino médio do dourado.

A imunolocalização dos peptídeos moduladores GAS, CCK-8, NPY e CGRP em CEs no tubo digestório do dourado mostrou um padrão de distribuição que foi semelhante ao de outras espécies carnívoras. Ainda que particularidades existam entre espécies, em geral, parece haver um padrão de distribuição que, em partes, pode ter justificativas no hábito alimentar e características morfoanatômicas do sistema digestório.

Dadas a complexidade e a ampla variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos capazes de modular o DNES, estudos mais aprofundados são necessários para um melhor entendimento dos fatores que determinam o padrão de distribuição desses peptídeos ao longo do tubo digestório em peixes.

REFERÊNCIAS

- AHLMAN, H.; NILSSON, O. The gut as the largest endocrine organ in the body. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 63-68, 2001.
- ALDMAN, G. et al. Gastrin/CCK-like peptides in the spiny dogfish, *Squalus acanthias* concentrations and actions in the gut. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, Oxford, v. 92, n. 1, p. 103-108, 1989.
- ALDMAN, G.; GROVE, D. J.; HOLMGREN, S. Duodenal acidification and intra-arterial injection of CCK8 increase gallbladder motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 86, p. 20-25, Apr. 1992.
- ALDMAN, G.; HOLMGREN, S. Control of gallbladder motility in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 4, p. 143-155, 1987.
- ALDMAN, G.; HOLMGREN, S. Intraduodenal fat and amino acids activate gallbladder motility in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 100, n. 1, p. 27-32, Oct. 1995.
- ALUMETS, J.; SUNDLER, F.; HÅKANSON, R. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cells in the pancreas and gut. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 186, n. 4, p. 467-479, 1977.
- AMARA, G. S. et al. Alternative RNA processing in calcitonin gene-expression generates mRNA encoding different polipeptide products. **Nature**, London, v. 298, n. 5871, p. 240-244, 1982.
- ANDREOZZI, G. et al. VIP-like immunoreactivity in the intestinal tract of fish with different feeding habits. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 41, n.1, p. 57-64, 1997.
- ANDREW, A.; KRAMER, B.; RAWDON, B. B. Gut and pancreatic amine precursor uptake and decarboxylation cells are not neural crest derivatives. **Gastroenterology**, New York, v. 84, n. 2, p. 429-431, 1983.

ANDREW, A.; KRAMER, B. The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells-The last word? **Journal of Pathology**, New York, v. 86, n. 2, p.117-118, Oct. 1998.

BAKKE, A. M. et al. Competition between selenomethionine and methionine absorption in the intestinal tract of green sturgeon *Acipenser medirostris*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 62-69, Jan. 2010.

BALASUBRAMANIAM, A. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists. **Peptides**, Oxford, v. 18, n.3, p. 445-457, 1997.

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A.; TURNER, D. R. **Theory and practice of histological techniques**. 4th. ed. London: Churchill Livingstone, 2008.

BARKER, N.; CLEVERS, H. Tracking down the stem cells of the intestine: Strategies to identify adult stem cells. **Gastroenterology**, New York, v. 133, n. 6, p. 1755-1760, Dec. 2007.

BARKER, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, London, v. 449, p. 1003-1007, Oct. 2007.

BARKER, N.; WETERING, M. VAN DE; CLEVERS, H. The intestinal stem cell. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 22, n. 14, p. 1856-1864, July 2008.

BARRACHINA, M. D. et al. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. **Proceedings of the National Academic of Sciences USA**, Washington, v. 94, n. 19, p. 10455-10460, Sept. 1997.

BARRENECHEA, M. A.; LOPEZ, J.; MARTÍNEZ, A. Regulatory peptides in gastric endocrine cells of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: general distribution and colocalizations. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 26, n. 3, p. 309-321, Jan. 1994.

BARTHÓ, L. et al. Effects of substance P, cholecystokinin octapeptide, bombesin and neurotensin on the peristaltic reflex of the guinea-pig ileum in the absence and in the presence of atropine. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, Heidelberg, v. 321, n. 4, p. 321-328, Dec. 1982.

BERMÚDEZ, R. et al. Immunohistochemical study on the neuroendocrine system of the digestive tract of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), infected by *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa). **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 22, p. 252-263, June 2007.

BERNIER, N. J.; BEDARD, N.; PETER, R. E. Effects of cortisol on food intake, growth and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 135, n. 2, p. 230-240, Jan. 2004.

BJENNING, C.; HOLMGREN, S. Neuropeptides in the fish gut. An immunohistochemical study of evolutionary patterns. **Histochemistry**, Berlin, v. 88, n. 2, p. 155-163, 1988.

BLOMQVIST, A. G. et al. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken, goldfish and *Torpedo marmorata* DNA clones. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 89, n. 6, p. 2350-2354, Mar. 1992.

BOEL, E.; VUUST, J.; NORRIS, F. Molecular cloning of human gastrin cDNA: evidence for evolution of gastrin by gene duplication. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 80, n. 10, p. 2866-2869, 1983.

BORDI, C. et al. Classification of gastric endocrine cells at the light and electron microscopical levels. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 48, n. 5, p. 258-271, Mar. 2000.

BOSI, G. et al. A comparative immunohistochemical study on a galanin-like peptide in the neuroendocrine system of the alimentary canal of three species of siluriform catfishes. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 68, p. 86-100, Mar. 2006.

BOSI, G. et al. An immunohistochemical study on the neuroendocrine system in the alimentary canal of the brown trout, *Salmo trutta*, L., 1758. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 138, p. 166-181, July 2004.

BRAIN, S. D.; GRANT, A. D. Vascular actions of calcitonin gene related peptide and adrenomedullin. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 84, n.3, p. 903-934, July 2004.

BUDDINGTON, R. K.; DIAMOND, J. M. Pyloric ceca of fish: a “new” absorption organ. **American Journal of Physiology and Gastroenterology**, Bethesda, v. 252, n. 1, p. 65-76, Jan. 1987.

BUDDINGTON, R. K ; KUZ'MINA, V. Digestive system: gross functional anatomy. In: OSTRANDER, G. K.). (Ed.). **The laboratory fish**. San Diego: Academic Pressure, 2000b. Part 3, p. 173-178.

BUDDINGTON, R. K.; KUZ'MINA, V. **Digestive system**: microscopy functional anatomy In: OSTRANDER, G. K.). (Ed.). **The laboratory fish**. San Diego: Academic Pressure, 2000a. Part 4, p. 379-412.

BURDYGA, G. et al. Cholecystokinin regulates expression of Y2 receptors in vagal afferent neurons serving the stomach. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 28, n. 45, p. 11583-11592, Nov. 2008.

BURDYGA, G. et al. Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans. **Gastroenterology**, New York, v. 124, n. 1, p. 129-139, Jan. 2003.

CAMPO, S. et al. Gastrin mRNA of *Diplodus Sargus*. **Biochemical, Physiological and Nutritional Sciences**, Messina, July 2011. (Submission, 98125).

CAMPOS, V. F. et al. Identification, tissue distribution and evaluation of brain neuropeptide Y gene expression in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 35, n. 3, p.405-413, Sept. 2010.

CARPIO, Y. et al. Cloning, expression and growth promoting action of Red tilapia (*Oreochromis sp.*) neuropeptide Y. **Peptides**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 710-718, Apr. 2006.

CASTRO, E. F. et al. Caracterização histológica e detecção de células endócrinas no estômago de peixes de água doce, com diferentes hábitos alimentares. **Biotemas**, Florianópolis, v.16, n. 2, p. 105-130, 2003.

CERDÁ-REVERTER, J. M. et al. Molecular evolution of the neuropeptide Y (NPY) family of peptides: cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 95, n. 1-3, p. 25-34, Nov. 2000.

CERDÁ-REVERTER, J. M.; LARHAMMAR, D. Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 78, n. 3, p. 371-392, 2000.

CHANDRA, R.; LIDDLE, R. A. Cholecystokinin. **Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 63-67, Feb. 2007.

CHEE, M. J.; COLMERS, W. F. Why eat? **Nutrition**, New York, v. 24, n. 9, p. 869-877, Sept. 2008.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **American Journal of Anatomy**, Baltimore, v. 141, n. 4, p. 537-561, Dec. 1974.

CHIBA, A. Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the bichir, *Polypterus senegalus*, with special regard to the terminal nerve. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 289, n. 2, p. 275-284, Aug. 1997.

CHIBA, A.; HONMA, Y. Neuropeptide Y-immunoreactive structures in the telencephalon and diencephalon of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, with special regard to the hypothalamo-hypophyseal system. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 57, n. 1, p. 77-86, Mar. 1994.

CIACCIO, C. Sopra speciali cellule granulose della mucosa intestinale. **Archives Italian of Anatomy and Embryology**, Firenze, v. 6, p. 482-98, 1906.

ÇINAR, K.; SENOL, N.; OZEN, M. R. Immunohistochemical study on distribution of endocrine cells in gastrointestinal tract of flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 42, p. 6874-6878, Sept. 2006.

CLARK, M. S. et al. Calcitonin: characterisation and expression in a teleost fish, *Fugu rubripes*. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 28, n. 2, p. 111-123, Apr. 2002.

CRAWLEY, J. N.; CORWIN, R. L. Biological actions of cholecystokinin. **Peptides**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 731-755, 1994.

DAIRIKI, J. K. **Exigências em aminoácidos e farelo de soja na nutrição de juvenis de dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816)**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia. Ciência Animal e Pastagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Piracicaba, 2009.

DANGER, J. M. et al. Neuropeptide Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 128, n. 5, p. 2360-2368, May 1991.

DATE, Y. et al. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 146, n. 8, p. 3518-3525, Aug. 2005.

DE LARTIGUE, G. et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 27, n. 11, p. 2876-2882, Mar. 2007.

DE PEDRO, N. et al. NPY receptors and opioidergic system are involved in NPY-induced feeding in goldfish. **Peptides**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 1495-1502, Oct. 2000.

DESCHENES, R. J.; HAUN, R. S.; FUNCKES, C. L. A gene encoding rat cholecystokinin. Isolation, nucleotide sequence, and promoter activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 2, p. 1280-1286, Jan. 1985.

DESCHENES, R. J.; LORENZ, L. J.; HAUN, R. S. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 81, n. 3, p. 726-730, 1984.

DEZFULI, B. S. et al. Immunohistochemical detection of neuromodulators in the intestine of *Salmo trutta* L. naturally infected with *Cyathocephalus truncates* Pallas (Cestoda). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 265-273, July 2000.

DIMALINE, R.; DOCKRAY, G. J. Evolution of the gastrointestinal endocrine system (with special reference to gastrin and CCK). **Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism**, London, v. 8, n. 1, p. 1-24, Jan. 1994.

DOCKRAY, G. J. Cholecystokinin and gut-brain signalling. **Regulatory Peptides**, Oxford, v. 155, n. 1-3, p. 6-10, June 2009.

DOCKRAY, G. J.; VARRO, A.; DIMALINE, R. The gastrins: their production and biological activities. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 63, p. 119-139, 2001.

DOMENEGHINI, C. et al. Neurotransmitters and putative neuromodulators in the gut of *Anguilla anguilla* (L.). Localizations in the enteric nervous and endocrine systems. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v.44, n. 3, p. 295-306, 2000.

DOODS, H. et al. CGRP antagonists: unravelling the role of CGRP in migraine. **Trends in Pharmacological Sciences**, Cambridge, v. 28, n. 11, p. 580-587, Nov. 2007.

DOYON, C. et al. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are elevated in the preoptic area of socially subordinate rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 133, n. 2, p. 260-271, Sept. 2003.

DUFRESNE, M.; SEVA, C.; FOURMY, D. Cholecystokinin and gastrin receptors. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 86, n. 3, p. 805-847, July 2006.

DUMONT, Y. et al. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 38, n. 2, p. 125-167, 1992.

EDKINS, J. S. The chemical mechanism of gastric secretion. **Proceedings of the Real Society of London**, London, v. 76, p. 376, May 1905.

ENGELSTOFT, M. S. et al. A gut feeling for obesity: 7TM sensors on enteroendocrine cells. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 8, n. 6, p. 447-449, Dec. 2008.

ESTEVES, K. E.; PINTO LÔBO, A. V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (Pisces Characidae) at Cachoeira das Emas, Mogi-Guaçu River (São Paulo State, Southeast Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 267-276, 2001.

EVA, C. et al. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Orlando, v. 27, n. 3, p. 308-339, Sept. 2006.

FEYRTER, F. **Ober diffuse endoknne epitheliale organe**. Leipzig: Barth 1938.

FONTAINE, J.; LE LIEVRE, C.; LE DOUARIN, N. M. What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryos? **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 33, n. 3, p. 394-404, 1977.

FORGAN, L. G.; FORSTER, M. E. Effects of potential mediators of an intestinal brake mechanism on gut motility in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C-Toxicology & Pharmacology**, Amsterdam, v. 146, n. 3, p. 343-347, Sept. 2007.

FORSTER, E. R. et al. Gastric emptying in rats: role of afferent neurons and cholecystokinin. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 258, n. 4, p. 552-556, Apr. 1990.

GABE, M. Données histologiques sur les cellules endocrines gastro duodénales des amphibiens. **Archivum Histologicum Japonicum**, Okayama, v. 35, p. 51-81, 1972.

GERALD, C. et al. A receptor subtype involved in neuropeptide Y - induced food intake. **Nature**, London, v. 382, p. 168-171, 1996.

GREGORY, H. et al. Structure of gastrin. **Nature**, London, v. 204, p. 931-933, Dec. 1964.

GREGORY, R. A.; TRACY, H. J. Preparation and properties of gastrin. **Journal of Physiology**, London, v.156, p. 523-543, Nov. 1961.

TRACY, H. J.; GREGORY, R. A. Physiological properties of series of synthetic peptides structurally related to gastrin . **Nature**, London, v. 204, n. 496, p. 935-938, 1964.

GREGORY, R. A.; TRACY, H. J. Constitution + properties of 2 gastrins extracted from hog antral mucosa .I. isolation of 2 gastrins from hog antral mucosa .2. properties of 2 gastrins isolated from hog antral mucosa. **Gut**, London, v. 5, n. 2, p. 103-107, 1964.

GRIDER, J. R. Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 8, p. 1334-1339, 1994.

GUTIERREZ-AGUILAR, R.; WOODS, S. C. Nutrition and L and K- enteroendocrine cells. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, Philadelphia, v. 18, n. 1, p. 35-41, Feb. 2011.

HADLEY, M. E.; LEVINE, J. E. **Endocrinology**. London: Pearson Education, 2006. Cap. 10, p. 211-236. (Gastrointestinal Hormones, 6).

HELANDER, H. F.; FÄNDRIS, L. The enteroendocrine “letter cells”-time for a new nomenclature? **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 47, p. 3-12, Oct. 2012.

HENDRY, H. C. Organization of neuropeptide Y neurons in the mammalian central nervous system. In: COLMERS, W. F.; WAHLESTEDT, C. (Ed.). **The biology of neuropeptide Y and related peptides**. New Jersey: Humana Press, Ottawa, 1993. p. 65-156.

HERNÁNDEZ, D. R. et al. Neuroendocrine system of the digestive tract in *Rhamdia quelen* juvenile: An immunohistochemical study. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v. 44, n. 4, p. 220-226, Aug. 2012.

HIMICK, B. A.; PETER, R. E. CCK gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 267, n. 3, p. 841-851, Sept. 1994.

HIMICK, B. A.; VIGNA, S. R.; PETER, R. E. Characterization of cholecystokinin binding sites in goldfish brain and pituitary. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 271, N. 1, p. 137-143, July 1996.

HOLMGREN, S. et al. Neuropeptides in the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri* effects in vivo and presence in autonomic nerves. **American Journal of Physiology: regulatory, integrative and comparative physiology** 35, Bethesda, v. 266, n. 5, p. 1568-1577, May 1994.

HOLMGREN, S.; JÖNSSON, A. C. Occurrence and effects on motility of bombesin related peptides in the gastrointestinal tract of the Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 249-256, 1988.

HOLMGREN, S.; OLSSON, C. The neuronal and endocrine regulation of gut function. In: BERNIER, N. J. et al. (Ed.). **Fish neuroendocrinology**. Amsterdam: Academic Press, 2009. p. 467-512.

HOSKINS, L. J.; VOLKOFF, H. The comparative endocrinology of feeding in fish: Insights and challenges. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 176, p. 327-335, Dec. 2012.

HOYLE, C. H. V. Neuropeptide families and their receptors: Evolutionary perspectives. **Brain Research**, Amsterdam, v. 848, n.1-2, p. 1-25, Nov. 1999.

HYATT, K. D. Feeding strategy. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. (Ed.). **Fish physiology**. London: Academic Press, 1979. p. 71-120.

INNIS, R. B.; SNYDER, S. H. Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 77, n. 11, p. 6917-6921, 1980.

INUI, A. Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides-mediation of the actions of leptin. **Trends in Neurosciences**, Cambridge, v. 22, n. 2, p. 62-67, Feb. 1999.

IVY, A. C.; GOLDBERG, E. A hormone mechanism for gall-bladder contraction and evacuation. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 86, p. 599-613, June 1928.

JANSZ, H. S.; ZANDBERG, J. Identification and partial characterization of the salmon calcitonin/CGRP gene by polymerase chain reaction. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 657, p. 63-69, Jun. 1992.

JANSZ, H. et al. Identification of a new calcitonin gene in the salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 93, n. 22, p. 12344-12348, Oct. 1996.

JENNINGS, B. L. et al. Mechanisms of vasodilation in the dorsal aorta of the elephant fish, *Callorhynchus milii* (Chimaeriformes: Holocephali). **Journal of Comparative Physiology Part B-Biochemistry & Molecular Biology**, Amsterdam, v.177, n. 5, p. 557-567, July 2007.

JENSEN, J.; HOLMGREN, S. The gastrointestinal canal. In: BURNSTOCK, G. (Ed.). **The autonomic nervous system**. Switzerland: Harwood Academic/Comparative Physiology and Evolution of the Autonomic Nervous System, 1994. p. 119-167.

JENSEN, J. Regulatory peptides and control of food intake in non mammalian vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 128, n. 3, p. 471-479, Mar. 2001.

JENSEN, H. et al. Identification and distribution of CCK-related peptides and mRNAs in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1517, n. 2, p. 190-201, Jan. 2001.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman and Hall, 1995.

JOHNSEN, A. H. et al. Elasmobranchs express separate cholecystokinin and gastrin genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 94, n. 19, p. 10221-10226, Sept. 1997.

JOHNSEN, A. H. Phylogeny of the cholecystokinin/gastrin family. **Frontiers in Neuroendocrinology**, Orlando, v. 19, n. 2, p. 73-99, Apr. 1998.

JONSSON, A. C.; HOLMGREN, S.; HOLSTEIN, B. Gastrin/CCK-like immunoreactivity in endocrine cells and nerves in the gastrointestinal tract of the cod, *Gadus morhua*, and the effect of peptides of the gastrin/CCK family on cod gastrointestinal smooth muscle. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 66, n. 2, p. 19-202, May 1987.

JONSSON, E. et al. Circulating levels of cholecystokinin and gastrin-releasing peptide in rainbow trout fed different diets. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 148, n. 2, p. 187-194, Sept. 2006.

KAGSTRÖM, J.; HOLMGREN, S. Calcitonin gene-related peptide (CGRP), but not tachykinins, causes relaxation of small arteries from the rainbow trout gut. **Peptides**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 577-584, 1998.

KALRA, S. P. et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine Reviews**, Bethesda, v. 20, n. 1, p. 68-100, Feb. 1999.

KAMIJI, M. M.; INUI, A. Neuropeptide Y receptor selective ligands in the treatment of obesity. **Endocrine Reviews**, Bethesda, v. 28, n. 6, p. 664-684, Oct. 2007.

KAMIJO, M. et al. Neuropeptide Y in tiger puffer (*Takifugur ubripes*): distribution, cloning, characterization and mRNA expression responses to prandial condition. **Zoological Science**, Tokyo, v. 28, n. 12, p. 882-890, Dec. 2011.

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

KAMISAKA, Y. et al. Ontogeny of cholecystokinin-immunoreactive cells in the digestive tract of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, larvae. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 123, n. 1, p. 31-37, July 2001.

KAMISAKA, Y. et al. Ontogeny of cholecystokinin immunoreactive cells in the digestive tract of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, larvae. **North Atlantic Marine Science**, Basingstoke, v. 87, n. 3, p. 258-262, 2002.

KARILA, P. et al. Projections and actions of tachykininergic, cholinergic, and serotonergic neurones in the intestine of the Atlantic cod. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 291, n. 3, p. 403-413, Mar. 1998.

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 Part A Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 146, n. 3, p. 451-461, Mar. 2007.

KONO, T.; SAKAI, M. Molecular cloning and expression of preproadrenomedullin gene from common carp *Cyprinus carpio* L. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 138, n. 1, p. 78-88, Aug. 2004.

KOPIN, A. S. et al. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 89, n. 8, p. 3605-3609, Apr. 1992.

KUBITZA, F. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE

NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1995, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: CBNA, 1995.p. 91-115.

KUROKAWA, T.; SUZUKI, T.; ANDO, H. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 120, n. 1, p. 8-16, Oct. 2000.

KUROKAWA, T.; SUZUKI, T.; HASHIMOTO, H. Identification of gastrin and multiple cholecystokinin genes in teleost. **Peptides**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 227-235, Feb. 2003.

LAFONT, A. G.; DUFOUR. S.; FOUCHEREAU-PERON, M. Characterisation and distribution of calcitonin gene-related peptide in a primitive teleost, the eel *Anguilla anguilla* and comparison with calcitonin. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 117, n. 2, p. 141-148, Feb. 2004.

LANGER, M. et al. Peptide hormone-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract and endocrine pancreas of eleven teleost species. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 199, n. 3, p. 493-508, July 1979.

LARHAMMAR, D.; BLOMQUIST, A. G.; SÖDERBERG, C. Evolution of neuropeptide Y and its related peptides. **Comparative Biochemistry and Physiology**, London, v. 106, n. 3, p. 743-752, Nov. 1993.

LARHAMMAR, D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 1-11, Apr. 1996a.

LARHAMMAR, D.; SALANECK, E. Molecular evolution of NPY receptor subtypes. **Neuropeptides**, Edinburgh, v. 38, n. 4, p. 141-151, Aug. 2004.

LARHAMMAR, D. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 165-174, Sept. 1996b.

LARSSON, T. A. et al. Neuropeptide Y-family peptides and receptors in the elephant shark (*Callorhynchus milii*) confirm gene duplications before the gnathostome radiation. **Genomics**, San Diego, v. 93, n. 3, p. 254-260, Mar. 2009.

LE DOUARIN, N. M. On the origin of pancreatic endocrine cells. **Cell**, Cambridge, v. 53, n. 2, p. 169-171, Apr. 1988.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **Current Contents: Agriculture Biology and Environmental Sciences**, Philadelphia, v. 39, p. 18-18, Sept. 1987.

LE MÉVEL, J.C. et al. Heart rate variability, a target for the effects of angiotensin II in the brain of the trout *Oncorhynchus mykiss*. **Brain Research**, Amsterdam, v. 947, n. 1, p. 34-40, Aug. 2002.

LEE, J. H. et al. Immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the Korean aucha perch. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 170-181, July 2004.

LEONARD, J. B. K., WALDBIESER, G. C., SILVERSTEIN, J. T. Neuropeptide Y sequence and messenger RNA in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Marine Biotechnology**, New York, v. 3, n. 2, p. 111-118, Mar. 2001.

LEONG, J. S. et al. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 279, 2010.

LI, Y.; OWYANG, C. Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathway in rats. **Gastroenterology**, New York, v. 107, n. 2, p. 525-31, Aug. 1994.

LIANG, X. F. et al. Molecular characterization of neuropeptide Y gene in Chinese perch, an acanthornorph fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B - Biochemistry & Molecular Biology**, Amsterdam, v. 148, n. 1, p. 55-66, Sept. 2007.

LIDDLE, R. A. et al. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 75, n. 4, p. 1144-1152, 1985.

LIDDLE, R.A. et al. Regulation of gastric emptying in humans by cholecystokinin. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 77, n. 3, p. 992-996, Mar. 1986.

LIMA, F. C. T.; BRITSKI, H. A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 5, n. 3, p. 237-244, July/Sept. 2007.

LINDNER, D.; STICHEL, J.; BECK-SICKINGER, A. G. Molecular recognition of the NPY hormone family by their receptors. **Nutrition**, New York, v. 24, n. 9, p. 907-917, Sept. 2008.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*). **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 377, n. 2-3, p. 147-153, July 1999.

LOVE, R. M. **The chemical biology of fishes**. London. Academic Press, 1970.

LUTZ, T. A. et al. Evidence for a physiological role of central calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in the control of food intake in rats. **Neuroscience Letters**, East Park, v. 230, n. 3, p. 159-62, July 1997.

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**, New York, v. 161, n. 2, p. 252-261, Apr. 2009.

MACHADO, C. **Aspectos reprodutivos do dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) (Teleostei, Characidae) na região do Alto Rio Uruguai, Brasil**. 2003. 61 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

MAKHLOUF, G. M. The neuroendocrine design of the gut. The play of chemicals in a playground. **Gastroenterology**, New York, v. 67, n. 1, p. 159-184, July 1974.

MARTÍNEZ, V.; TACHÉ, Y. Peripheral adrenomedullin inhibits gastric emptying through CGRP₈₋₃₇-sensitive receptors and prostaglandins pathways in rats. **Peptides**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 1376-1382, June 2006.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M. et al. Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP), adrenomedullin and adrenomedullin-2/intermedin on food intake in goldfish (*Carassius auratus*). **Peptides**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 803-807, Apr. 2009.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ A, R. M. et al. Molecular characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) related peptides (CGRP, amylin, adrenomedullin and adrenomedullin-2/intermedin) in goldfish (*Carassius auratus*): Cloning and distribution. **Peptides**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1534-1543, Sept. 2008.

MASSON, P. La glande endocrine de l'intestin chez l'homme. **Académie des Sciences**, Paris; v. 158, p. 59-61, 1914.

MATSUDA, K. et al. Relationship between melanin concentrating hormone and neuropeptide Y containing neurons in the goldfish hypothalamus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 153, n. 1, p. 3-7, May 2009.

MAZUMDAR, M. et al. Involvement of neuropeptide Y Y1 receptors in the regulation of LH and GH cells in the pituitary of the catfish, *Clarias batrachus*: An immunocytochemical study. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 149, n. 2, p. 190-196, Nov. 2006.

MEYER, A. Y. PEER VAN DE. From 2r to 3r: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). **BioEssays**, Hoboken, v. 27, n. 9, p. 937-945, Sept. 2005.

MEZEY, E.; PALKOVITS, M. Localization of targets for anti-ulcer drugs in cells of the immune system. **Science**, New York, v. 258, p. 1662-1665, 1992.

MICHEL, M. C. et al. XVI, International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 50, n. 1, p. 143-150, Mar. 1998.

MILLER, L. J.; GAO, F. Structural basis of cholecystokinin receptor binding and regulation. **Pharmacology and Therapeutics**, Philadelphia, v. 119, n. 1, p. 83-95, July 2008.

MIN, H.; KAI-YU, W.; YU, Z. Immunocytochemical Identification and Localization of Diffuse Neuroendocrine System (DNES) Cells in Gastrointestinal Tract of Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*). **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v. 8, n. 2, p. 238-243, Feb. 2009.

MIURA, T. et al. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. **Peptides**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 1207-1213, June 2007.

MODLIN, I. M. et al. Evolution of the Diffuse Neuroendocrine System-Clear Cells and Cloudy Origins. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 84, p. 69-82, Nov. 2006.

MODLIN, I. M.; TANG, L. H. A new look at the old hormones: Gastrin. **Trends In Endocrinology and Metabolism**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 51-57, Mar. 1993.

MORAIS FILHO, M. B.; DE SCHUBART, O. Contribuição ao estudo do Dourado (*Salminus maxillosus*) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). São Paulo: **Ministério da Agricultura**, 1955. p. 1-50.

MORAN, T. H. Gut peptides in the control of food intake: 30 years of ideas. **Physiology & Behavior**, New York, v. 82, n. 1, p. 175-180, Aug. 2004.

MORAN, T. H.; KINZIG, K. P. Gastrointestinal satiety signals II: Cholecystokinin. **American Journal Physiology: Gastrointestinal Liver Physiology**, Bethesda, v. 286, n. 2, p. 183-188, Feb. 2004.

MORLEY, J. E.; FARR, S. A.; FLOOD, J. F. Peripherally administered calcitonin gene-related peptide decreases food intake in mice. **Peptides**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 511-516, 1996.

MURASHITA, K. et al. Changes in cholecystokinin and peptide Y gene expression with feeding in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): relation to pancreatic exocrine regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, London, v. 146, n. 3, p. 318-325, Mar. 2007.

MURASHITA, K. et al. 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**, New York, v. 162, n. 2, p. 160-171, June 2009.

MUTT, V.; JORPES, J. E. Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 156-162, Oct. 1968.

NARNAWARE, Y. K. et al. Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 279, n. 3, p. 1025-1034, Sept. 2000.

NARNAWARE, Y. K.; PETER, R. E. Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y (NPY) mRNA levels in goldfish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B-Biochemistry and Molecular Biology**, Barking, v. 129, n. 2-3, p. 633-637, June 2001.

NARNAWARE, Y. K.; PETER, R. E. Influence of diet composition on food intake and neuropeptide Y (NPY) gene expression in goldfish brain. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 103, n. 2-3, p. 75-83, Feb. 2002.

NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH, BETHESDA. **Wayne Rasband of Research Services Branch**. Maryland. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>>. Acesso em: 20 jul. 2012.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed. New York: J. Wiley, 2006. p. 601.

NIKOLSKY, G. V. **The ecology of fishes. XV**. London/New York: Academic Pressure, 1963. p. 352.

OGOSHI, M. et al. Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. **Peptides**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 3154-3164, Dec. 2006.

OGOSHI, M.; INOUE, K.; TAKEI, Y. Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 311, n. 9, p. 1072-1077, Nov. 2003.

OLIVER, A. S.; VIGNA, S. R. CCK-X receptors in the endothermic mako shark (*Isurus oxyrinchus*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 102, n. 1, p. 61-73, Apr. 1996.

OLSSON, C. et al. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 202, n. 2, p. 161-170, Jan. 1999.

OLSSON, C.; HOLMBERG, A.; HOLMGREN, S. Development of enteric and vagal innervation of the zebrafish (*Danio rerio*) gut. **Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 508, n. 5, p. 756-766, June 2008.

OLSSON, C.; HOLMGREN, S. The control of gut motility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 128, n. 3, p. 481-503, Mar. 2001.

PAN, Q. S. et al. Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropan creatic system of stomach-containing teleosts. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 6, n. 6, p. 842-847, July 2000.

PAN, Q. S.; FANG, Z. P.; ZHAO, Y. X. Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 6, n. 1, p. 96-101, Feb. 2000.

PEARSE, A. G. Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial cells and calcitonin. **Proceedings of Royal Society of London B: biological sciences**, London, v. 70, p. 71-80, 1968.

PEARSE, A. G. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathology implications of the concept. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v. 17, p. 303-313, 1969.

PEDDU, S. C. et al. Pre and postprandial effects on ghrelin signaling in the brain and on the GH/IGF-I axis in the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 161, n. 3, p. 412-418, May 2009.

PEDRAZZINI, T. Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts. **Neuropeptides**, Edinburgh, v. 38, n. 4, p. 267-275, Aug. 2004.

PETERS, J. H. et al. Cooperative activation of cultured vagal afferent neurons by leptin and cholecystokinin. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 145, n. 8, p. 3652-3657, Aug. 2004.

PETERSON, B. C. et al. Pre- and postprandial changes in orexigenic and anorexigenic factors in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 176, n. 2, p. 231-239, Apr. 2012.

PEYON, P. et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokinin in goldfish. **Peptides**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 199-210, 1998.

PEYON, P. et al. Postprandial, seasonal and sexual variations in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p.190-196, Dec. 1999.

PFEFFER, S. R.; ROTHMAN, J. E. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and golgi. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 56, p. 829-852, 1987.

PICCINETTI, C. C. et al. Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 166, n. 2, p. 259-267, Apr. 2010.

PISEGNA, J. R. et al. Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor: structure, functional expression and chromosomal localization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 296-303, Nov. 1992.

PONTET, A. et al. Distribution and characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the goldfish. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 255, n. 3, p. 529-538, Mar. 1989.

POYNER, D. R. et al. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 54, n. 2, p. 233-46, June 2002.

RAWDON, B. B.; ANDREW, A. Origin and differentiation of gut endocrine cells. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 8, n. 3, p. 567-580, July 1993.

RAYBOULD, H. E. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. **Current Opinion in Pharmacology**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 570-574, Dec. 2007.

REIDELBERGER, R. D. Cholecystokinin and control of food intake. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n. 8, p. 1327-1333, Aug. 1994.

REIDELBERGER, R. D.; KELSEY, L.; HEIMANN, D. Effects of amylin related peptides on food intake, meal patterns and gastric emptying in rats. **American Journal of Physiology: regulatory, integral and comparative physiology**, Bethesda, v. 282, n. 5, p. 1395-404, May 2002.

REHFELD, J. F. et al. The biology of cholecystokinin and gastrin peptides. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 12, p. 1154-1165, 2007.

REHFELD, J. F. The new biology of gastrointestinal hormones. **Physiology**, Bethesda, v. 78, n. 4, p. 1087-108, Oct. 1998.

RIBEIRO, D. F. O.; NUÑER, A. P. O. Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 274, p. 65-71, Nov. 2008.

RINDI, G. et al. The “normal” endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MOLECULAR AND CELL BIOLOGICAL ASPECTS OF GASTROENTEROPANCREATIC NEUROENDOCRINE TUMOR DISEASE LOCATION, 2., 2004, Berlin. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, v. 1014, p. 1-12, 2004.

ROCH, G. J.; WU, S.; SHERWOOD, N. M. Hormones and receptors in fish: do duplicates matter? **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 161, n. 1, p. 3-12, Mar. 2009.

RODRIGUES, S.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 1, p. 41-50, 2006.

RODRIGUES, S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 65-75, Jun. 2008.

RODRIGUEZ-OLARTE, D.; TAPHORN, D. C. Abundance, feeding and reproduction of *Salminus* sp. (Pisces: Characidae) from mountains streams of the Andean piedmont in Venezuela. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 4, n. 1, p. 73-79, Jan. 2006.

RØNNESTAD, I. et al. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 227, n. 1-4, p. 147-164, Nov. 2003.

RØNNESTAD, I. et al. Digestive physiology of marine fish larvae: hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 268, n. 1-4, p. 82-97, Aug. 2007.

RØNNESTAD, I.; ROJAS GARCIA, C. R.; SKADAL, J. Retrograde peristalsis; a possible mechanism for filling the pyloric caeca? **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 216-218, Jan. 2000.

ROSENFELD, M. G. et al. Production of a novel neuropeptide encoded by calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. **Nature**, London, v. 304, n. 5922, p. 129-135, 1983.

SAJDYK, T. J.; SHEKHAR, A.; GEHLERT, D. R. Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. **Neuropeptides**, Edinburgh, v. 38, n. 4, p. 225-234, Aug. 2004.

SALANECK, E. et al. Birth and death of neuropeptide Y receptor genes in relation to the teleost fish tetraploidization. **Gene**, Amsterdam, v. 409, n. 1-2, p. 61-71, Feb. 2008.

SANZ, F.; CERDÁ-REVERTER, J. M. **La nutrición y alimentación en peces: control neural de la ingesta en peces**. Madrid: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. Cap. 11.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Versão 9.1. Cary, 2000. Software.

SAWADA, H. et al. Central effects of calcitonin receptor stimulating peptide-1 on energy homeostasis in rats. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 147, n. 4, p. 2043-2050, Apr. 2006.

SCHUTZ, J. H.; A. P. O. NUÑER. Growth and survival of dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 435-444, 2007.

SCHWARTZ, G. J.; MCHUGH, P. R.; MORAN, T. H. Gastric loads and cholecystokinin synergistically stimulate rat gastric vagal afferents. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 265, n. 4, p. 872-876, Oct. 1993.

SCHWARTZ, G. J.; MCHUGH, P. R.; MORAN, T. H. Integration of vagal afferent responses to gastric loads and cholecystokinin in rats. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 261, n. 1, p. 64-69, July 1991.

SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J. The new biology of body weight regulation. **Journal of American Dietetic Association**, Chicago, v. 97, n. 1, p. 54-58, Jan. 1997.

SEIXAS-FILHO, J. T. et al. Determinação do sistema endócrino difuso no intestino de três teleostei (pisces) de água doce com hábitos alimentares diferentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1403-1408, Sept. 2001.

SHAHBAZI, F. et al. Primary structure, distribution, and effects on motility of CGRP in the intestine of the cod *Gadus morhua*. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 275, n. 1, p. 19-28, July 1998.

SHAHBAZI, F.; HOLMGREN, S.; JENSEN, J. Cod CGRP and tachykinins in coeliac artery innervation of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: presence and vasoactivity. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 369-376, Aug. 2009.

SILVER, A. J.; MORLEY, J. E. Role of CCK in regulation of food intake. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 36, n. 1, p. 23-34, 1991.

SILVERSTEIN, J. T. et al. Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 110, n. 2, p. 157-165, May 1998.

SILVERSTEIN, J. T. et al. Neuropeptide regulation of feeding in catfish, *Ictalurus punctatus*: a role for glucagon-like peptide-1 (GLP-1). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B- Biochemistry & Molecular Biology**, Amsterdam, v. 129, n. 2-3, p. 623-631, June 2001.

SILVERSTEIN, J. T. et al. Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1-4, p. 161-169, July 1999.

SKIPPER, M.; LEWIS, J. Getting to the guts of enteroendocrine in differentiation. **Nature Genetics**, New York, v. 24, n. 1, p. 3-4, Jan. 2000.

SOLCIA, E. et al. Endocrine cells of the gastric mucosa. **International Review of Cytology**, New York, v. 42, p. 223-286, 1975.

STANLEY, B. G.; LEIBOWITZ, S. F. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 82, n. 11, p. 3940-3943, 1985.

STANLEY, B. G.; LEIBOWITZ, S. F. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. **Life Sciences**, Oxford, v. 35, n. 26, p. 2635-2642, 1984.

STRAUSBERG, R. L. et al. Authors Group: Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. **Proceedings of the National Academy Science of USA**, Washington, v. 99, n. 26, p. 16899-16903, Dec. 2002.

SUNDLER, O. F. GI tract, general anatomy (cells). In: MARTIN, L. (Ed.). **Encyclopedia of endocrine diseases**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 208-215.

SUNDSTRÖM, G. et al. Evolution of the neuropeptide Y family: new genes by chromosome duplications in early vertebrates and in teleost fishes. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 155, n. 3, p. 705-716, Feb. 2008.

SUNDSTRÖM, G.; DREBORG, S.; LARHAMMAR, D. Concomitant duplications of opioid peptide and receptor genes before the origin of jawed vertebrates. **Plos One** 5, San Francisco, n. 5, p. 1-11, May 2010. (Submission, 10512).

SUZUKI, N.; SUZUKI, T.; KUROKAWA, T. Cloning of a calcitonin gene-related peptide from genomic DNA and its mRNA expression in flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Peptides**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 1435-1438, Apr. 2001.

SUZUKI, N.; SUZUKI, T.; KUROKAWA, T. Cloning of a calcitonin gene-related peptide receptor and a novel calcitonin receptor-like receptor from the gill of flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Gene**, Amsterdam, v. 244, n. 9, p. 81-88, Sept. 2000.

TAM, C. W. L.; BRAIN, S. D. Calcitonin gene-related peptides. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **Handbook of biologically active peptides**. San Diego: Academic, 2006. p. 1181-1186.

TARAKÇI, B. G. Immunohistochemical identification of peptide hormones in the endocrine cells of the gastrointestinal tract of the *Oreochromis niloticus*. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Science**, Ankara, v. 29, n. 2, p. 207-210, 2005.

TATEMOTO, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 79, n. 18, p. 5485-5489, 1982.

THOMPSON, M.; FLEMING, K. A.; EVANS, D. J. Gastric endocrine cells share a clonal origin with other gut cell lineages. **Development**, Cambridge, v. 110, n. 2, p. 477-481, Oct. 1990.

TONI, R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. **Journal of Endocrinological Investigation**, Milano, v. 27, p. 35-47, 2004.

TSUNODA, Y.; MODLIN. Signal transduction machinery of the parietal cell secretory system. **Biomedical Research**, Tokyo, v. 17, n. 6, p. 403-428, Dec. 1996.

VALLARINO, M. et al. Neuropeptide tyrosine in the brain of the african lungfish, *Protopterus annectens*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. **Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 356, n. 4, p. 537-551, June 1995.

VEIVERBERG, C. A. et al. Rendimento de cortes de jundiá, dourado e tilápia separados por sexo. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura II**. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2008. v. 30, p. 343-355.

VIGLIANO, F. A. et al. Immunohistochemical study on the gut neuroendocrine system of juvenile pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 78, p. 901-911, Jan. 2011.

VIGNA, S. R. Evolution of the cholecystokinin and gastrin peptides and receptors. **American Zoologist**, Utica, v. 40, n. 2, p. 287-295, Apr. 2000.

VOLFF, J. N. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. **Heredity**, London, v. 94, p. 280-294, Dec. 2004.

VOLKOFF, H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A- Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 144, p. 325-331, Dec. 2006.

VOLKOFF, H. et al. Neuropeptides and the control of food intake in fish. **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 142, n. 1-2, p. 3-19, May 2005.

VOLKOFF, H.; EYKELBOSH, A. J.; PETER, R. E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: Interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. **Brain Research**, Amsterdam, v. 972, n. 1-2, p. 90-109, May 2003.

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

VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 101, n. 1-3, p. 59-72, Sept. 2001.

WALTHER, C. et al. Neuropeptide Y receptors: ligand binding and trafficking suggest novel approaches in drug development. **Journal of Peptide Science**, New York, v. 17, n. 4, p. 233-246, Apr. 2011.

WEBB JR., K. A. et al. Cholecystokinin: Molecular cloning and immunohistochemical localization in the gastrointestinal tract of larval red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). **General and Comparative Endocrinology**, New York, v. 166, n. 1, p. 152-159, May 2010.

WHITED, K. L.; TSO, P.; RAYBOULD, H. E. Involvement of apolipoprotein A-IV and cholecystokinin1 receptors in exogenous peptide YY3 36-induced stimulation of intestinal feedback. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 148, p. 4695-4703, 2007.

WIBORG, O.; BERGLUND, L.; BOEL, E. Structure of a human gastrin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 81, n. 4, p. 1067-1069, 1984.

YOKOBORI, E. et al. Neuropeptide Y stimulates food intake in the Zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 766-773, May 2012.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater's functional histology**. 4th ed. London: Churchill Livingstone, 2000.

YUI, R.; NAGATA, Y.; FUJITA, T. Immunocytochemical studies on the islet and the gut of the arctic lamprey, *Lampetra japonica*. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 51, n. 1, p. 109-119, Mar. 1988.

ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n. 203, p. 69-77, 2000.

ZAVALA-CAMIN, L. A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá: EDUEM, 1996.

ZHONG, Z. et al. Chondrolectin mediates growth cone interactions of motor axons with an intermediate target. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 32, n. 13, p. 4426-4439, Mar. 2012.

APÊNDICE - Análise BLAST da homologia entre os peptídeos de mamíferos e peixes

A homologia entre a sequência aminoacídica do peptídeo e a sequência de aminoácidos do anticorpo foi testada usando o BLAST. A sequência de aminoácidos para cada anticorpo foi retirada de seu *datasheet* (Bachem, www.bachem.com) e comparada com as sequências disponíveis na base de dados do NCBI para espécies de peixes, já que, para o dourado *Salminus brasiliensis*, não há informações publicadas. Foi realizado alinhamento simultâneo das várias sequências encontradas para peixes em relação à sequência do anticorpo. Para cada anticorpo foi adicionada ao alinhamento a sequência aminoacídica da espécie para qual o anticorpo foi desenvolvido, sendo, para GAS: *Homo sapiens*, para CCK-8: sintético, para NPY: *Sus scrofa* e para CGRP: *Mus musculus*. As sequências usadas na análise BLAST estão descritas na Tabela 1.

A escolha desses anticorpos para a avaliação do grau de similaridade foi fundamentada no fato de que, mesmo tendo sido desenvolvidos em mamíferos, esses anticorpos apresentaram sucesso na identificação por imunohistoquímica de peptídeos em células do SNED de jundiá *Rhamdia quelen* (HERNÁNDEZ et al., 2012), peixe-rei *Odontesthes bonariensis* (VIGLIANO et al., 2011) e robalo *Psetta maxima* (BERMÚDEZ et al., 2007), fornecendo indícios da conservação dessas substâncias entre espécies.

Objetivou-se analisar, utilizando a ferramenta BLAST, a similaridade entre as sequências aminoacídicas empregadas para o desenvolvimento de anticorpos em diferentes espécies de mamíferos e as sequências disponíveis em peixes, tendo como foco principal a potencial imunorreação cruzada desses anticorpos para o dourado *Salminus brasiliensis*. Foram utilizadas, neste estudo, as sequências empregadas para desenvolver anticorpos policlonais anti-gastrina

(GAS), -colecistoquinina-8 (CCK-8), -neuropeptídio Y (NPY) e -peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O estudo foi feito no intuito de melhorar a confiança na escolha do anticorpo a ser empregado em ensaios imunohistoquímicos.

As seqüências de resíduos de aminoácidos para de cada imunógeno usadas no desenvolvimento de cada anticorpo, conforme datasheet, que foram empregadas na análise BLAST neste estudo estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos resíduos de aminoácidos utilizados na fabricação dos anticorpos, conforme *datasheet*, empregados na análise BLAST

Anticorpo desenvolvido contra	Sequência do imunógeno empregado na produção de cada anticorpo
GAS	Pyr-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ *
CCK-8	H-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂ *
NPY	H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Leu-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH ₂ *
CGRP	H-Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asp-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Glu-Ala-Phe-NH ₂ *

*Dados disponibilizados em www.bachem.com; código do anticorpo GAS T-4347; CCK-8 T-4254; NPY T-4454 e CGRP T-4032

Na Tabela 2 apresentam-se as espécies de peixe das quais se utilizaram as seqüências para cada peptídeo, e respectivos autores, para a análise BLAST de homologia.

Tabela 2. Peptídeos, espécie de peixe e respectivos autores das sequências utilizadas na análise BLAST

Peptídeo	Espécie de peixe usada na análise BLAST	Autor
GAS	<i>Diplodus sargus</i>	CAMPO et al., 2011
	<i>Squalus acanthias</i>	JOHNSEN et al., 1997
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	KUROKAWA et al., 2003
	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	KUROKAWA et al., 2003
CCK	<i>Carassius auratus</i>	PEYON et al., 1998
	<i>Danio rerio</i>	Sequencia predita no NCBI
	<i>Salmo salar</i>	LEONG, et al., 2010
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	JENSEN et al., 2001
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Sequencia predita no NCBI
NPY	<i>Carassius auratus</i>	BLOMQVIST et al., 1992
	<i>Cyprinus carpio</i>	YINGWEN e TAKESHI 2000 não publicado
	<i>Danio rerio</i>	STRAUSBERG et al., 2002
	<i>Ictalurus punctatus</i>	LEONARD et al., 2001
	<i>Salmo salar</i>	LOPEZ et al., 2009 não publicado
	<i>Sparus aurata</i>	PICCINETTI et al., 2010
	<i>Oreochromis niloticus</i>	CARPIO et al., 2006
CGRP	<i>Carassius auratus</i>	MARTÍNEZ-ÁLVAREZ e VOLKOFF 2007 não publicado
	<i>Danio rerio</i>	ZHONG et al., 2012
	<i>Salmo salar</i>	LEONG et al., 2010
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	JANSZ e ZANDBERG 1992
	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	JANSZ et al., 1996

*Dados disponibilizados em www.ncbi.nlm.nih.gov

Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 apresentam-se os resultados obtidos na análise BLAST de homologia entre a sequência utilizada para o desenvolvimento dos anticorpos e diferentes sequências aminoacídicas disponíveis na base de proteínas do NCBI para cada peptídeo, em várias espécies de peixes.

Tabela 3. Resultado da análise BLAST de similaridade entre a sequência utilizada para desenvolver o anticorpo anti-GAS e sequência de aminoácidos da GAS em algumas espécies de peixes

Espécie	Sequência para anticorpo anti-GAS			
	Escore	Valor E	Identicidades (%)	Positivos (%)
<i>Homo sapiens</i>	82,5	$5e^{-17}$	100	100
<i>Diplodus sargus</i>	18	0.002	80	80
<i>Paralichthys olivaceus</i>	16,9	0.030	80	100
<i>Squalus acanthias</i>	23,1	$4e^{-05}$	100	100
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	18	0.002	80	80

Tabela 4. Resultado da análise BLAST de similaridade entre a sequência utilizada para desenvolver o anticorpo anti-CCK-8 e sequência de aminoácidos da CCK, em algumas espécies de peixes

Espécie	Sequência para anticorpo anti-CCK-8			
	Escore	Valor E	Identicidades (%)	Positivos (%)
<i>Carassius auratus</i>	31,2	$4e^{-08}$	88	100
<i>Danio rerio</i>	30,3	$7e^{-08}$	88	88
<i>Salmo salar</i>	26,9	$1e^{-06}$	88	88
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	31,2	$4e^{-08}$	88	100
<i>Oreochromis niloticus</i>	31,2	$4e^{-08}$	88	100

Tabela 5. Resultado da análise BLAST de similaridade entre a sequência utilizada para desenvolver o anticorpo anti-NPY e sequência de aminoácidos do NPY, em algumas espécies de peixes

Espécie	Sequência para anticorpo anti-NPY			
	Escore	Valor E	Identidades (%)	Positivos (%)
<i>Sus scrofa</i>	72,8	1e ⁻²⁴	97	97
<i>Carassius auratus</i>	70,1	1e ⁻²²	86	94
<i>Cyprinus carpio</i>	72,0	3e ⁻²³	89	97
<i>Danio rerio</i>	72,4	2e ⁻²³	89	97
<i>Ictalurus punctatus</i>	68,9	4e ⁻²	83	94
<i>Salmo salar</i>	69,3	3e ⁻²²	86	94
<i>Sparus aurata</i>	18,5	3e ⁻⁰⁴	88	100
<i>Oreochromis niloticus</i>	70,1	2e ⁻²²	86	94

Tabela 6. Resultado da análise BLAST de similaridade entre a sequência utilizada para desenvolver o anticorpo anti-CGRP e sequência de aminoácidos da CGRP, em algumas espécies de peixes

Espécie	Sequência para anticorpo anti-CGRP			
	Escore	Valor E	Identidades (%)	Positivos (%)
<i>Mus musculus</i>	76,6	1e ⁻²⁴	92	97
<i>Carassius auratus</i>	61,6	1e ⁻¹⁹	76	84
<i>Danio rerio</i>	62,4	3e ⁻¹⁹	76	84
<i>Salmo salar</i>	63,5	1e ⁻¹⁹	78	86
<i>Oncorhynchus sp.</i>	59,7	4e ⁻¹⁹	73	86
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	61,2	9e ⁻²⁰	76	86