

Artigo Número 87

ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS PARA ESTUDOS EM NUTRIÇÃO ANIMAL

Paula Adriane Perez Ribeiro¹, Pedro Almada Pagán², Priscila Vieira Rosa Logato³, Luis David Solis Murgas⁴

Resumo: A biologia celular e molecular estuda estruturas e eventos muito minuciosos, e por isso, depende do aperfeiçoamento dos instrumentos e técnicas de pesquisa. O aprimoramento de métodos para a separação de organelas celulares, bem como para estudos *in vitro* de suas moléculas e funções traz benefícios às pesquisas relacionadas à fisiologia e ao metabolismo, conhecimentos estes, essenciais ao progresso da nutrição animal. As células retiradas de animais podem ser mantidas viáveis para estudo por algum tempo. Para isto, devem ser conservadas em meio isotônico, evitando, assim, alteração no seu volume. Quando se deseja estudar células vivas por um tempo mais prolongado, a utilização de métodos de cultivo pode ser uma alternativa interessante. O isolamento de hepatócitos em peixes é uma técnica largamente utilizada em ensaios de metabolismo, como uma maneira de se avaliar a ação de complexos enzimáticos, cuja determinação de sua atividade depende, por exemplo, de marcação com compostos radioativos. Assim, é comum o isolamento e a marcação de hepatócitos de peixes com radiosótopos, para avaliação da atividade de enzimas da biossíntese de ácidos graxos, como por exemplo, as dessaturases e elongases, que requerem técnicas de cultivo celular para posterior incubação com ¹⁴C.

Palavras-chave: biologia celular, biotecnologia, enzimas, metabolismo, peixe

ISOLATION AND CULTIVATION OF CELLS FOR STUDIES IN ANIMAL NUTRITION

Summary: The cellular and molecular biology studies structures and events very thorough, and therefore, depends on the improvement of tools and techniques of research. The improvement of methods for the separation of cellular organelles, as well as for *in vitro* studies of molecules and their functions are benefits to research related to the physiology and metabolism, these skills are essential to progress in animal nutrition. Cells taken from animals can be kept viable for study for some time. To this must be preserved amid isotonic, thus avoiding change in its volume. When you want to study living cells for a longer time, the use of methods of cultivation can be an interesting alternative. The isolation of hepatocytes in fish is a technique widely used in tests of metabolism, as a way to evaluate the action of enzyme complexes, whose determination of its activity depends, for example, marking with radioactive compounds. Thus, it is common the isolation of hepatocytes and marking of fish with radioisotopes for assessing the activity of enzymes of the biosynthesis of fatty acids, such as desaturase and elongases, which require cell culture techniques for further incubation with ¹⁴C.

Keywords: cell biology, biotechnology, enzymes, metabolism, fish

¹ Doutora em Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, MG, paulaperezribeiro@hotmail.com

² Doutorando da Faculdade de Biologia da Universidade de Murcia, Espanha

³ Doutora em Zootecnia, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, MG, priscila@ufla.br

⁴ Doutor em Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, MG, ismurgas@ufla.br

INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem sido um tema em evidência atualmente. Entretanto, a implantação biotecnológica muitas vezes passa despercebida aos nossos olhos, uma vez que normalmente não damos a devida importância às tecnologias que envolvem os processos de desenvolvimento. Esta percepção torna-se evidente à medida que a necessidade de consumo demanda providências ao mercado.

A biotecnologia abrange o conjunto de conhecimentos e inovações tecnológicas que possibilita a utilização de organismos, células e ou moléculas, na aquisição ou melhoria de bens e serviços. Seu impacto atinge vários setores produtivos, incluindo a agropecuária. Hoje contamos com plantas resistentes a doenças, processos industriais e agrícolas menos poluentes, testes diagnósticos, novos medicamentos, bem como tecnologias que melhoram o sistema de produção animal.

Dentre as técnicas englobadas pelo conceito de biotecnologia, o isolamento e cultivo de células têm ganhado destaque perante as pesquisas na área de nutrição animal.

A célula é a unidade básica dos seres vivos, podendo ocorrer isoladamente, como nos organismos unicelulares, ou constituindo arranjos ordenados, como o que ocorre em seres pluricelulares, pela formação de tecidos especializados. Em geral, os tecidos apresentam quantidades variáveis de material extracelular, produzido por suas próprias células.

O estudo da célula teve início com a descoberta do microscópio óptico, que já em 1896 era considerado altamente eficiente, em função das primeiras objetivas de grande resolução. O advento do microscópio eletrônico representou enorme impulso para o conhecimento das funções celulares. A partir daí, o emprego conjunto das técnicas modernas como culturas de células, radioautografia e técnicas bioquímicas avançadas vieram ampliar, de tal maneira, o estudo dos organismos vivos, que se tornou usual designar tal abordagem como um ramo da biotecnologia. Os conhecimentos sobre as células progredem à medida que as técnicas de investigação são aperfeiçoadas.

A biologia celular e molecular estuda estruturas e eventos muito minuciosos, e por isso, depende do aperfeiçoamento dos instrumentos e técnicas de pesquisa.

O aprimoramento de métodos para a separação de organelas celulares, bem como para estudos *in vitro* de suas moléculas e funções traz benefícios às pesquisas relacionadas à fisiologia e ao metabolismo, conhecimentos estes, essenciais ao progresso da nutrição animal.

CULTURA DE CÉLULAS ANIMAIS

As células retiradas de animais podem ser mantidas viáveis para estudo por algum tempo. Para isto, devem ser conservadas em meio isotônico, evitando, assim, alteração no seu volume. Quando se deseja estudar células vivas por um tempo mais prolongado, a utilização de métodos de cultivo pode ser uma alternativa interessante.

Dentre as culturas primárias de células animais, importantes no estudo detalhado de aspectos relacionados à nutrição, destacam-se os isolamentos de hepatócitos e enterócitos. Tais técnicas têm sido amplamente utilizadas em estudos de metabolismo, por permitir que se reproduzam, *in vitro*, condições bioquímicas similares às das células do tecido intacto. Este tipo de metodologia tem sido aprimorado em peixes, por exemplo,

como forma de se estudar processos metabólicos como capacidade absorptiva intestinal, lipogênese, glicogênese, respostas hormonais, toxicidade de compostos, entre outros.

As culturas celulares são feitas normalmente em frascos apropriados, com células isoladas dos tecidos, pela aplicação de técnicas que variam em função, principalmente, da espécie animal. O cultivo em frascos possibilita o emprego de meios de culturas quimicamente definidos, constituídos por aminoácidos, açúcares, sais minerais, vitaminas e/ou fatores de crescimento.

As células animais constituintes de culturas primárias, em geral, morrem após um determinado número de mitoses, aproximadamente entre 50 e 100 eventos mitóticos. Entretanto, algumas células podem, eventualmente, sofrer mutações, multiplicando-se indefinidamente, formando, assim, culturas secundárias. As culturas secundárias podem servir de base para estudos mais aprofundados, como desenvolvimentos de alguns tipos de câncer e células com potencial para técnicas de clonagem.

TECIDO HEPÁTICO

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e encontra-se na cavidade abdominal dos animais. Pelo sistema porta-hepático chega ao fígado todo o material absorvido no intestino, com exceção, apenas, de parte dos lipídios, constituídos por ácidos graxos de cadeia curta e média, os quais são transportados por via linfática (Junqueira & Carneiro, 2008). Assim, o fígado encontra-se em posição privilegiada para metabolizar e armazenar metabólitos, além de neutralizar e eliminar substâncias tóxicas ao organismo. A Figura 1 ilustra o aspecto externo do fígado e suas principais regiões.

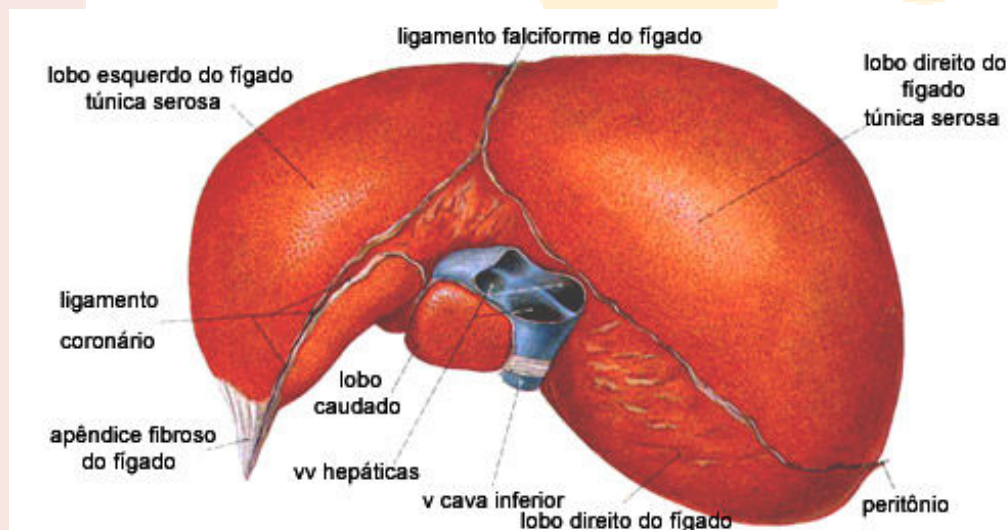


FIGURA 1 - Esquema ilustrativo da conformação externa do fígado (Junqueira & Carneiro, 2008).

Na Figura 2 é possível observar a disposição interna das principais estruturas hepáticas.

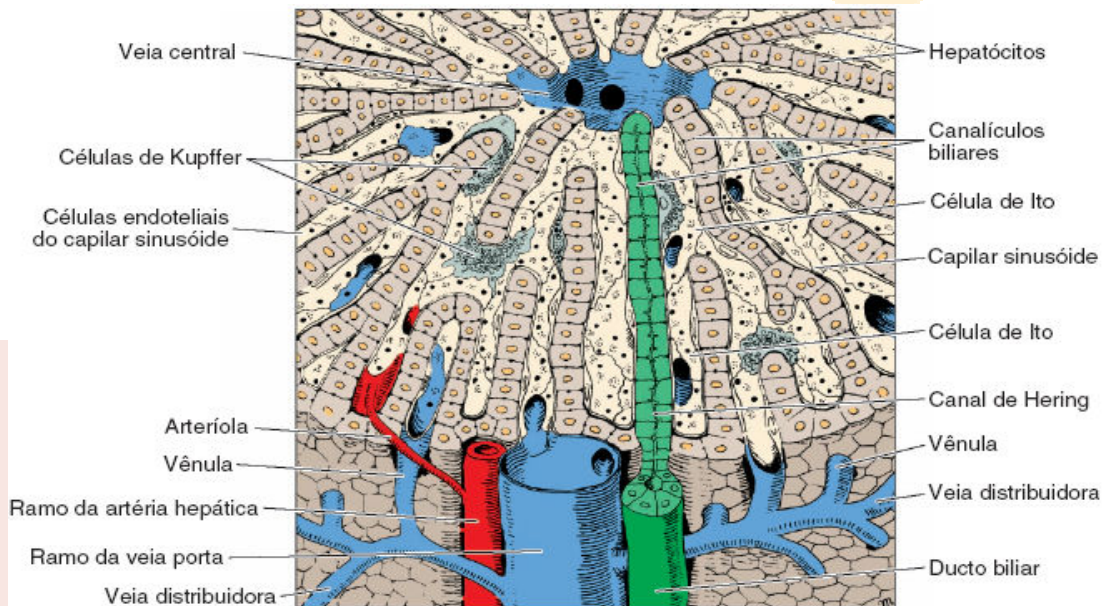


FIGURA 2 Esquema ilustrativo da constituição interna do fígado (Junqueira & Carneiro, 2008).

O hepatócito é, sem dúvida, a célula de maior versatilidade funcional do organismo. Apresenta funções celulares endócrinas e exócrinas. Esta multiplicidade funcional requer um equivalente morfológico, o que explica o aspecto variado, observado nas células hepáticas (Figura 3).

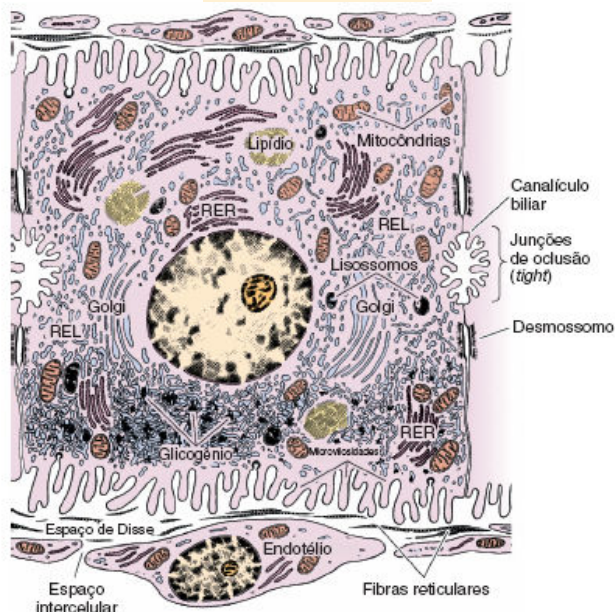


FIGURA 3 Ultra-estrutura de um hepatócito (RER, retículo endoplasmático rugoso; REL, retículo endoplasmático liso), evidenciando, também, as células dos capilares sinusóides (Junqueira & Carneiro, 2005).

Dentre as principais atividades dos hepatócitos podemos destacar:

- Síntese protéica: cerca de 95% das proteínas produzidas pelo fígado são sintetizadas nos hepatócitos, que realizam, ainda, renovação celular periódica; apresentam atividade endócrina, à medida que produzem e eliminam gradualmente no sangue, proteínas de exportação, como albumina, protrombina, fibrinogênio e lipoproteínas plasmáticas;

- Secreção da bile: a produção de bile é exócrina, uma vez que os hepatócitos transportam ativamente água e outros compostos na bile, do sangue para dentro do canal biliar. Cerca de 10% dos ácidos biliares, constituintes da bile, são produzidos pelos hepatócitos, graças à conjugação de ácido cólico com glicina e taurina;

- Acúmulo de metabólitos: os lipídios e alguns açúcares são armazenados nos hepatócitos, sob a forma preferencial de ésteres neutros e glicogênio, respectivamente. Esta capacidade de acúmulo de material energético tem função homeostática, uma vez que permite ao organismo a disponibilização destes metabólitos nos intervalos entre as ingestões de alimento;

- Função metabólica: dentre muitos exemplos de função metabólica dos hepatócitos destacam-se a conversão de lipídios e aminoácidos em glicose, no processo gliconeogênico, e as etapas iniciais dos processos lipogênicos, envolvendo complexos enzimáticos ativos e altamente específicos;

- Função de detoxificação e neutralização: várias drogas são neutralizadas nas células hepáticas, através de reações de oxidação, acetilação, metilação e conjugação. As enzimas envolvidas nestas etapas são normalmente isoladas do retículo endoplasmático liso, nos hepatócitos.

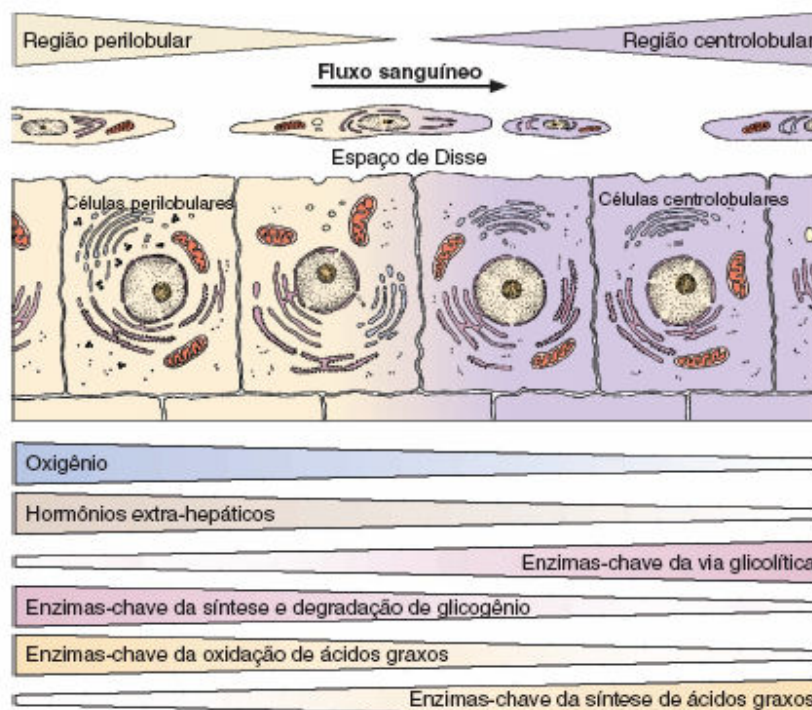


FIGURA 4 Diferenciação dos hepatócitos nas regiões do fígado: região perilobular e região centrolobular (Junqueira &, Carneiro, 2008).

As células da região perilobular são aquelas mais próximas do espaço porta e, conseqüentemente, as primeiras a alterar o conteúdo do sangue ou a serem afetadas por ele. As seguintes são as células da região intermediária, enquanto as células da região centrolobular recebem o sangue já alterado pelas células das regiões anteriores. Por exemplo, após uma refeição, células da periferia dos lóbulos são as primeiras a receber a glicose absorvida e armazená-la como glicogênio. A glicose não captada por estas células é provavelmente utilizada pelas células da próxima região. No jejum, as células periféricas (perilobulares) seriam as primeiras a responder à queda na glicemia, quebrando glicogênio e liberando glicose para a circulação sanguínea. Neste processo, células das regiões intermediárias e centrolobular não respondem à condição de jejum, até que o estoque de glicogênio nas células perilobulares seja esgotado. Este arranjo em zonas é responsável por algumas das diferenças na susceptibilidade dos hepatócitos a diversos agentes nocivos ou em condições patológicas.

ISOLAMENTO E CULTURA DE HEPATÓCITOS EM PEIXES

O isolamento de hepatócitos em peixes é uma técnica largamente utilizada em ensaios de metabolismo, como uma maneira de se avaliar a ação de complexos enzimáticos, cuja determinação de sua atividade depende, por exemplo, de marcação com compostos radioativos.

As culturas celulares, realizadas em frascos apropriados, possibilitam a incubação com os radioisótopos de interesse, que, uma vez incorporados à célula, permitem ao pesquisador avaliar o comportamento da mesma, *in vitro*.

Assim, é comum o isolamento e a marcação de hepatócitos com radioisótopos, para avaliação da atividade de enzimas da biossíntese de ácidos graxos, como por exemplo, as dessaturases e elongases, acetil-CoA carboxilase, bem como para identificação do mecanismo de ação de alguns hormônios específicos.

A extração do tecido hepático dos animais é feita mediante insensibilização em gelo. O fígado extraído é, então, imerso em uma solução salina, numa placa de Petri e perfundido, por meio de seringa heparinizada, para a adição desta mesma solução. Este procedimento tem por finalidade retirar o sangue do tecido hepático. Após esta lavagem, o fígado é transferido para erlenmeyer e triturado em solução preparada com colagenase e meio salino balanceado, acrescido de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (Hanks balanced salt solution/fatty acid free bovine serum albumin ou HBSS/FFA-BSA). Em seguida as amostras são mantidas em banho, a 25°C, por 40 minutos, para que a colagenase possa favorecer o rompimento do tecido hepático, separando os hepatócitos.

A amostra após filtração minuciosa, é submetida a uma seqüência de três centrifugações (2000 rpm, a 4°C, por 15 minutos; 2000 rpm, a 4°C, por 10 minutos e 2000 rpm, a 4°C, por 5 minutos, respectivamente), até que sejam obtidos os hepatócitos puros. Após o isolamento e purificação, os hepatócitos, são re-suspendidos em meio de cultura celular (M199).

Uma alíquota pequena destes hepatócitos, já isolados, é separada e corada com Trypan Blue, para a observação e contagem em câmara de Neubauer. O número mínimo de células viáveis para marcação com isótopo radioativo foi de 6×10^8 células/frasco de cultivo.

Marcação de hepatócitos com radioisótopos para avaliação de atividade enzimática

Como dito anteriormente, o uso de radioisótopos em ensaios metabólicos tem sido de grande utilidade nas pesquisas da área de nutrição animal, sobretudo em ensaios enzimáticos.

O estudo de dessaturases e elongases hepáticas, por exemplo, requer técnicas de cultivo celular para posterior incubação com o radioisótopo ^{14}C .

Em peixes, por exemplo, os isolados de células hepáticas podem ser incubados com um ácido graxo precursor, de interesse no estudo, para a determinação da capacidade de alongamento e dessaturação das enzimas presentes neste tecido dos animais. Esta técnica pode ser feita, por exemplo, utilizando-se ácido linolênico sintético, marcado com ^{14}C , [$1\text{-}^{14}\text{C}$]18:3n-3 ($50\text{-}55\mu\text{Ci mmol}^{-1}$), para verificação, *in vitro*, da atividade de Δ^6 e Δ^5 dessaturases. Este ácido graxo é, normalmente, conjugado com albumina sérica bovina, para então ser incubado com os hepatócitos, conforme descrito por Ghioni et al. (1997).

Para a incubação de uma média de 6×10^8 hepatócitos/frasco de cultivo é necessária uma atividade do radioisótopo de $3,5\mu\text{Ci}$. Esta atividade é confirmada por leitura das amostras em contador de partículas β .

Aos frascos de cultivo celular, são misturados, então, a solução de hepatócitos isolados e a solução do ácido graxo marcado com isótopo radioativo. As amostras são mantidas em banho a 25°C , com agitação, por 2 horas, para que as células possam metabolizar e incorporar o material radioativo. Após este período de incubação, será possível, então, a determinação da atividade das dessaturases.

Os lipídios totais, extraídos das amostras e transmetilados são aplicados em placas de cromatografia de camada delgada, impregnadas com solução contendo nitrato de prata (AgNO_3), em acetonitrila e pré-ativadas a 110°C por 30 minutos, conforme a metodologia descrita por Wilson & Sargent, 1992). As placas são, então, reveladas em tolueno/acetonitrila, na proporção de 95:5. Estas placas sofrem marcação com tinta radioativa para que a autorradiografia do material possa ser feita, utilizando-se filme apropriado, com leitura em BioRad. Assim, as áreas de sílica contendo ácidos graxos poliinsaturados são separadas e levadas para a quantificação da radioatividade, por meio de leitura em contador de partículas β .

Determinação da taxa de oxidação metabólica em hepatócitos

Quando estudamos os processos envolvidos no metabolismo lipídico nos animais, devemos levar em consideração possíveis perdas por β -oxidação.

A β -oxidação é um conjunto de reações bioquímicas que permitem a quebra dos ácidos graxos para disponibilização de energia ao organismo. Portanto, em ensaios metabólicos *in vitro*, que utilizam compostos radioativos como marcadores, devem ser amparados por métodos que avaliem as perdas de radioatividade nos hepatócitos nos processos metabólicos de β -oxidação. A análise da oxidação dos ácidos graxos nos hepatócitos pode ser feita de acordo com a metodologia proposta por Frøyland et al. (2000) e Torstensen et al. (2000). Tais técnicas preconizam a retirada de uma pequena alíquota das amostras de hepatócitos, após o período de incubação com os ácidos graxos marcados, a qual é adicionada albumina sérica bovina e ácido perclórico (HClO_4). Esta

solução é então levada para quantificação da radioatividade, por leitura em contador de partículas β , determinando-se, assim, possíveis perdas.

APLICABILIDADE DA TÉCNICA NO ESTUDO DO METABOLISMO LIPÍDICO EM PEIXES

Como dito anteriormente, o isolamento e a marcação de hepatócitos com radiosótopos tem sido uma técnica muito utilizada na avaliação da atividade de enzimas da biossíntese de ácidos graxos em peixes, como por exemplo, as dessaturases e alongases.

A biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados no tecido hepático dos peixes, assim como de animais mamíferos, é um processo microsomal que envolve reações de alongação e dessaturação da cadeia carbônica. O ácido α -linolênico (C18:3 n-3) é convertido em EPA (C20:5 n-3) e, na seqüência, em DHA (C22:6 n-3), numa ação combinada de alongases e dessaturases, mais especificamente da Δ^6 e Δ^5 dessaturases.

Estudos *in vivo* mostram que quando trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) são submetidas a injeções de ácido linolênico marcado radioativamente, esta radioatividade é recuperada em ampla faixa de PUFAs, incluindo o EPA e o DHA. Este fato comprova a existência de processos de bioconversão eficientes nesta espécie. Hepatócitos isolados de truta arco-íris podem incorporar eficientemente radioisótopos do ácido α -linolênico e rapidamente alongá-lo e dessaturá-lo. Sabe-se, no entanto, que a atividade destas enzimas é afetada, principalmente, pela dieta e por fatores hormonais, freqüentemente modulados pela temperatura (Tocher et al., 2004).

O efeito da temperatura na biossíntese de ácidos graxos em peixes tem sido avaliado em muitos estudos. Williams & Hazel (1995) trabalhando com trutas arco-íris expostas à baixa temperatura observaram que os isolados de células hepáticas são caracterizados por aumento nos níveis de PUFAs ômega-3 e redução nos níveis de ácidos graxos saturados. Hazel (1979), citado por Buzzi (1996), constatou que essa alteração, promovida pela diminuição da temperatura, é consequência de um aumento considerável na proporção de fosfatidiletanolamina.

As dessaturases são enzimas específicas para posição e número de insaturações na cadeia do ácido graxo. A reação de dessaturação catalisada por dessaturases de ácidos graxos é um processo aeróbico que utiliza oxigênio molecular e elétrons, obtidos da cadeia de transporte de elétrons (Nakamura & Nara, 2004).

Os ácidos graxos essenciais, em animais, podem ser dessaturados e alongados, dependendo da espécie, pela atividade das enzimas Δ^6 e Δ^5 dessaturases e das alongases.

A Δ^6 dessaturase é uma enzima de membrana, encontrada no retículo endoplasmático. Catalisa as reações de inserção de insaturações nas séries ômega-6 e ômega-3, convertendo o ácido linoléico (C18:2 n-6) em ácido γ -linolênico (C18:3 n-6) e o ácido α -linolênico (C18:3 n-3) em estearidônico ou octadecatetraenóico (C18:4 n-3), respectivamente (Sayanova et al., 1999).

A Δ^6 dessaturase é requerida também para a síntese do ácido docosahexaenóico ou DHA (C22:6 n-3), a partir do docosapentaenóico (C22:5 n-3). Anteriormente atribuía-se a produção de DHA à ação de uma enzima classificada como Δ^4 dessaturase. Na verdade, esta enzima é encontrada somente em plantas e organismos inferiores, tendo sido identificada primeiramente em *Thraustochytrium* sp., uma alga com alto teor de DHA (Pereira et al., 2003).

Estudos demonstram que os genes responsáveis pela expressão da atividade da Δ^6 dessaturase são mais funcionais em hepatócitos e tecidos cerebral e cardíaco, embora estejam ativos também em outros tecidos. A atividade desta enzima "in vivo" é regulada por componentes presentes na dieta e pela ação de hormônios específicos (Antueno et al., 2001 e Bourre et al., 1990).

A Δ^5 dessaturase apresenta características estruturais semelhantes à Δ^6 dessaturase, catalisando, no entanto, o passo final na produção de PUFA's ômega-6 e ômega-3. É responsável pela conversão do ácido di-homo γ -linolênico (C20:3 n-6) em ácido araquidônico (C20:4 n-6) e do ácido eicosatetraenóico (C20:4 n-3) em ácido eicosapentaenóico ou EPA (C20:5 n-3). Apresenta maior atividade na glândula adrenal, fígado e cérebro, sendo regulada principalmente pelos componentes da dieta (Nakamura & Nara, 2004).

Alterações na atividade de dessaturases nos hepatócitos de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) podem ser evidenciadas quando estes animais são submetidos ao estresse térmico, por exemplo. Ribeiro (2007) observou que a maior atividade de dessaturases em hepatócitos isolados de trutas foi observada ao longo do período de adaptação dos animais à redução da temperatura, de 20°C para 15°C. Isto também pôde ser observado por Ninno et al. (1974), citados por Tocher et al. (2004), em estudos com *Pimelodus maculatus*, por Schuenke & Wodtke (1983), em trabalhos com carpa comum e por Hagar & Hazel (1985), em estudos com trutas. Estas pesquisas mostram maior atividade de Δ^6 dessaturase nos microsomas hepáticos de peixes em processo de aclimação a baixa temperatura.

De Torrenço & Brenner (1976), citados por Tocher et al. (2004) constataram que peixes expostos à redução de temperatura, de 28°C para 18°C, por exemplo, mostram uma diminuição na atividade hepática da Δ^6 dessaturase, no primeiro dia de aclimação, provavelmente devido ao período de adaptação do sistema enzimático, apresentando, entretanto, um aumento significativo ao longo de uma semana de aclimação, presumivelmente em função da indução de uma transcrição gênica.

A Figura 5 apresenta o comportamento das dessaturases durante o processo de aclimação térmica de trutas arco-íris, alimentadas com dietas contendo óleo de linhaça e óleo de peixe. Os resultados expressam a atuação das enzimas pela radioatividade recuperada em produtos da dessaturação e alongação do [$1\text{-}^{14}\text{C}$]18:3 n-3.

A atividade de dessaturases é influenciada não só pela temperatura, mas também por fatores nutricionais. No entanto, peixes alimentados com dietas contendo óleos vegetais, sobretudo aqueles ricos em ácidos graxos da série ômega-6, apresentam maiores alterações enzimáticas do que animais alimentados com fontes de PUFA's ômega-3. Isto é atribuído ao fato de que animais alimentados com fontes ricas em ômega-6 apresentam diminuição dos níveis de PUFA's ômega-3 nos lipídios celulares, que por consequência leva à redução da inibição enzimática pelo produto. Este evento pode, ainda, ser explicado pelo aumento de substrato disponível ao se alterar a proporção dietética de ômega-6 e ômega-3. Estudos realizados por diversos autores, envolvendo salmonídeos, como a truta arco-íris e o salmão do Atlântico, comprovam este fato (Zheng et al., 2004; Tocher, 2003; Bell et al., 2001; Rodríguez et al., 1997).

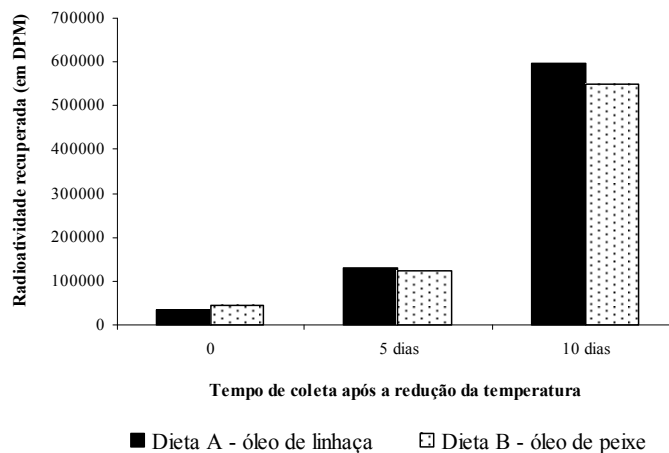


FIGURA 5 Atividade enzimática nos hepatócitos de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), em função da dieta e do tempo de coleta após a redução da temperatura de 20°C para 15°C. Resultados representados pelo total de radioatividade recuperada como produtos da dessaturação/elongação do [1-¹⁴C]18:3 n-3 (C18:4, C20:5, C22:5, C22:6) (Ribeiro, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUENO, R.J. de et al. Activity of human $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v.509, p.77-80, 2001.
- BELL, M.V.; DICK, J.R.; PORTER, A.E.A. Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6 n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Lipids**, v.36, p.1153-1159, 2001.
- BOURRE, J.M.; PICIOTTI, M.; DUMONT, O. Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging. **Lipids**, v.25, p.354-356, 1990.
- BUZZI, M. **The characterization of docosahexaenoic acid (22:6 n-3) biosynthesis in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. 1996. 182p. Thesis (Doctor of Philosophy)–University of Stirling, Scotland.

FRØYLAND, L.; LIE, Ø.; BERGE, R.K. Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture Nutrition**, v.6, p.85-89, 2000.

GHIONI, C.; TOCHER, D.R.; SARGENT, J.R. The effect of culture on morphology, lipid and fatty acid composition, and polyunsaturated fatty acid metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin cells. **Fish Physiol. Biochem.**, v.16, p.499-513, 1997.

HAGAR, A.F.; HAZEL, J.R. Changes in desaturase activity and the fatty acid composition of microsomal membranes from liver tissues of thermally acclimation rainbow trout. **J. Comp. Physiol**, v.156B, p.35-42, 1985.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 8ª edição. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 332p., 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11ª edição. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 388p., 2008.

NAKAMURA, M.T.; NARA, T. Structure, function and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$ and $\Delta 9$ desaturases. **AR Reviews in Advance**, v.24, p.345-376, 2004.

PEREIRA, S.L.; LEONARD, A.E.; MUKERJI, P. Recent advances in the study of fatty acids desaturases from animals and lower eukaryotes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essencial Fatty Acids**, v. 68, p.97-106, 2003.

RIBEIRO, P.A.P. **Efeito de fontes de ácidos graxos na dieta e da redução da temperatura sobre o metabolismo lipídico de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) e trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)**. 2007, 162p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RODRÍGUEZ, C. et al. Modification of odd-chain length unsaturated fatty acid by hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. **Lipids**, v.32, n.6, p.611-619, 1997.

SAYANOVA, O.; SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A. Histidine-41 of cytochrome b5 domain of the borage $\Delta 6$ desaturase is essential for enzyme activity. **Plant Physiol.**, v.121, p.641-646, 1999.

SCHUENKE, M.; WODTKE, E. Cold-induced of $\Delta 9$ and $\Delta 6$ desaturase activities in endoplasmic membranes of carp liver. **Biochem. Biophys. Acta**, v.734, p.70-75, 1983.

TOCHER, D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Rev. Fish Science**, v.11, p.107-184, 2003.

TOCHER, D.R. et al. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.137, p.49-63, 2004.

TORSTENSEN, B.E.; LI, Ø.; FRØYLAND, L. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – effects of capelin, palm and oleic-acid enriched sunflower oil as dietary lipid sources. **Lipids**, v.35, p.653-664, 2000.

WILLIAMS, E.E.; HAZEL, J.R. Restructuring of plasma membrane phospholipids in isolated hepatocytes of rainbow trout during brief *in vitro* cold exposure. **Journal Comp. Physiol.**, v.164, p.600-608, 1995.

WILSON, R.; SARGENT, J.R. High resolution separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography. **Journal Chromatography**, v.623, p.403-407, 1992.

ZHENG, X. et al. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.236, p.467-483, 2004.