

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Influência do metabolismo de aminoácidos
no sistema imunológico e defesa
antioxidante de tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**

Luana Camargo Sousa

Dracena, SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Influência do metabolismo de aminoácidos
no sistema imunológico e defesa
antioxidante de tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)**

Luana Camargo Sousa

Orientador: Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Dracena, SP.
2020

S725i Sousa, Luana Camargo
Influência do metabolismo de aminoácidos no sistema
imunológico e defesa antioxidante de tilápias do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) / Luana Camargo Sousa. -- Jaboticabal, 2020
96 p. : il.; tabs.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2020

Orientador: Dr. Leonardo Susumu Takahashi

Banca examinadora: Dr. Leonardo S. Takahashi; Dra. Amália Pérez-
Jímenez; Dr. Fabio E. Mingatto; Dr. Paulo R. M. Lopes; Dr. Leonardo
Zanetti.

Bibliografia

1. Nutrição. 2. Imunidade. 3. Sêmen. 4. Estresse Oxidativo. 5. Enzimas
Antioxidantes. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 636.3.043

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Influência do metabolismo de aminoácidos no sistema imunológico e defesa antioxidante de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

AUTORA: LUANA CAMARGO SOUSA

ORIENTADOR: LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Prof. Assoc. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Profa. Dra. AMÁLIA PÉREZ JIMÉNEZ

Depto de Zoologia / Universidad de Granada, Granada, Espanha

Prof. Dr. LEONARDO HENRIQUE ZANETTI

Depto de Ciências Agrárias / Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE

Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES

FCAT / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2020

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIACÕES	10
DEDICATÓRIA	1
AGRADECIMENTOS	2
APOIO FINANCEIRO	4
RESUMO GERAL.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO GERAL	7
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	9
1. Importância dos aminoácidos em dietas para peixes.....	9
2. Sistema imune e lipopolissacarídeo em peixes.....	16
3. Aminoácidos e imunidade em peixes.....	17
3. Sistema antioxidante em peixes	19
4. Aminoácidos e sistema antioxidantes em peixes.....	22
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO II: Deficiência de aminoácidos essenciais em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>): modulação do sistema imune e sistema antioxidante enzimático.....	32
RESUMO	32
ABSTRACT	33
INTRODUÇÃO	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. Instalações e manejo	36
2. Delineamento e dietas experimentais	36
3. Coleta de material biológico.....	40
4. Variáveis analisadas.....	40
4.1 Indicadores do sistema imune não específico	40
4.1.1 Atividade respiratória de leucócitos	40
4.1.2 Atividade de lisozima	41
4.1.3 Atividade hemolítica do complemento - via alternativa	41
4.2 Enzimas do sistema antioxidante	42
4.2.1 Processamento das amostras	42

4.2.2 Superóxido dismutase (SOD)	43
4.2.3 Catalase (CAT)	43
4.2.3 Glutathione peroxidase (GPx)	43
5. Análises estatísticas.....	44
RESULTADOS.....	44
1. Indicadores do sistema imune não específico	44
2. Enzimas antioxidantes.....	46
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO III: Efeito dos níveis dietéticos de histidina nas defesas inata antioxidante em juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) desafiados com lipopolissacarídeo.....	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
1. Instalações e manejo	61
2. Delineamento e dietas experimentais	61
3. Desafio com Lipopolissacarídeo (LPS).....	64
4. Coleta de material biológico.....	64
5. Variáveis analisadas	64
5.1 Indicadores do Sistema Imune não específico	64
5.1.1 Atividade respiratória de leucócitos.....	64
5.1.2 Atividade de lisozima	65
5.1.3 Atividade hemolítica do complemento - via alternativa	66
5.2 Estresse Oxidativo.....	66
5.2.1 Processamento das amostras	66
5.2.2 Superóxido Dismutase (SOD)	67
5.2.3 Catalase (CAT)	67
5.2.4 Glutathione Peroxidase (GPx)	67
5.2.5 Glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)	67
5.2.6 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)	68
5.2.7 Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA).....	68
6. Análises Estatísticas	69

RESULTADOS.....	69
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural de um alfa-aminoácido.	11
Figura 2. Importância dos aminoácidos no metabolismo de teleósteos.	18
Figura 3. Atividade respiratória de leucócitos (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.	44
Figura 4. Atividade da lisozima (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.	45
Figura 5. Atividade hemolítica do complemento (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.	46
Figura 6. Atividade hepática da enzima catalase (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais.	46
Figura 7. Atividade hepática da enzima glutathione peroxidase (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.	47
Figura 8. Atividade hepática da enzima superóxido dismutase (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.	47
Figura 9. Atividade da lisozima sérica dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)	73
Figura 10. Atividade hepática da enzima superóxido dismutase dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)	73
Figura 11. Atividade hepática da enzima catalase dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)	74
Figura 12. Atividade hepática da enzima glutathione peroxidase dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)	74
Figura 13. Atividade da lipoperoxidação (MDA) dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa das exigências de proteína e aminoácidos essenciais para tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) em diferentes fases de desenvolvimento com base na matéria natural.....	10
Tabela 2. Aminoácidos essenciais e não essenciais para peixes e suas respectivas abreviações.	12
Tabela 3. Principais espécies reativas de oxigênio e suas atividades	20
Tabela 4. Enzimas do sistema antioxidante, sua ação biológica e seus principais locais de ação.....	20
Tabela 5. Formulação (g/kg) das dietas experimentais com base na matéria natural. 38	
Tabela 6. Composição química calculada (g/kg) com base na matéria seca das onze dietas experimentais.	39
Tabela 7. Formulação e composição química das dietas experimentais.....	63
Tabela 8. Valores médios e valores de P dos parâmetros biométricos, imunológicos e atividades de enzimas antioxidantes dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) após 60 dias de alimentação com diferentes inclusões de histidina na dieta e desafio com LPS.....	72
Tabela 9. Valores médios e valores de P dos indicadores de estresse oxidativo dos juvenis de tilápia (<i>O. niloticus</i>) após 60 dias de alimentação com diferentes inclusões de histidina na dieta e desafio com LPS.	76

LISTA DE ABREVIações

AA	Aminoácidos
AAE	Aminoácidos essenciais
ALA	Alanina
ANOVA	Análise de variância
ASN	Asparagina
ARG	Arginina
ASP	Aspartato
BURST	Atividade respiratória de leucócitos
C	Carbono
CAT	Catalase
CYS	Cisteína
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
EP	Erro padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GLY	Glicina
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Rd	Glutathione redutase
H	Hidrogênio
HIS	Histidina
ILE	Isoleucina
LEU	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LYS	Lisina
MET	Metionina

N	Nitrogênio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAH	N-acetil histidina
NBT	Nitroblue tetrazolium
O	Oxigênio
PB	Proteína bruta
PD	Proteína digestível
PHE	Fenilalanina
PRO	Prolina
R	Cadeia lateral do aminoácido
SAS	Statistical analysis system
SER	Serina
SOD	Superóxido dismutase
THR	Treonina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
VAL	Valina

DEDICATÓRIA

Dedico a minha avó materna, Ramona Camargo de Aguiar, *in memoriam*. A ela todo meu amor e gratidão.

“Eu abri mão de muitos momentos com minha avó pelo objetivo de estudar e aprender nesses longos dez anos de caminhada até aqui. E a maior incentivadora do meu sonho sempre foi ela.

O braço direito dos meus objetivos, a mulher que sempre viveu a minha causa. Eu tenho certeza que não teria chego até aqui sem o apoio e o amor incondicional da minha avó por mim. Eu serei eternamente grata por cada abraço consolador que ela me deu, cada palavra de incentivo, cada momento de descontração e toda ajuda emocional e financeira que ela me forneceu. Se hoje tenho amor, princípios, honestidade, caráter, simplicidade, compaixão e objetivos na vida foi porque ela sempre foi a melhor escola que eu tive na vida. Você é meu motivo de orgulho vovó, e eu dedico essa singela lembrança por tudo que me proporcionou em vida. Tenho certeza que te orgulharei muito ainda. Um dia nos encontraremos.

Com amor.”

Sua neta.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por guiar meus passos, e pelas graças concedidas todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, por me proporcionarem sempre o melhor incentivo, apoio, conselho e guiarem meus passos, nunca permitindo que me sentisse só.

A minha avó (in memoriam) que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e que tenho absoluta certeza que me abençoa e protege onde estiver.

A minha irmã por sempre disponibilizar seus ouvidos, sua paciência e seus grandes conselhos a mim, sendo meu maior exemplo de vida e de amor.

Ao meu namorado pela paciência, companheirismo e amor todos esses anos, principalmente nos momentos mais difíceis que passamos. Você sempre esteve do meu lado e isso é muito importante para mim, me fortalece a continuar cada dia mais.

A todos os meus amigos Beatriz Gabardo, Danielle Floriano Fachioli, Patricia Luz, Leonardo Zanetti, Viviane Nascimento Santana de Almeida, Adriane Federici Bido, Márcio Kazuaki Kishimoto, Sandie Barbosa, Gabriela Carli e André Nascimento por sempre serem compreensivos com a minha personalidade, e mesmo assim continuarem me apoiando e me incentivando, e principalmente por todos os conselhos levados a mim, todas as palavras de incentivo e todos os momentos de descontração que sempre foram importantíssimos para mim.

Aos grandes amigos e colegas do GAUD, Grupo de Aquicultura da UNESP de Dracena, que mais que companheiros de trabalho, se tornaram grandes amigos pessoais e grandes incentivadores do meu trabalho, estando sempre ali com uma palavra amiga para confortar nos momentos de dificuldade e por me proporcionarem muitos momentos divertidos que lembrarei com muito carinho sempre.

A turma do LANUMA, laboratório de Nutrição e Metabolismo Animal. Obrigada por sermos mais que uma equipe. Obrigada pela amizade e parceria todos esses anos. Vocês serão eternamente importantes para mim.

Ao Professor Dr. Leonardo Susumu Takahashi por toda orientação durante esses seis anos de parceria, e mais do que toda orientação acadêmica, agradeço pela amizade e pelo carinho comigo todos esses anos. Professor: aprendi muito sobre como ser uma pessoa melhor com você! Obrigada por isso. Espero ser no futuro para alguém um pouquinho do que você representa pra mim hoje! OBRIGADA de todo meu coração.

À Professora Amalia Pérez-Jímenez por todo auxílio durante o período de análises laboratoriais, sendo sempre muito atenciosa e amorosa! O meu maior agradecimento é a ela por toda ajuda prestada a mim mesmo estando longe fisicamente.

Ao Professor Fábio Erminio Mingatto pela disponibilidade em me acompanhar e me ensinar alguns procedimentos para novas análises referentes ao meu projeto, que só

engrandeceram e contribuíram de forma positiva com a minha formação acadêmica, além de toda contribuição com as sugestões na banca examinadora de qualificação, sempre muito pertinentes e muito carinhosas.

Ao Professor Paulo Lopes por me acompanhar desde o Mestrado, e sempre ser tão atencioso e solícito comigo. A todas as suas considerações na qualificação e todos esses anos de parceria que pude conviver junto dele.

Ao Professor Dr. João Batista Kochenborger Fernandes por me permitir participar dos seus projetos, e as suas alunas Andressa e Thaís por terem desenvolvido os experimentos no CAUNESP.

A todos os Professores Doutores da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas do Campus de Dracena e da Faculdade de Engenharia do Campus de Ilha Solteira, por todo auxílio científico à minha pesquisa, e principalmente todo carinho, conselhos, respeito e compreensão de “pais e mães” durante todos esses anos.

Aos membros da banca pela disponibilidade de estarem presentes na defesa, e principalmente por cada contribuição, sugestão e dicas valiosas ao engrandecimento do nosso trabalho.

A Tarsilaine, secretária da coordenação do curso de Zootecnia da FCAT, por todo apoio e carinho, e por ter se tornado uma grande amiga e uma grande incentivadora todos esses anos.

Aos técnicos de laboratório Wanderson, Edson, Andréia, Ariane, Heloísa, Miriam, Seu João e Lucas da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas do Campus de Dracena, por toda ajuda na realização das minhas análises e por serem sempre fiéis conselheiros de vida.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado, que sem o qual nada disso poderia ter sido feito.

MUITÍSSIMO OBRIGADA.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP, recurso proveniente do Projeto Temático ao qual este trabalho está vinculado (Processo nº 2013/25761-4).



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
Bolsa de Doutorado.



RESUMO GERAL

Os aminoácidos e seus metabólitos são importantes reguladores das principais vias metabólicas dos peixes, essenciais para manutenção, crescimento, reprodução, comportamento, imunidade e resistência a diversos agentes estressores. Nesse sentido, os objetivos dos trabalhos foram avaliar a influência que uma dieta deficiente em aminoácidos essenciais exerce na capacidade imune e oxidativa de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) em fase de terminação, e averiguar a reposta imunológica e oxidativa de juvenis de tilápia alimentados com dieta contendo níveis crescentes de inclusão do aminoácido histidina desafiados com lipopolissacarídeo. Ao todo foram utilizadas 774 tilápias (264 em fase de terminação e 510 juvenis) em dois experimentos distintos com delineamentos inteiramente ao acaso. No primeiro ensaio foram avaliadas 11 dietas experimentais (controle e dietas deficientes em cada um dos dez aminoácidos essenciais) em variáveis do sistema imune não específico e atividade hepática de enzimas do sistema antioxidante de tilápias, e o segundo, os níveis de inclusão de histidina na dieta sobre as mesmas variáveis, em juvenis de tilápias desafiados com lipopolissacarídeo. Os resultados mostraram que dietas deficientes em aminoácidos essenciais influenciam na capacidade imunomodulatória e oxidativa de tilápias em terminação, e o nível ideal de inclusão de histidina na dieta pode potencializar essas capacidades frente a um desafio. Investigar o efeito do metabolismo de aminoácidos no potencial imunológico e oxidativo de tilápias pode ser uma ferramenta no auxílio de formulação de dietas nutricionalmente balanceadas que possibilitem melhor estado de saúde aos peixes.

Palavras-chave: nutrição, imunidade, estresse oxidativo, enzimas.

ABSTRACT

Amino acids and their metabolites are important regulators of the main metabolic pathways of fish, essential for maintenance, growth, reproduction, behavior, immunity and resistance to various stressors. In this sense, the objectives of the works were to evaluate the influence that a diet deficient in essential amino acids has on the immune and oxidative capacity of Nile tilapia (*O. niloticus*) in the process of termination, and also to investigate the immune and oxidative response of juvenile tilapia fed a diet containing increasing levels of inclusion of the amino acid histidine challenged with lipopolysaccharide. In total, 774 tilapia (264 in the finishing phase and 510 juveniles) were used in two different experiments with completely randomized designs. In the first trial, 11 test diets (control and diets deficient in each of the ten essential amino acids) were evaluated on non-specific immune system variables and liver activity of tilapia antioxidant system enzymes, and the second, the levels of inclusion of histidine in the diet on the same variables, in tilapia juveniles challenged with lipopolysaccharide. The results show that diets deficient in essential amino acids influence the immunomodulatory and oxidative capacity of finishing tilapia, and the ideal level of histidine inclusion in the diet can enhance these capacities in the face of a challenge. Investigating the effect of amino acid metabolism on the immune and oxidative potential of tilapia can be a tool in helping to formulate nutritionally balanced diets that enable better health for fish.

Keywords: nutrition, immunity, oxidative stress, enzymes.

INTRODUÇÃO GERAL

A piscicultura brasileira é uma atividade em constante crescimento e com elevado potencial de cultivo devido à disponibilidade dos recursos hídricos do país, às dimensões continentais, ao clima tropical, à diversidade de espécies e ao empreendedorismo dos produtores. O desempenho produtivo do Brasil no ano de 2018 foi bastante positivo, principalmente quando comparado às outras proteínas de origem animal, atingindo a marca de 722.560 toneladas, representando um crescimento de 4,5% comparado ao ano anterior (PEIXE BR, 2019).

Diretamente relacionadas ao nível de produtividade e eficiência econômica dos sistemas de cultivo, tanto no Brasil como nos demais países, a nutrição e a alimentação exercem um papel fundamental na manutenção da saúde dos peixes, influenciando diretamente no desempenho produtivo e na qualidade nutricional da carne (LUNDSTEDT, RODRIGUES e MORO, 2016).

Estudos referentes à nutrição dos peixes são desafiadores uma vez que existe uma diversidade de espécies, cada qual com suas particularidades morfofisiológicas e comportamentais, além dos inúmeros fatores que influenciam suas necessidades nutricionais, como fase de crescimento, sexo, linhagem, estado fisiológico, regime de produção e condições ambientais (FRACALOSSO et al., 2012)

Diante da diversidade de peixes criados comercialmente, as principais espécies cultivadas no Brasil se destacam pelas altas taxas de crescimento, principalmente na piscicultura continental, sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a espécie predominante na produção aquícola nacional. No ano de 2018, a tilápia (*O. niloticus*) alcançou um total de produção de 400.280 toneladas, representando um crescimento de 11,9% (357.639 t em 2017). Com esse desempenho, a espécie representa 55,4% da produção total de peixes de cultivo no Brasil (PEIXE BR, 2019).

A espécie *O. niloticus* necessita de diversos nutrientes adequados para seu crescimento, reprodução e saúde, bem como: energia para crescimento e manutenção do metabolismo basal; aminoácidos essenciais para formação de tecidos e proteínas; ácidos graxos para suporte energético e composição de membrana; minerais para formação óssea e vitaminas, para ativação enzimática em diversos processos metabólicos (KUBITZA, 1999).

O sucesso da produção de peixes dependerá da quantidade e da qualidade de alimento fornecido através da dieta para suprir essas demandas metabólicas da espécie que se deseja cultivar. Sendo a proteína um dos nutrientes de maior custo na

alimentação dos peixes, conhecer a exigência nutricional e principalmente o balanço de aminoácidos para cada espécie, favorece um maior crescimento e uma melhor condição de saúde aos peixes cultivados (PEZZATO, BARROS e FURUYA, 2009).

Embora as doenças sejam consideradas parte dos processos biológicos normais, elas podem se tornar um problema sério na aquicultura. Portanto, como a piscicultura é uma indústria de rápido crescimento, há uma necessidade urgente de investigar e controlar doenças, além de entender profundamente a imunidade dos peixes. Atualmente, é amplamente aceito que abordagens nutricionais são essenciais para aliviar doenças entre animais aquáticos de criação. Em particular, estratégias imunonutricionais têm sido estudadas para destacar a importância de aminoácidos individuais como nutracêuticos para os peixes de cultivo. Ainda, conhecer as respostas hematológicas e imunológicas para diferentes dietas fornecidas às tilápias pode ser uma ferramenta favorável à formulação de dietas nutricionalmente balanceadas, uma vez que muitas dietas comerciais possuem níveis proteicos subestimados (AZEREDO et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo geral do trabalho foi avaliar o efeito do metabolismo de aminoácidos essenciais no sistema imunológico e nas defesas antioxidantes em tilápia do Nilo (*O. niloticus*); e os objetivos específicos foram determinar a relação dos principais aminoácidos limitantes na dieta nas defesas antioxidantes enzimáticas e imunes em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) em fase de terminação (Capítulo II), e analisar a influência dos níveis de histidina na dieta na resposta imune e defesas antioxidantes de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) (Capítulo III).

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

1. Importância dos aminoácidos em dietas para peixes

A cada ano a aquicultura brasileira tem se fortalecido em produtividade e qualidade do pescado. A tilápia do Nilo tem recebido destaque neste cenário, principalmente por ter sido a espécie de maior adaptabilidade as condições climáticas no Brasil, favorecendo o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo que tornem a produção mais eficiente. Nesse contexto, a alimentação de peixes representa a porção mais onerosa de uma produção, sendo responsável por até 70% das despesas operacionais (TEIXEIRA, 2008); o que torna necessário o desenvolvimento de dietas mais eficientes, com menor custo e que atendam as exigências das linhagens nas diferentes fases de desenvolvimento.

Os elevados custos das rações para peixes são atribuídos à composição proteica da dieta (WILSON et al., 2002), além do processamento da mesma. Ingredientes proteicos precisam ter boa procedência e apresentar alta digestibilidade para garantir um melhor aproveitamento por parte dos peixes. A fração proteica da dieta é formada pela sua sequência única de α -aminoácidos, ou pela forma como são decodificadas geneticamente no organismo (NRC, 2011), podendo desempenhar funções metabólicas distintas.

Dentre as diferentes funções das proteínas, podemos destacar: formação das fibras musculares, controle metabólico e contração, componente enzimático, transporte, função protetora como as imunoglobulinas, participação no metabolismo hormonal, além de outras funções específicas. O estado de saúde dos peixes está diretamente relacionado às funções possíveis de atuação de uma molécula de proteína, podendo ser o principal fator na manutenção da qualidade de vida e resistência às diversas situações de estresse e/ou desafios as quais os peixes possam ser submetidos (DEVLIN, 2003).

As exigências nutricionais em proteína são baseadas no perfil ideal de aminoácidos, para tanto, torna-se necessário à determinação da digestibilidade dos aminoácidos essenciais e não essenciais dos diferentes alimentos utilizados nas dietas, de modo a aumentar a eficiência alimentar e o aproveitamento de proteína na carcaça. A deficiência desses aminoácidos provoca redução na eficiência de utilização da proteína, afetando o desempenho zootécnico do peixe, além de reduzir a resistência a doenças devido ao comprometimento dos mecanismos de resposta imunológica

(CYRINO, WAGNER e CASTAGNOLLI, 2002). Os valores de exigência de proteína bruta, proteína digestível e aminoácidos essenciais para a tilapia do Nilo estão descritos na Tabela 1.

Comparado a outros animais os peixes exigem uma maior quantidade de proteína dietética. Enquanto frangos e suínos exigem de 18 a 23% e de 14 a 16% de proteína bruta (PB) respectivamente, as rações para os peixes podem conter de 28 a 50% de PB, variando de acordo com a fase de desenvolvimento, hábito alimentar da espécie e sistema de criação. Além disto, os peixes podem utilizar eficientemente proteínas da dieta como fonte energética, e a excreção dos produtos da digestão e metabolização dos aminoácidos (amônio ou amônia) é feita de forma passiva pelas brânquias com baixo custo energético (CYRINO, WAGNER e CASTAGNOLLI, 2002).

Tabela 1. Estimativa das exigências de proteína e aminoácidos essenciais para tilápias do Nilo (*O. niloticus*) em diferentes fases de desenvolvimento com base na matéria natural.

Nutriente	Reversão	Pós-reversão até 100g	≥ 100g
Proteína bruta (%)	41,30	29,73	26,80
Proteína digestível (%)	38,60	26,81	24,30
<i>Aminoácidos Essenciais</i>			
Lisina (%)	2,20	1,53	1,38
Metionina (%)	0,75	0,52	0,47
Treonina (%)	1,70	1,18	1,07
Triptofano (%)	0,43	0,30	0,27
Arginina (%)	1,81	1,26	1,14
Fenilalanina (%)	2,38	1,65	1,50
Histidina (%)	0,75	0,52	0,47
Isoleucina (%)	1,34	0,93	0,84
Leucina (%)	1,46	1,01	0,92
Valina (%)	1,20	0,83	0,75

Fonte: Furuya (2010).

Aminoácidos são compostos quaternários de carbono quiral (C), hidrogênio (H), oxigênio (O) e nitrogênio (N). A estrutura geral dos aminoácidos envolve um grupo amina (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH) ambos ligados ao carbono α (o primeiro depois do grupo carboxílico). O carbono α também é ligado a um hidrogênio (H) e a uma cadeia lateral, que é representada pela letra R. Os alfa-aminoácidos (Figura 1) são metabolicamente mais importantes e naturalmente mais abundantes, sendo os responsáveis pela formação das proteínas (BRODY, 1999).

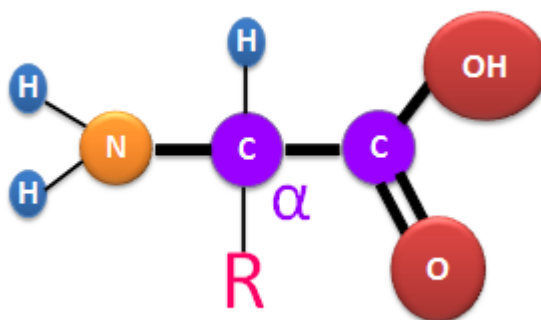


Figura 1. Fórmula estrutural de um alfa-aminoácido.

Fonte: Própria autora.

Em dietas para peixes, principalmente quando falamos em crescimento, os AAs são tradicionalmente classificados em dois grupos: essenciais (indispensáveis) e não essenciais (dispensáveis). Os aminoácidos essenciais (AAE) são aqueles que os animais não são capazes de sintetizá-los, sendo necessário o fornecimento na dieta; enquanto que os aminoácidos não essenciais são sintetizados pelo próprio organismo. Geralmente os aminoácidos são representados por três letras que sugerem uma abreviação da sua nomenclatura (Tabela 2), comumente usado em nutrição animal (NRC, 2011).

Tabela 2. Aminoácidos essenciais e não essenciais para peixes e suas respectivas abreviações.

AA Essenciais	Abreviações	AA Não Essenciais	Abreviações
Arginina	ARG	Alanina	ALA
Histidina	HIS	Asparagina	ANS
Isoleucina	ILE	Aspartato	ASP
Leucina	LEU	Cisteína	CYS
Lisina	LYS	Glicina	GLY
Metionina	MET	Glutamina	GLN
Fenilalanina	PHE	Glutamato	GLU
Treonina	THR	Prolina	PRO
Triptofano	TRP	Serina	SER
Valina	VAL	Tirosina	TYR

Fonte: Adaptado de Li et al. (2009).

Atualmente dez aminoácidos são considerados como essenciais para os peixes, sendo sua disponibilidade na dieta de extrema importância (LI et al., 2009). Os peixes são incapazes de sintetizar alguns aminoácidos (Tabela 2), sendo que esses devem ser adquiridos através da ingestão de proteínas na dieta para atender suas exigências nutricionais (NRC, 2011).

Entre os aminoácidos essenciais, a lisina está presente em elevada proporção no tecido muscular dos peixes e pode ser o aminoácido mais limitante nos ingredientes utilizados na formulação de rações (FOSTER e OGATA, 1998). O perfil e a biodisponibilidade dos aminoácidos que compõem os ingredientes utilizados na fabricação de rações para peixes devem ser avaliados principalmente para os aminoácidos lisina, metionina, treonina e triptofano, uma vez que são considerados os mais limitantes em rações para peixes (GONÇALVES et al., 2009).

A adição de lisina em dietas à base de proteínas vegetais permite a redução do custo-benefício de proteína bruta na ração, sem afetar o desempenho dos peixes, uma vez que incluir lisina nas dietas hoje está mais fácil, devido a sua grande disponibilidade comercial (MAI et al., 2006). Em um estudo no qual foi avaliada a redução da lisina na dieta, os autores evidenciaram queda no crescimento e na

eficiência alimentar dos peixes, além de observarem problemas de saúde, como erosão das nadadeiras dorsal e caudal em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e na carpa comum (*Cyprinus carpio*) (KETOLA, 1983).

O mesmo foi observado por Li et al. (2008) que concluíram que dietas com níveis distintos de lisina podem interferir diretamente no crescimento e na saúde do peixe. Além disso, Zhou (2005) observou que a suplementação na dieta com lisina foi eficaz na melhoria da resposta imune e no desenvolvimento gastrointestinal de Jian carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian).

A metionina também é considerada um dos aminoácidos limitantes nas dietas para peixes, em especial as que contêm elevados níveis de fontes de proteínas vegetais, como farelo de soja (MAI et al., 2006). Este aminoácido está associado à cistina, que facilita sua síntese, estimando-se que seja capaz de poupar de 40 a 60% a utilização da metionina para vários peixes (WILSON, 2002). A metionina é comumente disponível na forma de D e L. A maioria dos animais utilizam os isômeros da L e D-metionina de formas semelhantes e eficazes, como, por exemplo, a truta arco-íris que pode substituir a L-metionina pela D-metionina em uma base equimolar (KIM et al., 1992).

Pouca atenção tem sido dada ao estudo do papel da treonina na alimentação dos peixes. De acordo com Li et al. (2009), a maioria das pesquisas utilizando treonina foram focadas nas necessidades mínimas dos peixes, devido a sua baixa concentração em fontes de proteínas vegetais. Porém, sabe-se que a treonina é o maior componente da mucina do intestino delgado, responsável pelo funcionamento e integridade da barreira intestinal. Li et al. (2007) relataram que dietas com níveis reduzidos de treonina podem afetar a imunidade em mamíferos, tornando possível relacionar o uso de dietas ricas em treonina na imunidade dos peixes.

Outro aminoácido essencial conhecido em estudos com peixes é o triptofano. O triptofano pode ser convertido no organismo em serotonina (neurotransmissor) e em melatonina (antioxidante) (FANG et al., 2002). A serotonina é capaz de inibir a ingestão de alimento pelos peixes, como em robalos-flecha (*Centropomus undecimalis*), por exemplo. Já a melatonina é regulada pelo fotoperíodo e desempenha um papel importante na maturação sexual (AMANO et al., 2004).

Estudos anteriores mostraram que a deficiência de triptofano pode reduzir o crescimento e a eficiência alimentar dos peixes. Além disso, a deficiência de triptofano pode perturbar o metabolismo mineral (WALTON et al., 1984; HALVER e SHANKS, 1960; AKIYAMA et al., 1986). Portanto, é necessário determinar os requisitos de

triptofano dos peixes, especialmente para espécies como as tilápias, que são alimentadas com dietas formuladas a partir de fontes de proteínas vegetais. A exigência de triptofano na dieta foi avaliada para um número limitado de espécies de peixes cultivadas, como o bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) (WILSON et al., 1978), carpa comum (*Cyprinus carpio*) (NOSE, 1979), robalo híbrido (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) (GAYLORD et al., 2005), e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (RODEHUTSCORD et al., 1997).

A histidina é um aminoácido abundante na albumina plasmática dos peixes (SZELEDINSZKY e GILMOUR, 2002). O plasma contém um alto nível de glicoproteínas ricas em histidina, que tem uma estrutura de múltiplos domínios, interagindo com muitos ligantes regulando vários processos biológicos, incluindo adesão e migração celular, ativação do sistema complemento, depuração do complexo imune e fagocitose de células apoptóticas (JONES et al., 2005). Notavelmente, uma via imunológica significativa para a utilização de histidina é iniciada pela histidina descarboxilase para produzir histamina, um importante mediador de reações inflamatórias (TANAKA e ICHIKAWA, 2006). Acreditava-se que apenas mastócitos e basófilos poderiam liberar a histamina do armazenamento durante a desgranulação, respondendo a diferentes estímulos imunológicos. No entanto, muitos tecidos e tipos de células expressam essa enzima para sintetizar histamina (DY e SCHNEIDER, 2004).

A leucina é considerada essencial para o crescimento normal e o potencial reprodutivo dos peixes (NRC, 2011). O desequilíbrio da leucina na dieta leva a uma redução na taxa de crescimento e uma diminuição na eficiência da utilização de alimentos (ABIDI e KHAN, 2007), e suplementá-la na dieta pode melhorar a deposição de proteína muscular, a liberação de insulina e a degradação lipídica (NAIR et al., 1992; PEDROSO et al., 2014). A leucina desempenha um papel importante na produção de hemoglobina, manutenção dos níveis de açúcar no sangue, aumento da produção de hormônios do crescimento e também afeta o estresse, a energia e o metabolismo muscular (ABIDI e KHAN, 2007).

A suplementação dietética de leucina pode melhorar a capacidade imune não específica de juvenis de *Cyprinus carpa* var. Jian, aumentando a fagocitose dos leucócitos e a resistência a *Aeromonas hydrophila* (WU, 2014), além de também promover o desenvolvimento da mucosa intestinal, melhorando a digestão e a absorção em tilápias GIFT (*Oreochromis niloticus*) (SHI et al, 2014).

Por outro lado, a deficiência de leucina na dieta pode causar disfunções bioquímicas graves, incluindo retardo de crescimento (ABIDI e KHAN, 2007), atrofia do timo e do baço, dano ao tecido linfóide e redução da imunoglobulina sérica, dos níveis de proteína do sistema complemento (C3) e do transporte de ferro (WANG e LI, 2011).

As informações sobre o efeito da limitação dos aminoácidos essenciais nas dietas e suas influências sobre o sistema de defesa antioxidante e imunológico são limitadas, mas merecem investigação (WU et al., 2018).

A alanina é um aminoácido que apresenta alta palatabilidade para os peixes, podendo ser considerado um estimulante alimentar, embora os mecanismos precursores sejam desconhecidos. Pertencente ao grupo dos aminoácidos não essenciais, ela representa importante substrato energético e é considerada o maior precursor do glicogênio para os peixes (SHAMUSHAKI et al., 2007).

Por apresentar rápida oxidação e baixa toxicidade, a alanina é considerada o veículo preferido para o metabolismo de nitrogênio intercelular do peixe (MOMMSEN et al., 1980), sendo muito utilizada, juntamente com o aspartato, em estudos que avaliam o balanço de nitrogênio em nutrição de organismos aquáticos. A formação da β -alanina se dá no processo de descarboxilação do aspartato, que constitui a carnosina e a anserina, antioxidantes importantes no músculo esquelético dos animais aquáticos, principalmente espécies marinhas migratórias (SNYDER et al., 2008).

Outro aminoácido bastante utilizado na nutrição de peixes é a glutamina. Por ser um dos mais abundantes no plasma e no músculo dos peixes, o glutamato e seu produto de descarboxilação são neurotransmissores presentes em concentrações elevadas no cérebro (LI et al., 2008). Lin e Zhou (2006) descreveram que suplementar a dieta com glutamina aumentou os índices zootécnicos, assim como a atividade de enzimas digestivas em *Hypophthalmichthys molitrix*. Já os autores Buentello e Gatlin (1999) e Li et al. (2007) destacam a importância da glutamina para a resposta imune dos peixes.

2. Sistema imune e lipopolissacarídeo em peixes

O sistema imunológico nos peixes é formado por células e compostos humorais que vão atuar contra qualquer material estranho para defender o organismo. Esses materiais podem ser tanto micro-organismos, quanto células malignas ou toxinas que entrarão em contato com o corpo do animal, causando contaminação e dano interno e/ou externo (BAYNE e GERWICK, 2001). Assim como todos os outros animais, os peixes também estão susceptíveis a qualquer tipo de invasão parasitária e infecções bacterianas, virais ou fúngicas. Quando o organismo do animal se depara com algum tipo de enfermidade, rapidamente é processada uma resposta de defesa denominada reação imunológica, ativando todos os mecanismos do sistema de defesa que irão atuar em conjunto tentando promover a proteção do organismo contra o agente causador da enfermidade, seja interna ou externamente (BALFRY e HIGGS, 2001).

A resposta imune do organismo pode ser adquirida, desencadeando um processo específico induzido contra um agente externo através das imunoglobulinas, ou não específico, também conhecido como imunidade natural, acionando um mecanismo de defesa inato, atribuindo ao hospedeiro a capacidade de resistir a infecções (SAKAI, 1999; ANDERSON, 1974). Para os mecanismos de resistência a doenças em peixes, o sistema imune inato é extremamente importante, principalmente porque para muitas espécies, a resposta imunológica adquirida é lenta (MAGNADÓTTIR, 2006).

Os lipopolissacarídeos (LPS), componentes estruturais da parede celular de bactérias Gram negativas, são também endotoxinas. Algumas espécies de peixes evidenciaram a resistência a este tipo de substância, que apresenta em sua composição uma porção antigênica específica, e outra porção não específica denominada lipídeo A, servindo estas porções para reconhecimento imune. A porção do lipídeo A do LPS é responsável pela toxidez das endotoxinas quando entram em contato com o organismo do animal, mesmo em doses muito pequenas, abaixo de um nanograma (BERTÓK, 1998).

Em peixes, o contato com o LPS não causa distúrbios na coagulação sanguínea nem leva o animal a óbito (CONGLETON e WAGNER, 1991; ROBERTSEN, 1999), como pode acontecer com alguns mamíferos. Em um estudo realizado com truta e salmão, observaram que a inoculação de LPS em doses de 5 a 10 mg/kg elevou os níveis de cortisol sérico e acelerou a glicogenólise, induzindo o organismo a modificações metabólicas (HINE e WAIN, 1988).

Os antígenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) extraídos de *Escherichia coli*, são atualmente os estímulos desencadeantes da resposta imune mais utilizados devido à viabilidade e disponibilidade comercial. Acredita-se que a presença de peptidoglicanos residuais ou DNA bacteriano em preparações impuras de LPS sejam estruturas reconhecidas por leucócitos de peixe, capazes de induzir uma resposta imune. O tempo para que essas modificações se expressem pode variar muito de acordo com a fonte que o LPS em estudo foi extraído, qual o método de isolamento e principalmente, a via de inoculação (WHITE, ARTHUR e FLETCHER, 1984).

Um estudo recente avaliou o efeito de um imunoestimulante na dieta (Actigen) nas respostas imunológicas e fisiológicas e da tilápia após a inoculação com lipopolissacarídeos (LPS). Sendo observada diminuição geral nas células e nas globulinas 5 dias após o desafio com LPS, com recuperação parcial aos 12 dias após o desafio (HA et al., 2017). Assim como em peixes carnívoros, como o híbrido surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. corruscans*) alimentados com diferentes proporções de proteína e carboidrato na dieta foi observado que as variáveis sanguíneas aumentaram após o desafio com LPS (SOUSA et al., 2020).

A endotoxina LPS mostrou-se eficaz com a finalidade de desafio imunológico, pois desencadeia com sucesso uma resposta imune. Esse achado é importante para estudos sobre moduladores imunológicos, bem como para estudos bacterianos especificamente, pois o LPS pode ser uma alternativa eficiente aos desafios bacterianos.

3. Aminoácidos e imunidade em peixes

Por estarem inseridos em um ambiente aquático, os peixes estão altamente susceptíveis a qualquer tipo de invasão parasitária, bacteriana, viral ou fúngica. Quando o organismo do animal se depara com algum tipo de enfermidade, rapidamente é processada uma resposta de defesa denominada reação imunológica, a qual ativa todos os mecanismos do sistema de defesa que irão atuar em conjunto tentando promover a proteção do organismo contra o agente causador da enfermidade (BALFRY e HIGGS, 2001).

A resposta imune do organismo pode ser adquirida, desencadeando um processo específico induzido contra um agente externo através das imunoglobulinas, ou natural, acionando um mecanismo de defesa inato, atribuindo ao hospedeiro a capacidade de

resistir a infecções (ANDERSON, 1974; SINDERMAN, 1990; SHEPHERD, 1992; DALMO; INGEBRIGTSEN e BODWALD, 1997; IWANA et al., 1997; SAKAI, 1999)

Estudos realizados com animais aquáticos, principalmente peixes, mostraram a capacidade dos aminoácidos em regular resposta imunológica e as vias metabólicas, que são cruciais para a manutenção da homeostase, crescimento e reprodução (Figura 2).

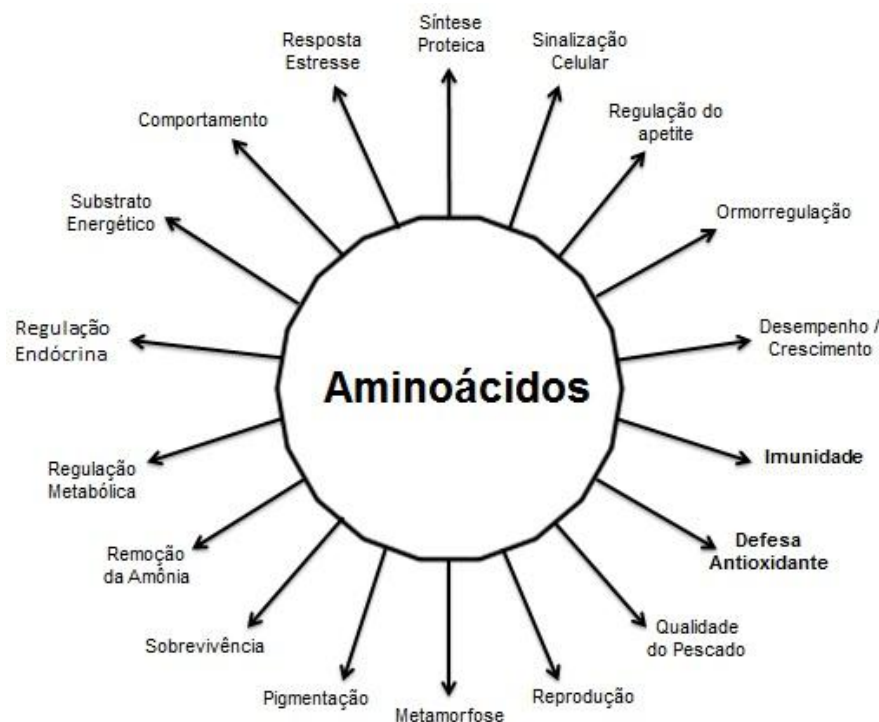


Figura 2. Importância dos aminoácidos no metabolismo de teleósteos.
Fonte: Li et al. (2009).

Independente da filogenia do organismo, os mecanismos imunes inatos são orquestrados por uma grande variedade de células e efetores intermediários que estão ausentes em respostas imunes específicas. Tal característica confere ao hospedeiro as defesas imunológicas inatas que, embora inespecíficas, são capazes de reagir contra uma ampla gama de patógenos. Apesar das doenças serem consideradas parte dos processos biológicos normais, elas podem se tornar um problema sério na aquicultura. Portanto, há uma necessidade urgente de investigar e controlar doenças que comprometem a produção, bem como entender profundamente os mecanismos de imunidade dos peixes (AKIRA et al., 2006).

Em particular, estratégias imuno-nutricionais têm sido estudadas para destacar a importância de aminoácidos individuais como nutracêuticos para peixes de cultivo. A glutamina, por exemplo, é uma fonte importante de energia para os leucócitos, pois

durante a ativação imune celular, a glutamina é convertida em alfa-cetoglutarato, alimentando o ciclo de Krebs e fornecendo energia adicional para sustentar a função imunológica (ANDERSEN, WAAGBO e ESPE, 2016).

Experimentos “in vivo” e “in vitro” com arginina demonstraram seu envolvimento na regulação imune, proliferação celular e mecanismos neuroendócrinos, mas suas implicações práticas para a saúde em peixes ainda são controversas. A arginina é precursora do óxido nítrico, um potente agente bactericida da fase pró-inflamatória (JIANG et al., 2015).

A suplementação de metionina na dieta também afeta o estado imunológico dos peixes, aumentando a resposta imune humoral, através do aumento no número de leucócitos. A metionina pode afetar indiretamente a capacidade antioxidante, pois fornece cisteína para a síntese de glutathione. No entanto, poucos estudos foram centrados nos caminhos exatos pelos quais os aminoácidos mediam seus efeitos imunológicos e oxidativos (KUANG et al., 2012).

A histidina é um componente importante para a formação de histamina, uma substância envolvida em processos bioquímicos de resposta imunológica (sinalização), além de ter funções importantes nos sítios catalíticos de muitas proteínas (enzimas), na síntese de purinas e precursora para muitos imidazóis funcionais em peixes (carnosina, anserina, N-acetil histidina-(NAH)) (BRECK et al., 2003).

3. Sistema antioxidante em peixes

Como todos os organismos aeróbicos, os peixes são suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (Tabela 3) e desenvolveram defesas antioxidantes demonstradas por pesquisas que datam principalmente da década de 1980 (HU et al., 2014). Os agentes antioxidantes podem ser compostos vitamínicos, minerais, ou enzimas. As enzimas (Tabela 4) são as primeiras defesas antioxidantes a atuar contra os radicais livres, que são classificados como grupos de átomos ou moléculas que possuem um número de elétrons não pareados em sua última camada eletrônica (HALLIWELL, 1992).

Tabela 3. Principais espécies reativas de oxigênio e suas atividades

Espécies	Estrutura Química	Atividade (ação)
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Na maioria das reações atua como agente redutor
Radical hidroxila	$HO^{\cdot}$	DNA, proteínas, carboidratos e lipídios
Radical hidroperoxil	$HO_2^{\cdot}$	Membranas biológicas
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Proteínas e lipídios
Oxigênio singleto	1O_2	Mutações no DNA

Fonte: Adaptado de Garcez et al. (2004) e Oliveira e Schoffen (2010)

Tabela 4. Enzimas do sistema antioxidante, sua ação biológica e seus principais locais de ação.

Enzima	Ação biológica	Localização
Superóxido Dismutase (SOD)	Catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$, convertendo-o em H_2O_2	Abundante nas células aeróbicas
Catalase (CAT)	Catalisa a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2	Eritrócitos, baço, rins e fígado dos mamíferos
Glutationa Peroxidase (GPx)	Catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos às custas da conversão da GSH para GSSG	Citosol

Fonte: Adaptado de Oliveira & Schoffen (2010)

O termo radical livre não é o mais apropriado para designar o conjunto de agentes reativos deletérios, pois alguns deles não apresentam essa característica de elétrons desemparelhados em sua última camada, ainda que participem de reações de oxirredução. Os termos mais apropriados são: ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio) (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

No ano de 1969, McCord e Fridovich descobriram a existência da enzima superóxido dismutase (SOD), e a partir de então, a ciência dos radicais livres passou a ser difundida entre vários pesquisadores que se convenceram de que os radicais livres são importantes na biologia, e as investigações dos danos oxidativos causados por tais agentes sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios, proteínas e diversos componentes celulares, foram iniciadas (FRIDOVICH, 1999).

A geração de espécies reativas em seres aeróbicos constitui um processo biológico essencial, pois estão envolvidas nos processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, defesa celular, imunidade e síntese de substâncias. No entanto, seu excesso pode ser prejudicial, promovendo a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN, CILLARD e CILLARD, 1987).

Quando há uma geração excessiva de ERO e/ou ERN e uma crescente velocidade de remoção destas, o organismo entra em um estado que denominamos estresse oxidativo, que tende a favorecer o dano oxidativo a biomoléculas (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). Numa tentativa de evitar esse estresse, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar de duas maneiras: eliminar o agente causador deste estresse antes que ele cause qualquer tipo de lesão ou reparar a lesão ocorrida. A primeira conta com o auxílio das defesas antioxidantes não enzimáticas, como a glutathiona reduzida (GSH), vitamina E e ácido ascórbico. A segunda conta com as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GSH-Rd). Estas enzimas foram detectadas na maioria das espécies de peixes investigadas até o momento (RUDNEVA, 1997).

A avaliação das proteções antioxidantes em espécies de peixes apresentam diferenças qualitativas e quantitativas em função da diversidade das espécies, dos tecidos estudados, sazonalidade, nutrição, entre outros fatores (MATKOVICS et al., 1977). A defesa antioxidante nos peixes também depende diretamente do hábito alimentar e dos fatores nutricionais da dieta. Em um estudo realizado com peixes herbívoros (*Ctenopharyngodon idella* e *Hypophthalmichthys molitrix*) e onívoros (*Barbus barbus* e *Cyprinus carpio*), de forma geral a atividade da SOD foi maior nos peixes com hábito alimentar herbívoro, enquanto que a atividade da CAT e GPx foram menores para o mesmo grupo (RADI et al., 1985).

Os mesmo autores compararam as atividades das enzimas antioxidantes nos tecidos de três grupos de peixes com hábitos alimentares distintos: onívoro (carpa comum, *C. carpio*), herbívoro (carpa prateada, *H. molitrix*) e carnívoro (siluro, *Silurus glanis*). A espécie carnívora, quando comparada com as demais, apresentou baixa atividade da GPx no fígado, alta atividade da CAT no fígado e rins, e elevada atividade da SOD no fígado. Para as espécies onívoras e herbívoras os resultados se assemelham aos apresentados anteriormente (RADI et al., 1987).

4. Aminoácidos e sistema antioxidantes em peixes

Os aminoácidos podem servir como catalisadores e antioxidantes, dependendo de sua concentração, pH circundante e outros fatores. Marcuse (1962) descobriu que a maioria dos aminoácidos tinha um potencial antioxidante significativo no ácido linoleico e nos ésteres metílicos do ácido linoléico. No entanto, a cisteína foi uma exceção notável e foi encontrada normalmente como um pró-oxidante. Marcuse sugeriu que pode haver uma tendência a uma inversão pró-oxidativa com concentrações de aminoácidos relativamente altas ou com pH baixo. O ácido úrico e a glutatona nem sempre são antioxidantes perfeitos, pois podem formar radicais através de reações com OH, o que pode causar alguns problemas biológicos. A reação da GSH com o radical superóxido também pode levar à formação de oxigênio singleto (HALLIWELL e GUTTERRIDGE 1989).

Uma dieta desequilibrada em aminoácidos aumenta a deposição central de lipídios e aumenta o acúmulo de triacilgliceróis no fígado e o peso relativo do fígado. Isso tem sido associado ao aumento da expressão de marcadores de inflamação e ao aumento do estresse oxidativo. Uma dieta limitada em metionina aumentará a proteólise e / ou reduzirá o acúmulo de proteínas no músculo, a fim de fornecer ao fígado aminoácido suficiente. Assim, uma dieta desequilibrada favorecerá o crescimento visceral e não o crescimento muscular. Uma dieta equilibrada limitará a inflamação e o estresse oxidativo. Os aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) inibem a formação de triacilgliceróis no fígado, enquanto a arginina e a leucina estimulam a síntese de proteínas no músculo (ANDERSEN, WAAGBO e ESPE, 2016).

O metabolismo dos aminoácidos interfere diretamente na capacidade de defesa antioxidante dos peixes. Vários estudos sugeriram, por exemplo, que a histidina e seus derivados podem atuar como antioxidantes ou podem mitigar o impacto do estresse oxidativo (WADE e TUCKER, 1998), a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (BELLIA et al., 2008), o dano oxidativo ao DNA, e a isquemia cardíaca (LEE et al., 1999). A atividade antioxidante está ligada à estrutura do anel imidazólico com capacidade de eliminar radicais hidroxilas e superóxidos (REMO et al., 2011). A estrutura química permite que os compostos de imidazol atuem como tampões de pH. A histidina e a anserina constituem importantes componentes do tampão no músculo do peixe e são vitais para a produção contínua de energia anaeróbia (ABE, 2000).

A arginina está envolvida em várias vias metabólicas celulares, incluindo o ciclo da ureia, a síntese de creatina, óxido nítrico (NO) e poliaminas. Três isoformas da enzima

óxido nítrico sintase, que produzem óxido nítrico (NO) e citrulina a partir da arginina, estão presentes em peixes: induzível, neuronal e endotelial (EDDY, 2005). A enzima compete por seu substrato (arginina) com a arginase. O aumento da atividade da arginase ou uma deficiência da disponibilidade de arginina levará ao desacoplamento da óxido nítrico sintase, levando-a produzir superóxido em vez de óxido nítrico. O superóxido estimula ainda mais a atividade da arginase e inibe a óxido nítrico sintase, gerando estresse oxidativo celular (PERNOW e JUNG, 2013).

Ao compartilhar os mesmos sistemas de transporte com a arginina, a disponibilidade de lisina na dieta ou extracelular pode modular a entrada de arginina nos leucócitos e, portanto, a síntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase induzível (WU & MEININGER, 2002). De fato, o aumento das concentrações extracelulares de lisina reduz a concentração intracelular de arginina e a síntese de óxido nítrico nos macrófagos ativados de maneira dependente da dose (CLOSS et al. 2000).

Estudos sugeriram que a histidina e seus derivados funcionam como antioxidantes ou podem mitigar o impacto do estresse oxidativo (HOBART et al., 2004; WILLIAMS, 2006), oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (BELLIA et al., 2008) e dano oxidativo ao DNA. A atividade antioxidante está conectada à estrutura do anel imidazol nos compostos de histidina, com capacidade de eliminar radicais hidroxila e oxigênio singleto (NAGASAWA et al., 2001; WADE e TUCKER, 1998).

A suplementação de metionina pode proteger contra o estresse oxidativo, pois é precursora dos antioxidantes taurina e glutathione. A deficiência deste aminoácido pode aumentar a ERO (ANDERSEN et al., 2013). Em células hepáticas isoladas de salmão, a suplementação de taurina melhorou a viabilidade e diminuiu a ativação da proteína da cascata de quinases sinalizando a morte celular (ESPE e HOLEN, 2013). A redução de taurina pode induzir o estresse oxidativo e inflamatório, que está intimamente associado à síndrome metabólica, podendo reduzir a viabilidade celular (ESPE e HOLEN, 2013). Essas observações provavelmente estão ligadas aos efeitos antioxidativos da taurina (ATMACA, 2004).

Os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina também são considerados aminoácidos essenciais para peixes. São importantes para a síntese de proteínas, mas também são importantes reguladores da degradação dessas proteínas. Ao contrário da degradação dos outros aminoácidos, a degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada começa em tecidos hepáticos extras, produzindo glutamato e cetoácidos de cadeia ramificada, antes de serem transportados para o fígado para

posterior degradação. Em mamíferos, a suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada está ligada ao tempo de vida celular, biogênese mitocondrial e defesa contra ERO (PEREIRA et al., 2012). Isso está ligado à ativação das sirtuínas, uma família de proteínas de desacetilação capazes de reduzir o estresse oxidativo (SCHIRMER et al., 2012).

Evidências mostram que uma função importante da fenilalanina é regular positivamente a expressão e a atividade da GTP ciclohidrolase I, que é a primeira enzima controladora da síntese de tetrahydrobiopterina, um cofator essencial para síntese de óxido nítrico (SHI et al. 2004). Assim, a fenilalanina pode regular a síntese de óxido nítrico pelos leucócitos. Atualmente, o óxido nítrico constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, podendo ser potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. Uma ingestão adequada de fenilalanina na dieta evita a produção excessiva de óxido nítrico, e consequentemente, evita sua toxicidade e possível estresse oxidativo (WU e MEININGER, 2002).

Os produtos do catabolismo do triptofano incluem serotonina, N-acetilserotonina e melatonina (KIM et al. 2007). São capazes de inibir a produção de superóxido, eliminando os radicais livres e atenuando a produção de TNF- α , melhorando a resposta inflamatória (PERIANAYAGAM et al. 2005). Além disso, a N-acetilserotonina é um inibidor da sepiapterina redutase, uma enzima para a síntese de tetrahydrobiopterina, reduzindo a síntese de óxido nítrico, minimizando um possível quadro de estresse oxidativo (SHI et al. 2004).

Ao equilibrar a composição de aminoácidos da dieta evitando deficiências, vários distúrbios metabólicos podem ser evitados. O equilíbrio é necessário para manter o estado de saúde normal e proteger o hospedeiro de uma variedade de doenças. Devido ao impacto negativo do desequilíbrio e antagonismo de aminoácidos na ingestão e utilização de nutrientes, um suprimento excessivo de aminoácidos na dieta pode ser prejudicial para o sistema de defesa antioxidante dos peixes. Dada a crescente disponibilidade comercial de aminoácidos e alimentos para suplementação alimentar, os aminoácidos apresentam potencial nutracêuticos econômicos para melhorar a saúde de peixes (LI et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ABE, H. (2000). Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. **Biochemistry (Moscow)**. Translated from Biokhimiya, v. 65, No. 7, p. 891-900.
- ABIDI, S. F.; KHAN, M. A. (2007). Dietary leucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). **Aquaculture Research**. v. 38, p. 478–486.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**. v. 124, p. 783–801.
- AKIYAMA, T.; MURAI, T.; MORI, K. (1986). Role of tryptophan metabolites in inhibition of spinal deformity of *Chum salmon* fry caused by tryptophan deficiency. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 52 p. 1255-1259.
- AMANO, M.; IIGO, M.; IKUTA, K.; KITAMURA, S.; OKUZAWA, K.; YAMADA, H.; YAMAMORI, K. (2004). Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male *Masu salmon*. **Zoological Science**, v. 24 p. 79–85.
- ANDERSEN, S. M.; HOLEN, E.; AKSNES, A.; RONNESTAD, I.; ZERRAHN, J. E.; ESPE, M. (2013). Dietary arginine affects energy metabolism through polyamine turnover in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Br J Nutr*, 110(11), 1968-77 (2013)
- ANDERSEN, S. M.; WAAGBO, R.; ESPE, M. (2016). Functional amino acids in fish nutrition, health and welfare. **Frontiers in Bioscience (Elite edition)**. v. 8, p. 143–169.
- ANDERSON, D. P. (1974). Fish Immunology: Book 4. Neptune City: **T.F.H.Publications**, 239p.
- ATMACA, G. (2004). Antioxidant effects of sulfurcontaining amino acids. **Yonsei Medical Journal**. v. 45, p. 776-788.
- AZEREDO, R.; SERRA, C. R.; OLIVA-TELES, A.; COSTAS, B. (2017). Amino acids as modulators of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*, innate immune response: an in vitro approach. **Scientific Reports**. v. 7:18009, p. 1-12.
- BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. (2001). Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and Fish Health**, New York: Haworth Press, p. 213-225.
- BARREIROS A. L. B. S.; DAVID J. M.; DAVID J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123.
- BAYNE, C. J.; GERWICK, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 725-743.
- BELLIA, F.; AMORINI, A. M.; La MENDOLA, D.; VECCHIO, G.; TAVAZZI, B.; GIARDINA, B.; DI PIETRO, V.; LAZZARINO, G.; RIZZARELLI, E. (2008). New glycosidic derivatives of histidine-containing dipeptides with antioxidant properties and resistant to carnosinase activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 373-80.
- BENDER, A. E. (1965). The balancing of amino acid mixtures and proteins. **Proceedings of the nutrition society**, v. 24, p. 190-196.
- BERTOK, L. (1998). Endotoxins and endocrine system. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, p. 305-308.
- BRECK, O.; BJERKAS, E.; CAMPBELL, P.; ARNESEN, P.; HALDORSEN, P.; WAAGBO, R. (2003). Cataract preventative role of mammalian blood meal, histidine, iron and zinc in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of different strains. **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 341-350.

- BRODY, T. Classification of biological structure. (1999). In; **Nutritional Biochemistry, Second Edition**. San Diego, CA: Academic Press. p. 1-56.
- BUENTELLO, J. A.; GATLIN, D. M. (1999). Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. **Aquaculture**, v. 179, p. 513–521.
- CLOSS, E. I.; SCHELD, J. S.; SHARAFI, M.; FORSTERMANN, U. (2000) Substrate supply for nitric oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. **Molecular Pharmacology**. v. 57, p. 68–74.
- CONGLETON, J.; WAGNER, E. (1991). Acute-phase hypoferremic response to lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98A, n. 2, p. 195-200.
- CYRINO, J. E. P.; CONTE, L.; CASTAGNOLLI, M. C. (2002). **Mini-curso: criação de peixes em tanques-rede**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA. 12. São Paulo: ABRAq. 60p.
- DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. (1997). Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticulo endothelial system (RES). **Journal of fish Diseases**, v. 20, p. 241-273.
- DEVLIN, T. M. (2003). **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 5.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1084p.
- DY, M.; SCHNEIDER, E. (2004). Histamine–cytokine connection in immunity and hematopoiesis. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 15, p. 393–410.
- EDDY, F. B. (2005). Role of nitric oxide in larval and juvenile fish. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**. v. 142, p. 221-230.
- ESPE, M; HOLEN, E. (2013). Taurine attenuates apoptosis in primary liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **British Journal of Nutrition**. v. 110, p. 20-28.
- FANG, Y.Z.; YANG, S. & WU, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872–879.
- FOSTER, I.; OGATA, H.Y. (1998). Lysine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and juvenile red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v.161, p.131-142.
- FRACALOSSI, D. M.; RODRIGUES, A. P. O.; SILVA, T. S. C.; CYRINO J. E. P. (2012) Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: Fracalossi DM, Cyrino JEP. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. 1ª ed. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. p. 37-63.
- FRIDOVICH, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 893, p. 13-18.
- FURUYA, W. M.; SANTOS, V. G.; SILVA, L. C. R.; FURUYA, V. R. B.; SAKAGUTI, E. S. (2006) Exigências de lisina digestível para juvenis de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p.937-942.
- FURUYA, W. M. (2010). **Tabelas brasileiras para nutrição de Tilápias**. 21 ed. Toledo: GFM. 100 p.
- GARCEZ, M.; BORDIN, D.; PERES, W.; SALVADOR, M. (2004) Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Ulbra, Canoas. p. 13-33.
- GAYLORD, T. G.; RAWLES, S. D.; DAVIS, K. B. (2005). Dietary tryptophan requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 367–371.

- GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; TACHIBANA, L.; ROSA, M. J. A.; GUIMARÃES, I. G. (2009). Relação lisina digestível:proteína digestível em rações para tilápias-do-nylo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2299-2305.
- HA, N.; GONÇALVES, A. F. N.; SOUSA, L. C.; BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S. (2017). Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation. **Aquaculture International**, v. 25, p. 755-776.
- HALLIWELL B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623.
- HALVER, J. E.; SHANKS, W. E. (1960). Nutrition of Salmonids fishes. VIII Indispensible amino acids for sockeye salmon. **The Journal of Nutrition**, v. 72, p. 340-346.
- HINE, P.; WAIN, J. (1988). Characterization of inflammatory neutrophils induced by bacterial endotoxin in the blood of eels, *Anguilla australis*. **Journal of Fish Biology**, v. 32, p. 579-592.
- HOBART, L. J.; SEIBEL, I.; YEARGANS, G. S.; SEIDLER, N. W. (2004). Anti-crosslinking properties of carnosine: Significance of histidine. **Life Sciences**. v. 75, p. 1379-1389.
- HU, K.; FENG, L.; JIANG, W.; LIU, Y.; JIANG, J.; LI, S.; ZHOU, X. (2014). Oxidative damage repair by glutamine in fish enterocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 1437-1445.
- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489-2491.
- IWAMA, G. K., A. D. PICKERING, J. P. SUMPTER, AND C. B. SCHRECK. (1997). Fish stress and health in aquaculture. **Society for Experimental Biology Seminar Series**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. v. 62, 288p.
- JIANG, J.; SHI, D.; ZHOU, X. Q.; HU, Y.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, W. D.; ZHAO, Y. (2015). In vitro and in vivo protective effect of arginine against lipopolysaccharide induced inflammatory response in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 42, p. 457-464.
- JONES, A. L.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. (2005) Histidine-rich glycoproteins: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, p. 106-118.
- KETOLA, H. C. (1983). Requirement for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 101-107.
- KIM, K. I.; KAYES, T. B.; AMUNDSON, C. H. (1992). Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 101, p. 95-103.
- KIM, S. W.; MATEO, R. D.; YIN, Y. L.; WU, G. (2007) Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 20, p. 295-306.
- KUANG, S. Y.; XIAO, W. W.; FENG, L.; JIANG, J.; JIANG, W. D.; HU, K.; LI, S. H.; TANG, L.; ZHOU, X, Q. (2012). Effects of graded levels of dietary methionine hydroxy analogue on immune response and antioxidant status of immune organs in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, p. 629-636.
- KUBITZA, F. (1999) **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. Jundiaí: F. Kubitza, Editora: Acqua Supre - Equipamentos e Suprimentos para Aquicultura. 123p.

- LEE, J. W.; MIYAWAKI, H.; BOBST, E. V.; HESTER, J. D.; ASHRAF, M.; BOBST, A. M. (1999). Improved functional recovery of ischemic rat hearts due to singlet oxygen scavengers histidine and carnosine. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, p. 113-121.
- LI, P.; KANGSEN, M.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Review Article. **Amino Acids**, v. 37, p. 43-53.
- LI, P.; YIN, Y.; LI, D.; KIM, W. K.; WU, G. (2007). Amino acids and immune function. **The British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 237-252.
- LIN, Y.; ZHOU, X. (2006). Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture**, v. 256, p. 389-394.
- LUNDSTEDT, L. M.; RODRIGUES, A. P. O.; MORO, G. V. (2016). Manejo nutricional em piscicultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pesca e Aquicultura. In: Lundstedt LM. **Produção animal e recursos hídricos**. EMBRAPA. Cap. 10, p. 145-162.
- MAGNADOTTIR, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151.
- MAI, K.; ZHANG, L.; AI, Q.; DUAN, Q.; ZHANG, C.; LI, H.; WAN, J.; LIUFU, Z. (2006). Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 258, p. 535-542.
- MATKOVICS, B.; NOVÁK, R.; HANH, H. D.; SZABÓ, L.; VARGA, S. I.; ZALESNA, G. (1977). A comparative study of some more important animal peroxide metabolism enzymes. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 56, p. 31-34.
- MOMMSEN, T. P.; FRENCH, C. J.; HOCHACHKA, P. W. (1980). Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. **Canadian Journal of Zoology**, v. 58, p. 1785-1799.
- NAGASAWA, T.; YONEKURA, T.; NISHIZAWA, N.; KITTS, D. D. (2001) *In vitro* and *in vivo* inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 225, p. 29-34.
- NAIR, K. S.; SCHWARTZ, R. G.; WELLE, S. (1992). Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. **The American Journal of Physiology**, v. 263, p. 928-934.
- NOSE, T. (1979). Summary report on the requirements of essential amino acids for carp. In: Halver JE and Tiews K (ed) **Finfish nutrition and fish feed technology**, vol 1. Berlin, Germany, Heenemann GmbH, p. 145-156.
- NRC (National Research Council). (2011). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. **Animal Nutrition Series**. Washington.
- OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. (2010). Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1333-1342.
- PEDROSO, J. A. B.; NISHIMURA, L. S.; DE MATOS-NETO, E. M.; TIRAPEGUI, J. (2014). Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 32, p. 326-332.
- PEIXE BR. (2019) Anuário Peixe BR da Piscicultura. São Paulo: **Associação Brasileira de Piscicultura**, 148 p.
- PEREIRA, C. V.; LEBIEDZINSKA, M.; WIECKOWSKI, M. R.; OLIVEIRA, P. J. (2012). Regulation and protection of mitochondrial physiology by sirtuins. **Mitochondrion**, v. 12, p. 66-76.

- PERIANAYAGAM, M. C.; OXENKRUG, G. F.; JABER, B. L. (2005) Immune-modulating effects of melatonin, N-acetylserotonin, and N-acetyldopamine. **Annals of The New York Academy of Sciences**. v. 1053, p. 386–393.
- PERNOW, J.; JUNGM, C. (2013). Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? **Cardiovascular Research**. v. 98, p. 334-343.
- PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M. 2009 Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 43–51.
- RADI, A. A. R., HAI, D. Q., MATKOVICS, B; GABRIELAK, T. (1985). Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behavior. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 81, p. 395-399.
- RADI, A. A. R., MATKOVICS, B., & CSENGERI, I. (1987). Comparative studies of the phospholipid fatty acids and the antioxidant enzyme activities in fish with different feeding habits. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 49-54.
- REMO, S. C.; OLSVIK, P. A.; TORSTENSEN, B. E.; AMLUND, H. BRECK, O. WAAGBO, R. (2011). Susceptibility of *Atlantic salmon* lenses to hydrogen peroxide oxidation ex vivo after being fed diets with vegetable oil and methylmercury. **Experimental Eye Research**, v. 92, p. 141-224.
- ROBERTSEN, B. (1999). Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p. 269-290.
- RODEHUTSCORD, M.; BECKER, A.; PACK, M.; PFEFFER, E. (1997). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. **The Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1166-1175.
- ROLLIN, X.; MAMBRINI, M.; LARONDELLE, Y.; KAUSHIK, S. J. (2003). The optimum dietary indispensable amino acid pattern for growing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 865-876.
- RUDNEVA, I. I. (1997). Blood antioxidant system of *Black sea* elasmobranch and teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 255-260.
- SAKAI, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92.
- SAKAMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. (2007) Método dose-resposta para determinar exigências nutricionais. Cap. 5. In: **Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos**. Fundação de Apoio e Pesquisa, Ensino e Extensão, FUNEP, Jaboticabal, 283 p.
- SCHIRMER, H.; PEREIRA, T. C. B.; RICO, E. P.; ROSEMBERG, D. B.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R.; SOUTO, A. A. (2012). Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1 alpha and NAMPT gene expression profiles in wildtype adult zebrafish liver. **Molecular Biology Reports**. v. 39, p. 3281-3289.
- SHAMUSHAKI, V. A. J.; KASUMYAN, A. O.; ABEDIAN, A.; ABTAHI, B. (2007). Behavioural responses of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) juveniles to free amino acid solutions. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 40, p. 219–224.
- SHEPHERD, J. (1992). Fish health and disease. In: SHEPHERD, J.; BROMAGE, N.R. (Ed). **Intensive fish farming**. Oxford: Blackwell Science; p.198-238.
- SHI, W.; MEININGER, C. J.; HAYNES, T. E.; HATAKEYAMA, K.; WU, G. (2004). Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**. v. 41, p. 415–433.

- SHI, Y. Q.; SUN, Y. X.; LUO, L.; JING, T.; CHEN, Y. J.; WEN, H. (2014). Dietary leucine requirement of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 1040-1046.
- SINDERMANN, C. (1990). Mechanisms of internal defense. In: SINDERMANN, C. (Ed). **Principal Diseases of Fish and Shellfish**, 2 ed. San Diego Academic Press, v.1, p. 217-255.
- SNYDER, G. S.; GAYLORD, T. G.; BARROWS, F. T.; HARDY, R. W. (2008). Carnosine supplementation on an all-plant protein diet for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 08, p 369.
- SOUSA, L. C.; MOROMIZATO, B. S.; ALMEIDA, V. N. S.; MIASAKI, C. T.; TAKAHASHI, L. S.; BILLER, J. (2020). There is more than one way of feeding carnivorous fish: surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) are able to cope with carbohydrates rich diets, but there is a trade-off between growth and immunity. **Animal Feed Science and Technology**. v. 262, p. 1-9.
- SZEBEDINSZKY, C., GILMOUR, K. M. (2002). The buffering power of plasma in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 171–183.
- TANAKA, S.; ICHIKAWA, A. (2006). Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: immune regulatory roles of histamine produced by leukocytes. **Journal of Pharmacological Science**, v. 101, p. 19–23.
- TEIXEIRA, E. A.; CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; RIBEIRO, L. P.; MELO, D. C.; CASTRO, A. C. (2008). Composição corporal e exigências nutricionais de aminoácidos para alevinos de tilápia (*Oreochromis sp.*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 239-246.
- WADE, A. M.; TUCKER, H. N. (1998). Antioxidant characteristics of L-histidine. The **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 308-315.
- WALTON, M. J.; COLOSO, R. M.; COWEY, C. B.; ADRON, J. W.; D. KNOX. (1984). The effect of dietary tryptophan levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **The British Journal of Nutrition**. v. 51, p. 279-287.
- WANG, T. C.; FULLER, M. F. (1989). The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. **The British Journal of Nutrition**, v. 62, p. 77-89.
- WANG, B., LI, Q. (2011). Advances in leucine metabolism, nutritional and physiological function research. **Feed Research**, v. 01, p. 14 –16.
- WHITE, A.; ARTHUR, J.; FLETCHER, T. (1984). Distribution of endotoxin and its effect on serum concentration of C reactive protein and cortisol in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 79, p. 97-101.
- WILLIAMS, D. L. (2006). Oxidation, antioxidants and cataract formation: a literature review. **Veterinary Ophtamology**. v. 9, p. 292-298.
- WILSON, R. P.; ALLEN, O. W. JR.; ROBINSON, E. H.; POE, W. E. (1978). Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish. **The Journal of Nutrition**. v. 108, p. 1595-1599.
- WILSON, R. P. (2002). Protein and amino acids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) **Fish Nutrition**. Elsevier Science, San Diego, USA, p. 144-179.
- WILSON, R. P. (2003). Amino acid requirements of finfish and crustaceans. In: **Amino Acids in Animal Nutrition**, 2nd ed., (JPF D'Mello, editor). Wallingford, Oxon: CAB International, p. 427-447.
- WU, G.; MEININGER, C. J. (2002). Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. **Annual Review of Nutrition**. v. 22, p. 61–86.
- WU, G. (2013) *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*. Florida: CRC Press. 503 p.

WU, X., (2014). Effects of leucine on growth performance and immune of juvenile Jian carp *Cyprinus carpio* var Jian. **Sichuan Agricultural University Thesis**, p. 30 –49.

WU, Y.; ZHANG, L.; TENG, T.; SUN, R.; WANG, W.; WANG, Y.; MI, H. (2018). Effect of Dietary Tryptophan Levels on Growth and Hemato-Immunological Parameters in Juvenile Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. **The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**, IJA_70.1519, 10 pages.

ZHOU, X. (2005). Use of synthetic lysine in fish feeds: a review on research and application. **Feed Indian Aquafeed**. v. 27, p. 1–7.

CAPÍTULO II: Deficiência de aminoácidos essenciais em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): modulação do sistema imune e sistema antioxidante enzimático.

RESUMO

O balanço ideal de aminoácidos essenciais na dieta possibilita melhor utilização da proteína, crescimento, eficiência alimentar e contribui para a ativação dos mecanismos de resposta imunológica e defesas antioxidantes enzimáticas. Objetivou-se avaliar a influência da deficiência de aminoácidos essenciais em dietas para tilápias em fase de terminação no sistema imunológico e oxidativo. Foram utilizadas 264 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) com peso médio inicial de 624,2 g, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com 11 dietas experimentais e três repetições cada. Foi elaborada uma dieta controle com níveis de aminoácidos essenciais (AAE) atendendo a exigência da espécie, e mais 10 dietas deficientes em cada um dos aminoácidos essenciais (lisina, metionina, treonina, triptofano, arginina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina). As dietas foram oferecidas por 60 dias, ate saciedade aparente em três refeições ao dia. Os parâmetros imunológicos avaliados foram à atividade respiratória de leucócitos, atividade da lisozima e do sistema complemento. Como indicadores do sistema oxidativo foram avaliados a atividade hepática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Foi observado que animais que receberam as dietas deficientes em valina, isoleucina, leucina, lisina, metionina e triptofano apresentaram maior atividade respiratória de leucócitos. A deficiência em lisina resultou em menor de atividade da lisozima e complemento. Somente o tratamento com deficiência de treonina apresentou maior atividade da SOD comparado à dieta controle. Não foram observadas diferenças significativas nas atividades da CAT e GPx. Em conclusão, a deficiência de alguns aminoácidos essenciais relacionados a diversas vias metabólicas afetam diretamente o equilíbrio do estado oxidativo e do sistema imune de tilápias em terminação.

Palavras-chave: imunidade, radical livre, enzimas, dieta proteica.

ABSTRACT

The ideal balance of essential amino acids in the diet enables better use of protein, growth, feeding efficiency and contributes to the activation of immune response mechanisms and enzymatic antioxidant defenses. The objective of this study was to evaluate the influence of essential amino acid deficiency in diets for tilapia in the process of termination in the immune and oxidative system. 264 Nile tilapia (*O. niloticus*) with an initial average weight of 624.2 g were used, distributed in a completely randomized design of 11 experimental diets, with three repetitions each. A control diet was prepared with levels of essential amino acids to meet the requirement of the species, and 10 more diets deficient in each of the essential amino acids (lysine, methionine, threonine, tryptophan, arginine, histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and valine). The diets were offered for 60 days, until apparent satiety in three meals a day. The immunological parameters evaluated were leukocyte respiratory activity, lysozyme activity and the complement system. As indicators of the oxidative system, liver activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were evaluated. It was observed that animals that received diets deficient in valine, isoleucine, leucine, lysine, methionine and tryptophan showed higher leukocyte respiratory activity. Lysine deficiency had the lowest rate of lysozyme activity and complement. Only treatment with threonine deficiency showed greater SOD activity compared to the control diet. There were no significant differences in the activities of CAT and GPx. In conclusion, the deficiency of some essential amino acids regulated by several metabolic pathways directly affects the balance of the oxidative state and the immune system of terminating tilapia.

Keywords: immunity, free radical, enzymes, protein diet.

INTRODUÇÃO

Os aminoácidos e seus derivados desempenham papéis importantes e versáteis na nutrição e metabolismo dos peixes. Estas funções incluem sinalização celular (arginina, glutamina, leucina, prolina e poliaminas) (HYNDMAN et al., 2006); estimulação do apetite (alanina, glutamato, prolina e serina) (SHAMUSHAKI et al., 2007); regulação do crescimento e desenvolvimento (arginina, glutamina, hidroxiprolina, leucina) (AKSNES et al., 2008); utilização de energia (óxido nítrico e carnitina) (GARG, 2007); imunidade (óxido nítrico, arginina, glutamina e dopamina) (BUENTELLO e GATLIN, 1999); osmorregulação (glicina, taurina, β -alanina e arginina) (TAKEUCHI, 2007); desintoxicação de amônia (glutamato, glutamina e citrulina) (ANDERSON et al., 2002); defesa antioxidante (glutathione, cisteína, glutamina, glicina e taurina) (WU et al., 2004) e respostas ao estresse (triptofano, serotonina e glutamina) (DAMASCENO-OLIVEIRA et al., 2007).

A suplementação dietética de aminoácidos (AA) e a modulação do metabolismo podem fornecer novas estratégias para desenvolver rações balanceadas que possam maximizar o desempenho e a saúde dos peixes, sem ocasionar impactos ambientais na aquicultura, melhorando a rentabilidade da cadeia produtiva. Evidências convincentes mostram que a suplementação dietética de L-lisina, DL-metionina, treonina e triptofano para compensar suas deficiências nos alimentos vegetais apresentam alta relação custo-efetiva para muitas espécies de peixes (LI et al., 2008).

Existe uma série de dificuldades técnicas no uso de AA cristalinos em dietas de peixes e outros animais aquáticos. A principal preocupação é a degradação desses AA no meio aquático, bem como sua deterioração por enterócitos e / ou microbiota do trato gastrointestinal (WU, 1998). Diferenças na taxa de absorção intestinal entre AA sintéticos e AA ligados a proteínas podem reduzir a eficiência dos AA cristalinos (MURAI et al., 1982).

Por outro lado, a deficiência de proteína na dieta reduz as concentrações da maioria dos aminoácidos no plasma (WU et al., 1999) e compromete vários sistemas fisiológicos, como o imunológico, o que torna o balanço nutricional da dieta muito mais relevante. Desta forma, há um interesse crescente no estudo do papel dos aminoácidos na função imune dos peixes e outras espécies (LI et al., 2007). O balanço adequado de AA aumenta a capacidade de aproveitamento da dieta com menor teor de proteína, contribuindo para a redução da excreção nitrogenada no ambiente (QUADROS et al., 2009). Além disso, o ajuste de aminoácidos essenciais em dietas

para peixes conforme suas necessidades nutricionais específicas, como espécie, fase de desenvolvimento e hábito alimentar, otimiza a formulação de dietas equilibradas que proporcionem máximo desempenho e saúde aos peixes (OLIVA-TELES, PERES e KAUSHIK, 2017). Neste sentido, o objetivo do trabalho foi determinar a relação dos aminoácidos limitantes na dieta nas defesas antioxidantes enzimáticas e imunes em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em fase de terminação.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Instalações e manejo

O estudo foi conduzido no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (Unesp) “Júlio de Mesquita Filho”, no campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O período experimental foi de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018 no Laboratório de Modelagem em Nutrição de Peixes, do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), totalizando 60 dias experimentais. As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios de Nutrição e Metabolismo Animal (LANUMA) e Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT), da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), Unesp, campus de Dracena. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) do CAUNESP (Protocolo número 009999/14).

No período experimental, os peixes ficaram alojados em um sistema fechado de recirculação de água, equipado com filtragem mecânica e biológica, trocador de calor e aeração. Cada caixa de polietileno do sistema possui a capacidade para 1000 L. Antes de iniciar o experimento, os animais passaram por adaptação às condições laboratoriais por um período de 14 dias recebendo ração comercial. Após esse período, as dietas experimentais foram fornecidas 3 vezes ao dia (8h00, 13h00 e 18h00) até saciedade aparente. Para garantir a qualidade da água, a matéria orgânica depositada no fundo das caixas foi retirada pelo método de sifonagem.

2. Delineamento e dietas experimentais

Os tratamentos consistiram em 11 dietas experimentais, com três repetições cada distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado. Foram utilizadas 264 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) com peso médio inicial de 624,2 g, totalizando 33 caixas (8 peixes/caixa). Ao final de 60 dias de alimentação, foi realizada biometria dos peixes e coleta de material biológico. Para a formulação das dietas, os ingredientes foram previamente analisados quanto aos níveis de matéria seca, proteína bruta, aminoácidos, lipídios, matéria mineral e energia bruta (AOAC, 2000). Com auxílio do software SuperCrac 6.1 Premium, baseado nas exigências nutricionais para tilápia descritas por Furuya (2010), foram formuladas 11 dietas experimentais, uma dieta controle e 10 dietas com redução de 45% de cada um dos aminoácidos essenciais (LYS, MET, THR, TRP, ARG, HIS, ILE, LEU, PHE e VAL) (Tabela 5). Com exceção do

aminoácido essencial retirado, todos os demais aminoácidos essenciais foram suplementados (AA cristalino), assim como os demais nutrientes com a finalidade de atender as mesmas concentrações da dieta controle. Para manter a mesma quantidade de nitrogênio na dieta controle, fez-se necessária a suplementação de três aminoácidos não essenciais: L-ácido glutâmico, L-alanina e L-glicina (Tabela 6).

Foi feito um revestimento com 1% de ágar nos aminoácidos cristalinos antes de serem misturados aos demais ingredientes da dieta. Os ingredientes foram homogeneizados em misturador “Y” com capacidade para 100 kg e finalmente moídos com a utilização de um moinho centrífugo simples. As dietas foram extrusadas e secas em estufas de circulação de ar forçada a 55°C por 12 horas. Depois de prontas, foram mantidas em câmara fria (-15°C) até a utilização.

Tabela 5. Formulação (g/kg) das dietas experimentais com base na matéria natural.

Ingredientes (g/kg)	DC	ARG	PHE	HIS	ILE	LEU	LYS	MET	THR	TRP	VAL
Farinha de Peixe	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80	63,80
Farinha de carne e ossos	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00
Farelo de soja	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70	40,70
Milho	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4	141,4
Amido de milho	283,8	277,9	284,1	282,1	285,1	284,4	283,7	284,6	284,9	284,0	284,6
Farelo de trigo	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25	74,25
Quirera de arroz	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10	45,10
Óleo de soja	68,35	68,15	69,35	68,35	68,45	68,85	68,35	68,35	68,35	68,35	68,35
Celulose purificada	26,05	26,05	26,05	26,05	25,65	26,05	26,05	26,05	26,05	26,05	26,05
Fosfato bicálcico	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03	14,03
Calcário	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40	21,40
Sal comum	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Antifúngico	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Antioxidante	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
Ágar-ágar	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Suplemento mineral e vitamínico*	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Aminoácidos essenciais											
L-arginina	6,71	1,53	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71	6,71
L-fenilalanina	4,76	4,76	1,35	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76	4,76
L-histidina	3,15	3,15	3,15	1,02	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15
L-isoleucina	6,10	6,10	6,10	6,10	2,28	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10
L-leucina	4,18	4,18	4,18	4,18	4,18	0,00	4,18	4,18	4,18	4,18	4,18
L-lisina	13,34	13,34	13,34	13,34	13,34	13,34	5,38	13,34	13,34	13,34	13,34
DL-metionina	3,48	3,48	3,48	3,48	3,48	3,48	3,48	1,34	3,48	3,48	3,48
L-treonina	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	8,55	3,63	8,55	8,55
L-triptofano	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09	0,85	2,09
L-valina	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	4,72	1,22
Aminoácidos não essenciais											
L-ácido glutâmico	43,10	46,88	43,75	44,41	44,04	44,13	45,8	43,55	44,4	43,47	44,03
L-alanina	43,10	46,88	43,75	44,41	44,04	44,13	45,8	43,55	44,4	43,47	44,03
L-glicina	43,10	46,88	43,75	44,41	44,04	44,13	45,8	43,55	44,4	43,47	44,03

DC = dieta controle; ARG = arginina; PHE = fenilalanina; HIS = histidina; ILE = isoleucina; LEU = leucina; LYS = lisina; MET = metionina; THR = treonina; TRP = triptofano; VAL = valina.

*Suplemento mineral e vitamínico: ácido fólico (1.250 mg); pantotenato de cálcio (1.200 mg); cobre (2.500 mg); ferro (15 g); iodo (375 mg); manganês (12,5 g); selênio (87,5 mg); zinco (12,5 mg); cobalto (125 mg); Vit A (2.500 U I); Vit B12 (4000 mg); Tiamina B1 (4000 mg); Riboflavina B2 (4000 mg); Piridoxina B6 (4000 mg); Vit C (50.000 mg); Vit D3 (600.000 UI); Vit E (37.500); Vit K3 (3.750 mg); niacina (122.500 mg); biotina (15 mg).

Tabela 6. Composição química calculada (g/kg) com base na matéria seca das onze dietas experimentais.

Composição Calculada¹ (g/kg)	DC	ARG	PHE	HIS	ILE	LEU	LYS	MET	THR	TRP	VAL
Matéria seca	938,1	956,4	951,5	953,2	952,2	956,9	958,3	952,7	952,5	944,8	948,3
Proteína bruta	270,0	264,8	266,2	265,7	265,9	264,7	264,2	265,8	265,9	268,0	267,1
Proteína digestível ²	259,1	254,1	255,4	255,0	255,2	254,0	253,6	255,1	255,2	257,2	256,3
Extrato etéreo bruto	89,76	87,83	89,54	88,33	88,53	88,51	87,86	88,38	88,40	89,12	88,79
Extrato etéreo digestível ²	74,73	73,1	74,55	73,53	73,69	73,69	73,13	73,56	73,58	74,18	73,91
Energia bruta (MJ ⁻¹)	16,45	16,43	16,43	16,45	16,4	16,41	16,41	16,43	16,44	16,43	16,41
Energia digestível (MJ ⁻¹)	13,1	13,11	13,07	13,1	13,05	13,05	13,06	13,07	13,08	13,08	13,06
Extrato não nitrogenado ³	444,7	430,7	438,9	436,0	439,3	436,5	435,2	438,6	438,9	441,6	440,5
Fibra bruta ⁴	39,5	38,74	38,94	38,87	38,58	38,72	38,66	38,89	38,90	39,22	39,07
Matéria Mineral	66,71	65,43	65,77	65,65	65,72	65,4	65,3	65,69	65,70	66,24	65,99
Cálcio total ⁵	13,01	12,76	12,83	12,8	12,82	12,75	12,74	12,81	12,81	12,92	12,87
Fósforo disponível ⁵	6,57	6,44	6,47	6,46	6,47	6,44	6,43	6,46	6,47	6,52	6,49
Aminoácidos essenciais											
Arginina total	12,69	7,11	12,51	12,48	12,50	12,44	12,42	12,49	12,49	12,6	12,55
Fenilalanina total	8,42	8,26	4,73	8,29	8,30	8,26	8,24	8,29	8,29	8,36	8,33
Histidina total	5,22	5,12	5,15	2,94	5,15	5,12	5,11	5,14	5,14	5,19	5,17
Isoleucina total	9,38	9,2	9,25	9,23	5,25	9,2	9,18	9,24	9,24	9,31	9,28
Leucina total	10,55	10,35	10,40	10,39	10,40	6,06	10,33	10,39	10,39	10,48	10,44
Lisina total	15,14	14,85	14,92	14,9	14,914	14,84	8,35	14,91	14,91	15,03	14,97
Metionina total	5,22	5,12	5,15	5,14	5,15	5,12	5,11	2,94	5,14	5,19	5,17
Treonina total	11,94	11,71	11,77	11,75	11,76	11,7	11,69	11,76	6,72	11,85	11,81
Triptofano total	2,98	2,93	2,94	2,94	2,94	2,93	2,92	2,94	2,94	1,69	2,95
Valina total	8,63	8,47	8,51	8,50	8,51	8,46	8,45	8,5	8,5	8,557	4,96
Aminoácidos não essenciais											
Ácido glutâmico total	46,05	49,03	46,03	46,63	46,30	46,16	47,82	45,76	46,66	46,06	46,48
Glicina total	46,05	49,03	46,03	46,63	46,30	46,16	47,82	45,76	46,66	46,06	46,48
Alanina total	46,05	49,03	46,03	46,63	46,30	46,16	47,82	45,76	46,66	46,06	46,48

DC = dieta controle; ARG = arginina; PHE = fenilalanina; HIS = histidina; ILE = isoleucina; LEU = leucina; LYS = lisina; MET = metionina; THR = treonina; TRP = triptofano; VAL = valina.

¹ Composição calculada com base em análise pelo NIRS dos alimentos utilizados na formulação das dietas.

² Valores digestíveis calculados segundo coeficientes determinados por Furuya (2012).

³ Extrativo não nitrogenado ENN = MS - (PB+EE+MM+FB).

⁴ Fibra bruta calculada

⁵ Valores calculados a partir da composição química dos ingredientes segundo Rostagno et al. (2017) e Furuya (2010).

3. Coleta de material biológico

Ao final do experimento, no sexagésimo dia, os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 g/L) para coleta de sangue e fígado. A coleta do sangue foi realizada em três animais por caixa, totalizando nove animais por tratamento. A coleta de sangue foi realizada por meio da punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis. Seringas sem anticoagulante foram utilizadas e o sangue destinado à obtenção de soro foi utilizado para determinação da atividade de lisozima e atividade hemolítica do complemento. Para a obtenção de sangue total, microtubos com anticoagulante (heparina sódica) foram utilizados para armazenamento de sangue que foi destinado a determinação da atividade respiratória de leucócitos. Os mesmos animais foram destinados à coleta do fígado (armazenado em freezer -80°C) para análise das enzimas do sistema antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase).

4. Variáveis analisadas

4.1 Indicadores do sistema imune não específico

4.1.1 Atividade respiratória de leucócitos

Para análise da atividade respiratória de leucócitos foi seguido o protocolo de Biller-Takahashi et al. (2013). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “nitroblue tetrazolium” (NBT) que formam precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada em seguida e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetilformamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim provoca lise na parede celular dos leucócitos e dos grânulos de formazan liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

4.1.2 Atividade de lisozima

A determinação da atividade de lisozima foi baseada no método clássico de causar lise em uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS E HARTSELL, 1949). A lisozima tem capacidade de atuar sobre ligações β -1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico de membranas de parede celular bacterianas, levando a sua lise e consequente destruição do patógeno (PAULSEN et al., 2003).

A análise foi realizada por ensaio turbidimético, segundo Parry, Chandan e Shahani (1965) com adaptações. A partir da curva padrão determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Após a determinação de curva de calibração, todas as amostras de soro passaram por tratamento térmico (banho-maria à 56° C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *M. lysodeikticus* seja provocada exclusivamente por ação da lisozima.

Assim, 50 μ L soro (em triplicata) foram depositados em microplacas de acrílico estéreis de 96 cavidades, em 50 μ L de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2). Depois de homogeneizados, o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 μ L por cavidade. Em cada cavidade foi depositado 125 μ L de suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos à 30°C. Os resultados em concentração (μ g mL⁻¹ de amostra) foram obtidos a partir da redução da δ DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade (U mL⁻¹) foram determinados como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, um δ DO de 0,001 min⁻¹ (WON, KIM E PARK, 2004).

4.1.3 Atividade hemolítica do complemento - via alternativa

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com Biller-Takahashi et al. (2012). Uma alíquota de sangue total de carneiros foi misturada a um mesmo volume de solução de Alsever (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante filtrada em gaze estéril para retirada de material suspenso. Para a retirada total de outros componentes sanguíneos que não sejam os eritrócitos, foram realizadas

três lavagens do sangue de carneiro com tampão fosfato-salino (PBS), cada lavagem sendo feita uma centrifugação de 3000 rpm, por 10 min a 4° C. Os eritrócitos, após a última centrifugação, foram ressuspensos novamente no PBS na concentração de $2,8 \times 10^6$ cel mL⁻¹ e armazenados em geladeira.

Para determinar a atividade hemolítica do complemento, foi realizada uma série de diluições da amostra em microplacas de fundo V utilizando 40 µL de soro e 40 µL de tampão 'start' pH 7,3 (0,1% gelatina, 5 mM de sódio barbitúrico, 0,13 mM NaCl, 10 mM de MgCl₂ e 10 mM EGTA). Depois de realizadas às diluições da amostra, foi acrescentado na placa 10 µL de sangue a $2,8 \times 10^6$ cel mL⁻¹ e incubado em temperatura ambiente por 100 minutos, homogeneizando a cada 20 minutos. Após incubação, foi adicionado 150 µL do tampão 'stop' gelado pH 7,3 (0,1% gelatina, 5 mM de sódio barbitúrico, 0,13 mM NaCl e 20 mM EDTA). A microplaca foi centrifugada à 1000 rpm por 3 minutos e transferido 200 µL do sobrenadante para uma microplaca de fundo chato. A leitura da absorbância foi realizada a 414 nm em leitor de microplaca tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.2 Enzimas do sistema antioxidante

4.2.1 Processamento das amostras

As amostras de fígado foram inicialmente descongeladas para preparação de um homogenato na concentração de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização (Tris HCl 100mM, EDTA 0,1 mM e triton x-100 a 0,1%, pH 7,8). O homogenato foi preparado em um homogeneizador tipo Potter (Modelo NT 136 - Novatecnica®) a 600 rpm por aproximadamente 3 minutos cada amostra. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugados a 5000 rpm, por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4° C) (Allegra X-30R Centrifuge – Beckman Coulter®). Após centrifugação, os sobrenadantes foram separados em alíquotas para análise da atividade das enzimas do sistema antioxidante. No mesmo dia de preparo dos homogenatos, foi quantificada a concentração de proteína de cada amostra pelo método de Biureto em espectrofotômetro a 540 nm.

4.2.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade hepática da SOD (EC 1.15.1.1) foi medida pelo método do ferricitocromo C usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido. O coquetel de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, xantina a 0,1 mM, citocromo C a 0,013 mM e xantina oxidase a 0,024 UI mL⁻¹. Foram utilizados 180 µL de coquetel de reação, 10 µL de amostra e 10 µL de xantina oxidase para a realização da leitura da atividade enzimática. A atividade foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma inibição de 50% da taxa de redução do ferricitocromo C (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009). A atividade da SOD foi determinada pela absorbância de 550 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.2.3 Catalase (CAT)

A atividade hepática da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada medindo a diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio pela absorbância a 240 nm de acordo com Aebi (1984). O coquetel de reação consistiu em H₂O₂ 10,6 mM preparado no momento da utilização. Foram utilizados 10 µL de amostra e 190 µL de H₂O₂ para a realização da leitura da atividade enzimática. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato por minuto sob as condições analíticas descritas. A atividade da CAT foi determinada pela absorbância de 240 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

4.2.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade hepática da GPx (EC 1.11.1.9) foi medida seguindo o método de Pérez-Jiménez et al. (2009). A glutathiona na forma oxidada (GSSG) gerada pela GPx foi reduzida pela glutathiona redutase (GR) e a oxidação de NADPH foi monitorada pela absorbância a 340 nm. O coquetel de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,1), 3,6 mM de glutathiona reduzida (GSH), 3,6 mM de azida de sódio, 1 UI/mL de glutathiona redutase, 0,2 mM de NADPH e 1,2 mM de H₂O₂. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para transformar um substrato µmol por minuto, nas condições analíticas descritas. A atividade da GPx foi

determinada pela absorbância de 340 nm, à 25° C, em leitor de microplacas tipo ELISA (Thermo Scientific™ Multiskan GO Microplate Spectrophotometer).

5. Análises estatísticas

Após a tabulação dos dados, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando verificada diferença estatística, aplicou-se o teste de Tukey (5%) para comparação de média através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

RESULTADOS

1. Indicadores do sistema imune não específico

O tratamento deficiente em valina apresentou a maior atividade respiratória de leucócitos, não diferindo estatisticamente dos tratamentos deficientes em isoleucina, leucina, lisina, metionina e triptofano. A menor atividade foi observada nos tratamentos deficientes em histidina e treonina, juntamente com o controle. Em comparação à dieta controle, todos os demais tratamentos apresentaram aumento na atividade respiratória de leucócitos (Figura 3).

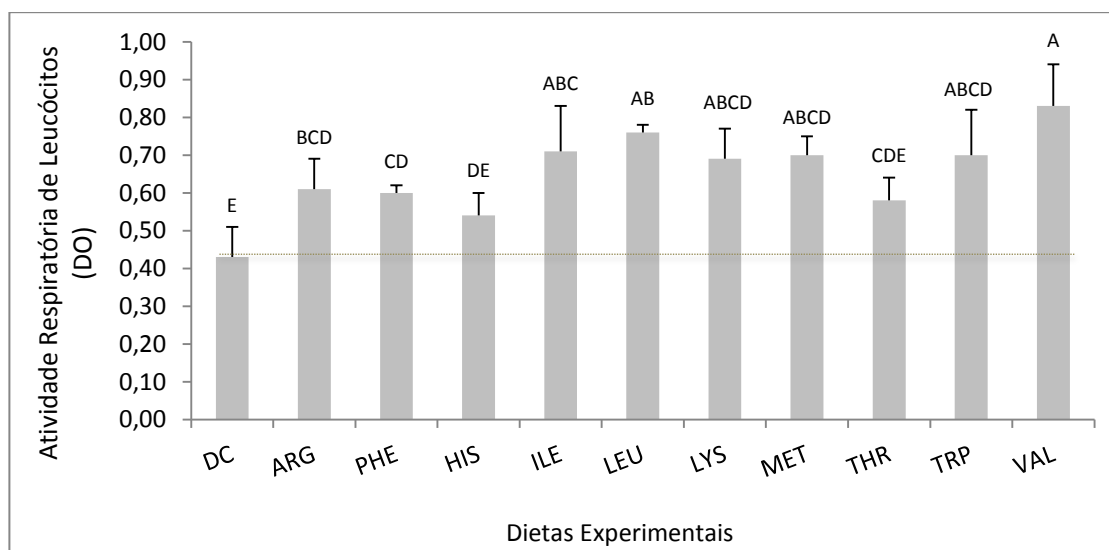


Figura 3. Atividade respiratória de leucócitos (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (*O. Niloticus*) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.

Diferenças estatísticas foram observadas na atividade da lisozima entre os tratamentos (Figura 4). A dieta deficiente em leucina apresentou maior atividade desta enzima importante no sistema imune dos peixes. Já os tratamentos deficientes em lisina e metionina, apresentaram as menores atividades da lisozima, mas sem apresentar diferenças estatísticas das dietas deficientes em arginina, fenilalanina, isoleucina, triptofano, e da dieta controle.

O tratamento deficiente em lisina também apresentou uma menor atividade hemolítica do sistema complemento (Figura 5), não diferindo das dietas controle e dietas deficientes em arginina, fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, triptofano e valina. As maiores atividades foram observadas nos tratamentos deficientes em histidina e treonina, mesmo não tendo sido significativamente diferentes dos demais tratamentos.

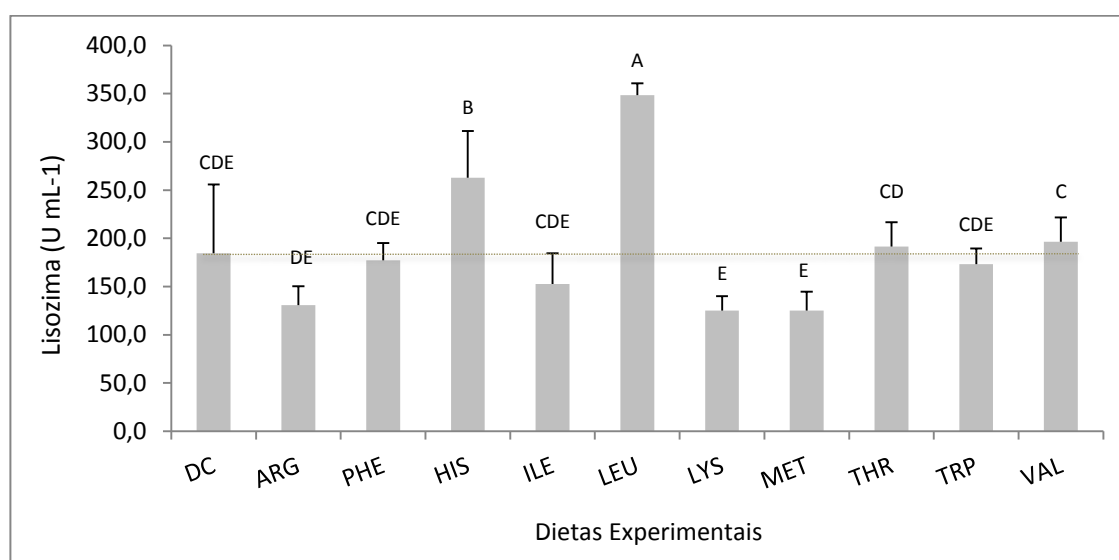


Figura 4. Atividade da lisozima (média ± EP, n=6) de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.

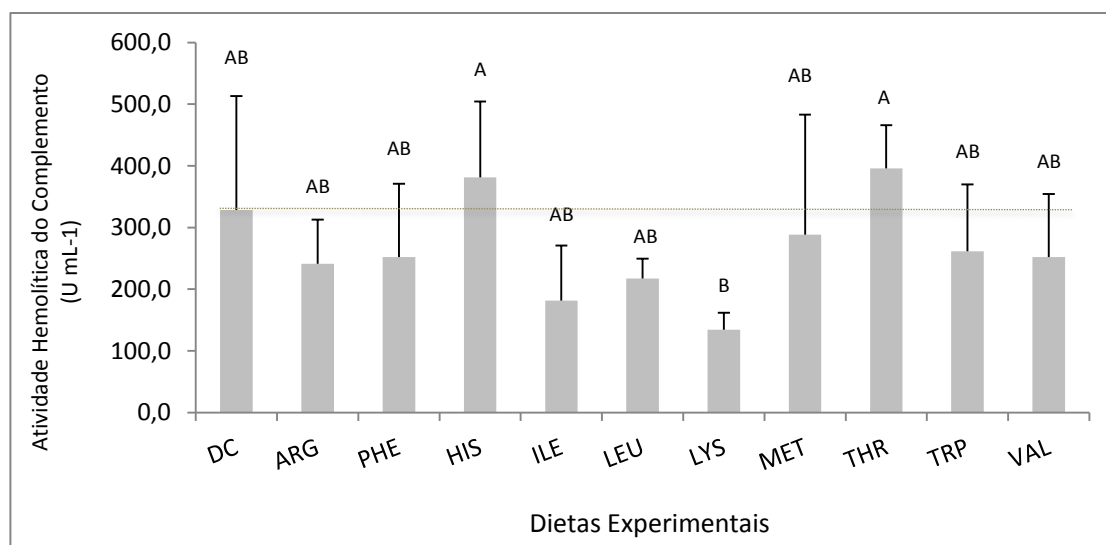


Figura 5. Atividade hemolítica do complemento (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.

2. Enzimas antioxidantes

Na atividade hepática das enzimas do sistema antioxidante não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para atividade da CAT e GPx (Figuras 8 e 9). O tratamento com deficiência de treonina apresentou maior atividade hepática da SOD (Figura 10) em comparação ao tratamento controle e deficiente em fenilalanina, não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

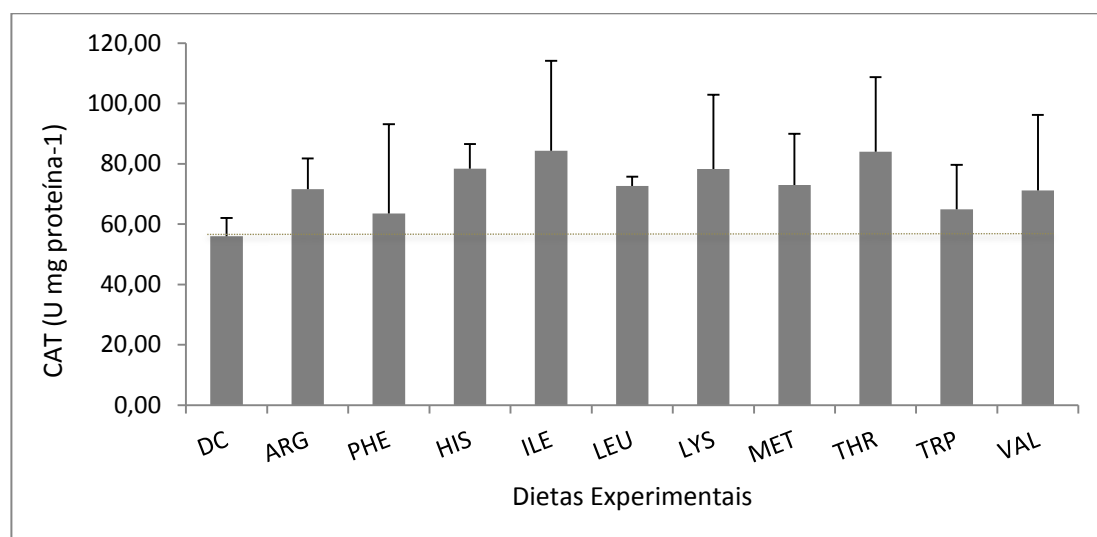


Figura 6. Atividade hepática da enzima catalase (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais.

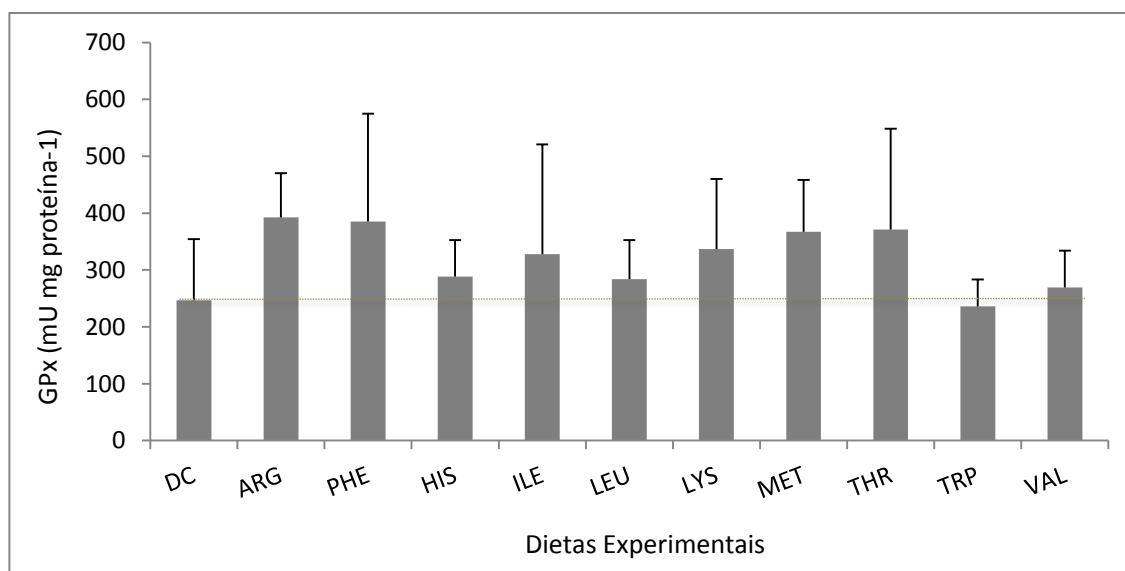


Figura 7. Atividade hepática da enzima glutatona peroxidase (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.

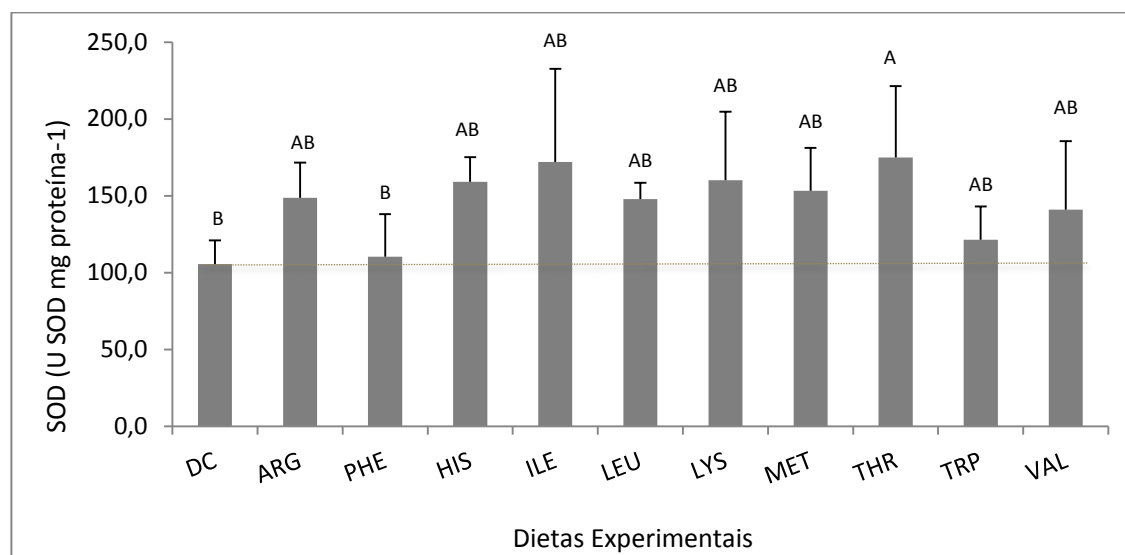


Figura 8. Atividade hepática da enzima superóxido dismutase (média $\pm$ EP, n=6) de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas deficientes em aminoácidos essenciais. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as dietas experimentais.

DISCUSSÃO

No presente estudo a deficiência em AA essenciais na dieta resultou em alterações nas respostas imunes não específicas e do sistema antioxidante enzimático em juvenis de tilápia do Nilo em terminação. Os peixes que receberam as dietas controle e deficientes em histidina, treonina e fenilalanina apresentaram uma redução na atividade respiratória dos leucócitos. A atividade da lisozima ficou comprometida nos tratamentos que receberam as dietas deficientes em lisina e metionina, dois importantes aminoácidos limitante para o crescimento dos peixes. O tratamento deficiente em lisina também prejudicou a atividade hemolítica do sistema complemento,

essencial para a sinalização de possíveis organismos patogênicos. A deficiência de aminoácidos não exerceu influência sobre duas importantes defesas antioxidantes enzimáticas, CAT e GPx. Apenas a enzima SOD sofreu influência dos tratamentos, tendo a dieta controle e a dieta deficiente em fenilalanina as menores atividades desta enzima.

Para manutenção da quantidade de nitrogênio da dieta, foi suplementado L-ácido glutâmico, juntamente com outros dois aminoácidos não essenciais (L-alanina e L-glicina). O ácido glutâmico, juntamente com a valina e isoleucina, são precursores da glutamina, um aminoácido importante na síntese de sinais pró-inflamatórios e na eficiência dos mecanismos imunológicos, como produção de óxido nítrico. A suplementação com L-ácido glutâmico pode ter proporcionado o aumento da atividade respiratória dos leucócitos no tratamento com deficiência de valina, uma vez que pode ter potencializado a produção indireta de glutamina. Diferentemente, a produção de ânion superóxido não foi afetada pela suplementação de L-ácido glutâmico, uma vez que a glutamina é precursora da glutatona, contribuindo para a redução dos níveis de radicais livres, demonstrada pela quantificação da atividade da GPx, que não apresentou interferência da suplementação em nenhum dos tratamentos testados.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é fundamental para a eficiência do sistema imune, embora se saiba que a produção destes compostos é limitada pelo estresse oxidativo. Na tentativa de evitar uma produção excessiva de ERO, as respostas imunológicas são suprimidas (BILLER-TAKAHASHI et al., 2015). O reconhecimento de patógenos pelos fagócitos produz ERO, e após reação com NADPH oxidase, no burst oxidativo, produz radicais livres com atividade bactericida. A presença de ERO nas células desencadeia uma série de reações bioquímicas que causam dano oxidativo às proteínas, carboidratos e lipídios, reduzindo a função celular, podendo levar a apoptose. Células com função celular reduzida diminuem a produção de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPX, aumentando o acúmulo de radicais livres (BILLER e TAKAHASHI, 2018).

De fato, os resultados encontrados no presente estudo mostraram que os peixes alimentados com o tratamento deficiente em treonina apresentaram menores atividades respiratórias de leucócitos, juntamente com a dieta controle e a dieta deficiente em histidina, em contrapartida o mesmo tratamento apresentou maiores atividades da enzima superóxido dismutase. A atividade respiratória envolve um aumento súbito induzido por estímulo no metabolismo oxidativo não mitocondrial que

resulta na produção do ânion superóxido e das espécies reativas de oxigênio associadas (BILLER e TAKAHASHI, 2018). Era esperada uma maior produção de radicais livres derivados de oxigênio por meio da atividade respiratória de leucócitos, e consequentemente, um aumento na capacidade de resposta bactericida desses animais (ROSEN et al., 1995).

Nos peixes, componentes humorais, como a lisozima e as proteínas do sistema complemento desempenham um papel importante na modulação do sistema imune (KUANG et al., 2012). A lisozima é um importante elemento de defesa que causa lise de bactérias (JOLLES E JOLLES, 1984); suas funções foram documentadas como efetores de bio-defesas cruciais para a imunidade inata (SIMSER et al., 2004). Há pouca informação sobre os efeitos da leucina na função imunológica de espécies de peixes. Os resultados do presente estudo mostraram que a atividade da lisozima sérica foi significativamente afetada pela deficiência dietética de aminoácidos essenciais. Estudos anteriores demonstraram que o metabólito da leucina β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) pode promover a proliferação celular e aumentar a fagocitose de macrófagos de peixes (SIWICKI et al., 2000), o que também indica que a leucina pode melhorar a função imunológica dessas espécies de peixes.

Em um estudo realizado com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o grupo que recebeu dietas contendo apenas 10% de proteína apresentou uma redução na atividade da lisozima comparada ao grupo que recebeu dieta contendo 35 e 50%, demonstrando o efeito direto que a composição proteica da dieta exerce sobre o potencial imunológico desta espécie (KIRON et al., 1995). No presente trabalho, podemos observar que a atividade da lisozima se mostrou mais elevada para o grupo que recebeu dietas deficientes em leucina.

A lisina é frequentemente um dos AA mais limitantes nos ingredientes usados na produção de alimentos comerciais para peixes, especialmente quando a farinha de peixe é substituída por fontes de proteínas vegetais. Portanto, os níveis de lisina na dieta afetam criticamente o desempenho e a saúde dos peixes (MAI et al., 2006). No presente trabalho, a deficiência de lisina exerceu influência sobre a capacidade de resposta imunológica dos peixes, uma vez que os grupos que receberam os tratamentos deficientes em lisina apresentaram as menores atividades para lisozima e para o sistema complemento.

Com a disponibilidade comercial de lisina para alimentação, sua adição em dietas à base de proteínas permite uma redução econômica da proteína bruta da dieta sem

afetar o desempenho e o crescimento dos peixes (MAI et al., 2006). Essa estratégia nutricional também pode diminuir a excreção de amônia e fósforo solúvel dos peixes (CHENG, HARDY E USRY, 2003). Além disso, a suplementação dietética de lisina é eficaz para melhorar as respostas imunes e o desenvolvimento gastrointestinal de carpas var. Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian) (ZHOU, 2005).

Existem indícios de que a deficiência dietética de lisina limita a síntese de proteínas, incluindo citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de linfócitos, prejudicando a resposta imunológica em monogástricos (KONASHI et al., 2000)

Costas et al. (2011) observaram efeito positivo na lisozima após a inclusão de arginina na dieta. Yue et al. (2013) não observaram alterações significativas na lisozima de peixes que receberam diferentes concentrações de arginina na dieta, exceto quando submetidos a estresse. Pohlenz et al. (2013) constaram que o valor da lisozima pode estar ligado à taxa de ciclagem dos granulócitos e monócitos e atribuíram a não ocorrência de diferenças significativas em seu experimento a homeostase que os peixes foram mantidos durante a realização do experimento.

A arginina é um aminoácido cuja influência na saúde recebeu considerável atenção com animais experimentais, por exemplo, porcos (SAITO et al., 1987) e ratos (MADDEN et al., 1988) e de forma mais limitada, com os peixes (NEUMANN et al., 1995; BUENTELLO e GATLIN, 1999). Este aminoácido está envolvido na síntese de óxido nítrico (via óxido nítrico sintase) nos peixes (SCHOOR e PLUMB, 1994; NEUMANN, FAGAN e BELOSEVIC, 1995). O óxido nítrico tem muitas funções fisiológicas, e atua principalmente como molécula sinalizadora de patógenos, regula a produção de citocinas, media doenças autoimunes além de aumentar a citotoxicidade dos macrófagos. Esse efeito direto que a arginina tem sobre o sistema imune dos peixes foi observado no presente experimento, uma vez que o tratamento deficiente em arginina apresentou baixa atividade hemolítica do complemento e da lisozima.

Em outro estudo, Buentello et al. (2007) forneceram evidências de que os parâmetros hematológicos e alguns aspectos do sistema imune inato do bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) são sensíveis a mudanças na arginina dietética. Porém, as respostas observadas neste experimento, evidenciaram que os mecanismos reguladores do efeito da arginina sobre a resposta imune em peixes ainda não são claros e precisam ser mais bem investigados (REN, AI e MAI, 2014).

A metionina é um aminoácido essencial precursor da cisteína, um composto indispensável para a síntese de glutatona e taurina, moléculas importantes para os

mecanismos de defesa antioxidante. Além disso, o ciclo de oxidação / redução da metionina também atua na eliminação de ERO. Embora muitos estudos tenham sido realizados em ratos (WANG et al., 1997; PETRAPOULOS et al., 2001), pesquisas que avaliem o efeito da metionina no estado oxidativo dos peixes ainda são escassos (LI et al., 2009).

Pérez-Jiménez et al. (2012) avaliaram o efeito da suplementação de metionina e do chá branco na dieta sobre o estado oxidativo da dourada (*Sparus aurata*) e observaram que a suplementação de metionina não afetou a atividade das enzimas CAT e GPx, porém aumentou a atividade da SOD. Da mesma forma, Walton et al. (1982) também não observaram nenhum efeito da metionina na dieta nos níveis de GSH no fígado de *Oncorhynchus mykiss*. No entanto, Keembiyehetty e Gatlin (1995) observaram menores níveis de GSH (forma reduzida e oxidada) em *Morone chrysops* x *M. saxatilis* alimentados com uma dieta deficiente em metionina. Segundo Li et al. (2009), a deficiência de metionina pode reduzir ou mesmo esgotar as principais defesas antioxidantes não enzimáticas, como ácido ascórbico, vitamina E ou glutathione, com consequentes repercussões negativas no estado fisiológico normal dos animais. A deficiência de metionina testada neste experimento não apresentou efeito sobre as enzimas antioxidantes GPx e CAT, porém aumentou a atividade da SOD, principalmente quando comparada com a dieta controle, como observado por Pérez-Jiménez et al. (2012), indicando que tanto a suplementação quanto a ausência de metionina pode modular diretamente a produção de enzimas do sistema oxidativo.

Além da deficiência de aminoácidos essenciais em dietas para peixes, há evidências de que o uso excessivo de aminoácidos sintéticos nas rações para peixes, principalmente rações com baixo teor proteico, podem não garantir a mesma eficiência de utilização comparada aos aminoácidos provenientes de ingredientes proteicos de alto valor biológico (NRC, 1993; DABROWSKI e GUDERLEY, 2002).

Os aminoácidos são necessários para a síntese de uma variedade de proteínas específicas (incluindo citocinas e anticorpos) e regulam as principais vias metabólicas da resposta imune a patógenos infecciosos, além de serem importantes no balanço oxidativo do metabolismo dos peixes. Atualmente, os precursores de arginina, glutamina e cisteína têm sido mais comumente testados e utilizados na produção animal. O balanço adequado de todos os aminoácidos na dieta é necessário para manter a imunocompetência normal e proteger o hospedeiro de uma variedade de doenças em todas as espécies. Devido ao impacto negativo do desequilíbrio e

antagonismo de aminoácidos na ingestão e utilização de nutrientes, um suprimento excessivo de aminoácidos na dieta também pode ser prejudicial para o sistema imunológico. Assim, deve-se ter cuidado no desenvolvimento de estratégias eficazes de suplementação aminoacídica para alcançar o máximo de benefícios à saúde. Tais medidas devem basear-se no conhecimento sobre o metabolismo dos aminoácidos nos principais órgãos, seus papéis na resposta imune e estado oxidativo. Embora tenham sido feitos grandes avanços no crescente campo da imunologia nutricional, há uma escassez de informações sobre os mecanismos moleculares que regulam as ações dos aminoácidos no sistema imunológico e sua influência na geração e/ou eliminação das espécies reativas de oxigênio (WU et al. 2004; MATHERS, 2006; J. WANG et al. 2006). A descoberta desses novos conhecimentos podem melhorar a elaboração de dietas mais precisas, que aliadas ao adequado manejo alimentar e tecnologias de processamento das dietas, elevam a produção de peixes e possibilitam o máximo desempenho e melhor estado de saúde (FURUYA, 2013).

CONCLUSÃO

A deficiência de aminoácidos essenciais na dieta influenciaram diretamente no equilíbrio do estado oxidativo e defesas imunes das tilápias, pois regularam diferentes vias metabólicas. Reduzir aminoácidos das dietas pode não só tornar os peixes mais susceptíveis a possíveis patógenos, como também sobrecarregar o sistema de defesa antioxidante na eliminação de espécies reativas de oxigênio. Uma dieta balanceada, que atenda as exigências nutricionais da espécie continua sendo o principal caminho para a manutenção da saúde dos peixes em terminação.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. 105, 121–126.
- AKSNES, A.; MUNDHEIM, H.; TOPPE, J.; ALBREKTSEN, S. (2008) The effect of dietary hydroxyproline supplementation on salmon (*Salmo salar* L.) fed high plant protein diets. **Aquaculture** 275:242–249.
- ANDERSON, P. M.; BRODERIUS, M. A.; FONG, K. C.; TSUI, K. N. T.; CHEW, S. F.; IP, Y. K. (2002) Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichthys sinensis* in response to exposure to a high exogenous ammonia concentration. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 2053–2065.
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. (2012). Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 237-241.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., SAITA, M. V., GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C., (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2.
- BILLER, J. D.; TAKAHASHI, L. S. (2018). Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 3403-3414.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L.S., MINGATTO, F. E., URBINATI, E.C. (2015). The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, p. 360-367.
- BUENTELLO, J. A.; GATLIN, D. M. (1999) Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. **Aquaculture** 179:513–521.
- BUENTELLO, J. A.; REYES-BECERRIL, M.; GERALDO-ROMERO, M. J.; ASCENCIO-VALLE, F. J. (2007) Effects of Dietary Arginine on Hematological Parameters and Innate Immune Function of Channel Catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 19, p. 195–203.
- CHEN, C.; SANDER, J. E.; DALE, N. M. (2003). The effect of dietary lysine deficiency on the immune response to Newcastle disease vaccination in chickens. **Avian Diseases**, Amherst, v. 47, p. 1346–1351.
- COSTAS, B., CONCEIÇÃO, L. E., DIAS, J., NOVOA, B., FIGUERAS, A., & AFONSO, A. (2011). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). **Fish & Shellfish immunology**, 31(6), 838-847.
- DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. (2002). Intermediary metabolism. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Eds.) **Fish Nutrition**. v. 3, p. 309-365.
- DAMASCENO-OLIVEIRA, A.; FERNANDEZ-DURAN, B.; GONCALVES, J.; SERRAO, P.; SOARES-DASILVA, P.; REIS-HENRIQUES, M. A.; COIMBRA, J. (2007). Effects of cyclic hydrostatic pressure on the brain biogenic amines concentrations in the flounder, *Platichthys flesus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 153, p. 385-389.
- FURUYA, W. M. (2010). **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM. 100p.
- FURUYA, W. M. (2013). Nutrição de tilápias no Brasil. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 03, p. 133-155.
- GARG, S. K. (2007) Effect of oral administration of l-thyroxine (T4) on growth performance, digestibility, and nutrient retention in *Channa punctatus* (Bloch) and *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Fish Biochemistry and Physiology**, v. 33, p. 347–358.

HYNDMAN, K. A.; CHOE, K. P.; HAVIRD, J. C.; ROSE, R. E.; PIERMARINI, P. M.; EVANS, D. H (2006) Neuronal nitric oxide synthase in the gill of killifish (*Fundulus heteroclitus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 510–519.

JOLLES, P.; JOLLES, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 63, p. 165-189.

KEEMBIYEHETTY, C. N.; GATLIN, D. M. III (1995) Evaluation of different sulfur compounds in the diet of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* & *M. saxatilis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112, p. 155–159.

KIRON, V., WATANABE, T., FUKUDA, H., OKAMOTO, N., TAKEUCHI, T., (1995). Protein nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. V. 111, p. 351 – 359.

KLEIN, J. (1990) **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. p.311 -334.

KONASHI, S.; TAKAHASHI, K.; AKIBA, Y. (2000). Effects of dietary essential amino acid deficiencies on immunological variables in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, London, v. 83, p. 449-456.

XIAO, W. W.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, J.; JIANG, W. D.; HU, K.; LI, S. H.; TANG, L.; ZHOU, X. Q. (2012) Effects of graded levels of dietary methionine hydroxy analogue on immune response and antioxidant status of immune organs in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish and Shellfish Immunology**. v. 32, p. 629-636.

LI, P.; BURR, G. S.; WEN, Q.; GOFF, J. B.; MURTHY, H. S.; GATLIN, D. M. III (2009) Dietary sufficiency of sulfur amino acid compounds influences plasma ascorbic acid concentrations and liver peroxidation of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). **Aquaculture** 287, 414–418.

LI, P.; GATLIN, D. M. III (2007). Evaluation of dietary supplementation of β -hydroxy- β -methylbutyrate for hybrid striped bass *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 19, p. 77–88.

LI, P.; YIN, Y. L.; LI, D.; KIM, S. W.; WU, G. Y. (2007). Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 237-252.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. (2008). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Springer-Verlag. **Review Article**. v. 37, p. 43–53.

MADDEN, H. P., BRESLIN, R. J., WASSERKRUG, H. L., EFRON, G., AND BARBUL, A. (1988). Stimulation of T cell immunity by arginine enhances survival in peritonitis. **The Journal of Surgical Research**, v. 44, p. 658-663.

MAI, K.; ZHANG, L.; AI, Q.; DUAN, Q.; ZHANG, C.; LI, H.; WAN, J.; LIUFU, Z. (2006) Dietary lysine requirement of juvenile seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Aquaculture**, v. 258, p. 535–542

MATHERS, J. C. (2006) Nutritional modulation of ageing: genomic and epigenetic approaches. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, p. 584–589.

MURAI, T., AKIYAMA, T., OGATA, H., HIRASAWA, Y., NOSE T (1982) Effect of coating amino acids with casein supplemented to gelatin diet on plasma free amino acids of carp. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)**, v. 48, p 703–710.

NEUMANN, N. F., FAGAN, D., BELOSEVIC, M. (1995). Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 473-482.

NRC (National Research Council) (1993). "Nutrient Requirements of Fish." National Academy Press, Washington, DC.

OLIVA-TELES, A.; PERES, H.; KAUSHIK, S. (2017). Dietary arginine supplementation does not improve nutrient utilisation in gilthead seabream. **Aquaculture**, v. 479, p. 690-695.

OWENS, F. N.; PETTIGREW, J. E. (1989). Subdividing amino acid requirements into portions for maintenance and growth. In: **FRIEDMAN, M. Absorption and utilization of amino acids**. Boca Raton: **CRC Press**. v.1, p.15-30.

PARRY, Jr. R. M.; CHANDAN, C. R.; SHAHANI, M, K. (1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. **Experimental Biology and Medicine**, v. 119, p. 384-386.

PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. (2003). In vivo effects of Bglucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39- 54.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A., HIDALGO, M.C., MORALES, A.E., ARIZCUN, M., ABELLÁN, E., CARDENETE, G. (2009). Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on different dietary macronutrient levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 150, 537-545.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; PERES, H.; RUBIO, V. C.; OLIVA-TELES, A. (2012) The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **British Journal of Nutrition**, 108, 1202–1209.

PETROPOULOS I, MARY J, PERICHON M, ET AL. (2001) Rat peptide methionine sulfoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging. **The Biochemical Journal**, v. 355, p. 819–825.

POHLENZ, C.; BUENTELLO, A.; MILLER, T.; SMALL, B. C.; MACKENZIE, D. S.; GATLIN III, D. M. (2013). Effects of dietary arginine on endocrine growth factors of channel catfish, *Ictalurus punctatus* **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative. Physiology**, v. 166, p. 215-221.

QUADROS, M.; LANNA, E. A. T.; DONZELE, J. L.; ABREU, M. L. T.; RIBEIRO, F. B.; TAKISHITA, S. S. (2009). Crude protein reduction and digestible methionine+ cystine and threonine to digestible lysine ratios in diets for Nile tilapia fingerlings. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 1400-1406.

REN, M., AI, Q., & MAI, K. (2014). Dietary arginine requirement of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture Research**, 45(2), 225-233.

ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E. (1995) Free radicals and phagocytic cells, **FASEB Journal**, v. 9, p. 200 –209.

SAITO, H.; TROCKI, O.; WANG, S. L.; GONCE, S. J.; JOFFE, S. N.; ALEXANDER, J. W. (1987). Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn. **Archives of Surgery**, v. 122, p. 784-789.

SCHOOR, W. P.; PLUMB, J. A. (1994). Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 19, p. 153-155.

SHAMUSHAKI, V. A. J.; KASUMYAN, A. O.; ABEDIAN, A.; ABTAHI, B.; (2007) Behavioural responses of the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) juveniles to free amino acid solutions. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 40, p. 219–224.

SIMSER, J. A.; MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F. (2004) An immune responsive factor D-like serine proteinase homologue identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Molecular Biology** 13, 25–35.

- SIWICKI, A. K.; FULLER, J. C. Jr.; NISSEN, S.; OSTASZEWSKI, P.; STUDNICKA, M. (2000) In vitro effects of b-hydroxy-b-methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity in fish. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, p. 191–197.
- SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. (1949). The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58, p. 731-736.
- TAKEUCHI, T. (2007) Amino acids, Peptides. In: Nakagawa H, Sato M, Gatlin DM (eds) Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. CAB International, Oxon, UK, p. 47–63.
- WALTON, M. J.; COWEY, C. B.; ADRON, J. W. (1982). Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content. **The Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1525–1535.
- WANG ST, CHEN HW, SHEEN LY, et al. (1997) Methionine and cysteine affect glutathione level, glutathione-related enzyme activities and the expression of glutathione S-transferase isozymes in rat hepatocytes. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 2135–2141.
- WANG, T. C.; FULLER, M. F. (1989). The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. **British Journal Nutrition**, v. 62, p. 77-89.
- WANG, X.; QIAO, S. Y.; LIU, M.; MA, Y. X. (2006) Effects of graded levels of true ileal digestible threonine on performance, serum parameters and immune function of 10–25 kg pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, p. 264–278.
- WON, K. M.; KIM, S. M.; PARK, S. I. (2004). The effects of b-1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v. 17, p. 29–38.
- WU, G. (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249–1252
- WU, G.; FLYNN, N. E.; FLYNN, S. P.; JOLLY, C. A.; DAVIS, P. K (1999) Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1347–1354.
- WU, G.; BAZER, F. W.; CUDD, T. A.; MEININGER, C. J.; SPENCER, T. E. (2004). Maternal nutrition and fetal development. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2169–2172.
- WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 489–492.
- YUE, Y.; ZOU, Z.; ZHU, J.; LI, D.; XIAO, W.; HAN, J.; YANG, H. (2013). Effects of dietary arginine on growth performance, feed utilization, hematological parameters and non-specific immune responses of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, v. 46, p. 1801-1809.
- ZHOU, X. (2005) Use of synthetic lysine in fish feeds: a review on research and application. **Feed Indian Aquafeed**, v. 27, p. 1–7.

CAPÍTULO III: Efeito dos níveis dietéticos de histidina nas defesas inata antioxidante em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiados com lipopolissacarídeo.

RESUMO

A histidina têm se mostrado um aminoácido essencial com capacidade de ativar o sistema de defesa antioxidante e proporcionar aos peixes uma melhor condição de defesa frente a um patógeno. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência que níveis crescentes de inclusão de histidina na dieta para juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exercem sobre as defesas antioxidantes e sistema imune. Foram utilizadas 510 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) com peso médio inicial de $8,23 \pm 0,09$ g. Os tratamentos foram compostos de seis níveis de histidina (0,51; 0,61; 0,74; 0,87; 0,98 e 1,12%), distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas duas amostragens, indicadas como AD e DD (antes e depois dos animais serem desafiados com lipopolissacarídeo). A coleta AD foi realizada no sexagésimo dia de alimentação e a coleta DD no sexagésimo terceiro dia. Os parâmetros imunológicos avaliados foram à atividade respiratória de leucócitos, atividade da lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento. No sistema oxidativo foram avaliados a atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), as concentrações de glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG), estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), além da formação de malondialdeído (MDA). Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis: peso final, peso do fígado, índice hepatossomático, atividade hemolítica do complemento, GSH e GSSG entre os tratamentos. Os peixes que receberam as dietas contendo 0,51; 0,74; 0,87 e 1,12% de inclusão de histidina apresentaram uma maior atividade respiratória de leucócitos (burst oxidativo). O tratamento com inclusão de 0,74% de histidina apresentou os melhores resultados para lisozima, SOD, CAT e GPx. Os peixes que receberam as dietas com níveis mais altos de histidina apresentaram maiores concentrações de MDA, indicando lipoperoxidação. A suplementação de histidina na dieta em níveis acima da exigência do animal pode suprimir a capacidade de resposta imunológica em tilápias.

Palavras-chave: histidina, lipopolissacarídeo, tilápia, estresse oxidativo, imunidade.

ABSTRACT

Histidine has been shown to be an essential amino acid with the ability to activate the antioxidant defense system and provide fish with a better defense condition against a pathogen. The aim of this study was to evaluate the influence that increasing levels of histidine in the diet for juvenile Nile tilapia (*O. niloticus*) have on antioxidant and immune system defenses. 510 Nile tilapia (*O. niloticus*) with an initial average weight of 8.23 ± 0.09 g were used. The treatments were composed of six levels of histidine (0.51; 0.61; 0.74; 0.87; 0.98 e 1.12%), distributed in a completely randomized design. Two samplings were performed, indicated as AD and DD (before and after the animals were challenged with LPS). The AD collection was performed on the sixty-third day of feeding and the DD collection was performed on the sixty-third day. The immunological parameters evaluated were leukocyte respiratory activity, lysozyme activity and hemolytic activity of the complement system. In the oxidative system, the liver activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), concentrations of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), oxidative status of pyridine nucleotides (NAD) were evaluated. (P) H), in addition to the formation of malondialdehyde (MDA). There were no significant differences for the variables: final weight, liver weight, hepatosomatic index, complement hemolytic activity, GSH and GSSG between treatments. Fish that received diets containing 0.51; 0.74; 0.87 e 1.12% of histidine inclusion showed greater leukocyte respiratory activity (oxidative burst). Treatment with inclusion of 0.74% histidine showed the best results for lysozyme, SOD, CAT and GPx. Fish that received diets with higher levels of histidine showed higher concentrations of MDA, indicating lipoperoxidation. Dietary histidine supplementation at levels above the animal's requirement may suppress the immune response capacity in tilapia.

Keywords: histidine, lipopolysaccharide, tilapia, oxidative stress, immunity.

INTRODUÇÃO

Os peixes possuem um sistema imunológico bem desenvolvido, composto por mecanismos humorais e mediados por células, inatos e adquiridos, responsáveis por defender o organismo do animal contra qualquer agente invasor evitando de diversas formas a instalação de doenças (ELLIS, 1999). O sistema imunológico inato é o sistema mais primitivo de proteção, pois está presente de alguma forma em todos os organismos e é bem desenvolvido em peixes teleósteos (BARTON, 2008). Quando barreiras externas são rompidas, uma resposta inflamatória é iniciada na tentativa de barrar a infecção ou ferida, reparar os danos e restabelecer a homeostase (ELLIS, 2001).

Esta resposta é caracterizada por um influxo de células fagocíticas para o foco da infecção, o que produz um número de instrumentos bactericidas capazes de degradar e matar organismos invasores (AFONSO, 1998; DO VALE et al., 2002). Tanto os macrófagos como os neutrófilos atacam eficientemente os patógenos, ativando a produção da lisozima, fatores do complemento e compostos antiproteases (ELLIS, 2001; SECOMBES, 1996). Além disso, essas células produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido, quando em contato com bactérias (RIEGER e BARREDAA, 2011).

A resposta inflamatória ideal é rápida e destrutiva, mas específica e autolimitada (BARTON, 2008) e é provável que os nutrientes influenciem vários aspectos do sistema imunológico (LI et al., 2007). Por conseguinte, a modulação do sistema imune dos peixes pode ser conseguida através de estratégias nutricionais (BLAZER, 1992; CONCEIÇÃO, 2012). Li et al. (2009) sugeriram que a suplementação dietética com aminoácidos (AA) pode melhorar o desempenho dos peixes.

Os aminoácidos estão envolvidos na síntese de uma matriz de proteínas, e no controle das principais vias de regulação imunológica. Na nutrição humana e animal, arginina, glutamina e cisteína têm recebido maior atenção, embora vários aminoácidos estejam envolvidos na manutenção da imunocompetência e resistência a doenças. Os desequilíbrios de aminoácidos, bem como seus antagonismos, podem afetar a utilização de nutrientes e podem ter uma consequência direta sobre os órgãos e respostas imunológicas (LI et al., 2007).

Existem 10 aminoácidos essenciais para o crescimento normal e metabolismo em todas as espécies de peixes (NRC, 1993). A histidina, por vezes, é mostrada como limitante na alimentação de tilápia e, portanto, é importante entender as necessidades

dietéticas desse aminoácido. A exigência de histidina foi de 0,48% para a tilápia do Nilo em postura de alevinos (SANTIAGO e LOVELL, 1988) e 1% para a tilápia híbrida juvenil *Oreochromis* spp. (NRC, 2011). Diogenes et al. (2016) comprovaram que tilápias com peso médio inicial de 20 g exigem 0,54% de histidina na dieta baseado no método de deleção. Recentemente Michelato et al. (2017) mostraram que a tilápia juvenil exige 0,82% de histidina na dieta para ganho máximo de peso baseado na análise de regressão polinomial de segunda ordem. O crescimento e a taxa de conversão alimentar foram reduzidos em situações de deficiência de histidina em várias espécies de peixes, tais como o salmão chum, *Oncorhynchus keta* (AKIYAMA et al., 1985); e Jian carpa, *Cyprinus carpio* var. Jian (ZHAO et al., 2012).

Atualmente, cada vez mais pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de entender o papel dos aminoácidos na resposta imune dos peixes (HABTE-TSION et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHOU et al., 2015). No entanto, o desequilíbrio de aminoácidos também poderia ter um efeito sobre a utilização de nutrientes e, em seguida, pode ter influência direta sobre a imunidade de órgãos e reações (LI et al., 2007). Pouco se sabe sobre o impacto da histidina suplementada na dieta no estado antioxidante e imunidade de juvenis de tilápia (*O. niloticus*) desafiados com LPS. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência que níveis crescentes de inclusão de histidina na dieta para juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exercem sobre as defesas antioxidante e imune em juvenis de tilápia saudáveis e desafiados com lipopolissacarídeo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Instalações e manejo

O estudo foi conduzido no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP) “Júlio de Mesquita Filho”, no campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O período experimental teve duração total de 60 dias sendo conduzido no Laboratório de Modelagem em Nutrição de Peixes do CAUNESP. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) do CAUNESP (Protocolo número 009999/14).

No período experimental os peixes ficaram em caixas de polietileno com capacidade para 200 L, alojadas em um sistema fechado de recirculação de água, equipado com filtragem mecânica e biológica, trocador de calor e aeração. Antes de iniciar o experimento, os animais passaram por adaptação às condições laboratoriais por um período de 14 dias recebendo ração comercial. Após esse período, as dietas experimentais foram fornecidas duas vezes ao dia (8h00min e 16h00min) até saciedade aparente.

Para garantir a qualidade da água, diariamente foi realizada a troca de 30% do seu volume total. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos diariamente: temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e pH, e semanalmente: concentração de amônia, nitrito e nitrato. Os parâmetros da água observados foram: temperatura de $27,1 \pm 1,0$ °C, pH de $7,6 \pm 0,6$, oxigênio dissolvido de $5,4 \pm 1,0$ mg L⁻¹, amônia total de $0,60 \pm 0,73$ mg L⁻¹, nitrito de $0,27 \pm 0,24$ mg L⁻¹ e nitrato de $0,77 \pm 0,19$ mg L⁻¹. O fotoperíodo foi ajustado em 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

2. Delineamento e dietas experimentais

Foram utilizadas 510 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio inicial de $8,23 \pm 0,09$ g. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos em esquema fatorial 6 x 2, sendo seis níveis de inclusão de histidina (0,51; 0,61; 0,74; 0,87; 0,98 e 1,12%) e duas amostragens (antes e depois do desafio). Antes da fabricação das rações, amostras (250 g por ingrediente) de todas as matérias-primas contendo aminoácidos/proteína foram enviadas para o laboratório Evonik Hanau® - Alemanha para análise. Um lote principal da dieta basal foi produzido, depois disso, alíquotas do lote principal foram suplementadas com quantidades crescentes de histidina (Tabela 7). As dietas experimentais foram

extrusadas em uma extrusora experimental (Extrutech®) e secas em estufa a 55 ° C por 24h. As dietas então foram enviadas para o Centro de Aquicultura da UNESP para realização do experimento. As dietas foram armazenadas em câmara fria (-15°C) até a utilização.

Tabela 7. Formulação e composição química das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Tratamentos					
	0,51	0,61	0,74	0,87	0,98	1,12
Farinha de trigo	27,9	27,9	27,9	27,9	27,9	27,9
Farelo germen de milho	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Farinha de penas	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5
Gelatina	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Farelo de arroz	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Óleo de peixe	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Celulose	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fosfato monocálcico	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
Vit-Min premix ¹	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
L-Valina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
L-Isoleucina	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
L-Histidina	0,03	0,15	0,3	0,45	0,6	0,76
MetAMINO® (DL-Metionina)	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
ThreAMINO® (L-Treonina)	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
TrypAMINO® (L-Triptofano)	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
Biolys® (Sulfato de L-lisina)	2,39	2,39	2,39	2,39	2,39	2,39
Ácido L-glutâmico	0,75	0,63	0,48	0,33	0,18	0,02
Matéria seca ²	90,62	90,45	90,76	90,57	90,04	90,07
Proteína Bruta ²	34,26	34,35	34,7	34,69	34,19	34,57
Extrato etéreo bruto ²	4,49	4,51	4,52	4,52	4,47	4,49
Energia bruta (kcal/kg) ²	4311,68	4443,85	4548,10	4521,70	4427,25	4470,16
Matéria Mineral ²	3,40	3,21	3,34	3,30	3,31	3,27
Metionina bruta	0,86	0,87	0,86	0,86	0,87	0,86
Lisina bruta	2,11	2,10	2,10	2,10	2,07	2,04
Treonina bruta	1,37	1,39	1,38	1,38	1,35	1,36
Arginina bruta	1,80	1,81	1,80	1,79	1,79	1,80
Isoleucina bruta	1,5	1,49	1,49	1,51	1,48	1,47
Leucina bruta	2,75	2,75	2,75	2,74	2,69	2,72
Valina bruta	1,74	1,74	1,73	1,75	1,74	1,72
Histidina bruta	0,51	0,61	0,74	0,87	0,98	1,12
Fenilalanina bruta	1,43	1,43	1,42	1,42	1,39	1,41
Triptofano bruto	0,42	0,44	0,43	0,43	0,44	0,44

¹umidade (%) 2,0; Cinza (%) 71,6442; Colina (mg / kg) 30000; Magnésio (%) 0,0085; enxofre (%) 1,1589; Ferro (mg / kg) 25 714; Cobre (mg / kg) 1,960; Manganês (mg / kg) 13.345; Zinco (mg / kg) 30.000; Iodo (mg / kg) 939; Selênio (mg / kg) 30; Vitamina A (UI / kg) 600 000; Vitamina D3 (UI / kg) 600 000; Vitamina E (mg / kg) 12.000; Vitamina K3 (mg / kg) 631; Tiamina B1 (mg / kg) 1176; Riboflavina B2 (mg / kg) 1536; Piridoxina B6 (mg / kg) 1.274; Vitamina B12 (mg / kg) 4000; Niacina (mg / kg) 19800; Ácido pantotênico B3 (mg / kg) 3920; Ácido fólico (mg / kg) 192 Biotina (mg / kg) 20; Vitamina C (mg / kg) 40.250.

² valores estimados com base nas análises proximais realizadas no laboratório de nutrição do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP).

3. Desafio com Lipopolissacarídeo (LPS)

Após 60 dias de experimento com fornecimento das dietas experimentais, os animais foram anestesiados com benzocaína ($1 \text{ g } 10 \text{ L}^{-1}$ de água) e desafiados por meio de injeção intraperitoneal de 0,1 mL da endotoxina LPS por grama de peixe ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso vivo).

A substância utilizada no desafio dos peixes foi o lipopolissacarídeo extraído da parede celular de *Escherichia coli* (026:B6, Sigma, St. Louis, MO, USA). Neste período de desafio os animais não receberam as dietas experimentais. No terceiro dia após o desafio foi colhido sangue e fígado para posteriores análises dos parâmetros imunológicos e oxidativos.

4. Coleta de material biológico

A coleta do sangue foi realizada em dois animais por repetição, totalizando 12 animais por tratamento. Foram realizadas duas amostragens, indicadas como AD (antes dos animais serem desafiados com LPS) e DD (depois dos animais serem desafiados com LPS). A coleta AD foi realizada no sexagésimo dia de alimentação com as dietas experimentais e a coleta DD no sexagésimo terceiro dia. O sangue foi coletado através da punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis.

Seringas sem anticoagulante foram utilizadas e o soro foi utilizado para determinação da atividade de lisozima e atividade hemolítica do complemento. Para a obtenção de sangue total, microtubos com anticoagulante (heparina sódica) foram utilizados para armazenamento de sangue que foi destinado a determinação da atividade respiratória de leucócitos. Os mesmos animais foram utilizados para coleta do fígado (armazenado em freezer -80°) para análise de indicadores de estresse oxidativo. Foi avaliada a relação índice hepatossomático (IHS) de acordo com a fórmula: $[100 \times (\text{peso do tecido} / \text{peso vivo})]$.

5. Variáveis analisadas

5.1 Indicadores do Sistema Imune não específico

5.1.1 Atividade respiratória de leucócitos

Para análise da atividade respiratória de leucócitos foi seguido o protocolo de Biller-Takahashi et al. (2013). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “nitroblue tetrazolium” (NBT) que formam precipitados

de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (KLEIN, 1990).

Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada em seguida e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetilformamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim provoca lise na parede celular dos leucócitos e dos grânulos de formazan liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

5.1.2 Atividade de lisozima

A determinação da atividade de lisozima foi baseada no método clássico de causar lise de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS e HARTSELL, 1949). A lisozima tem capacidade de atuar sobre ligações β-1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico de membranas de parede celular bacterianas, levando a sua lise e consequente destruição do patógeno (PAULSEN et al., 2003). A análise foi realizada por ensaio turbidimético, segundo Parry (1965) com adaptações.

A partir da curva padrão determinada utilizando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha, foi quantificada as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta. Após a determinação de curva de calibração, o soro dos peixes de todos os tratamentos, inicialmente, passaram por tratamento térmico (banho-maria a 56°C por 30 min) para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *M. lysodeikticus* seja provocada exclusivamente por ação da lisozima. Assim, 50 µL soro (em triplicata) foram depositados em microplacas, de acrílico estéril de 96 cavidades, em 50 µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2), após homogeneizados, o soro foi submetido a diluições sucessivas com razão constante igual a 2, mantendo um volume final de 50 µL por cavidade.

Em cada cavidade foi depositado 125 µL de suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2% em tampão fosfato de sódio). A redução da densidade óptica, em 450 nm, foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 30°C. Os resultados em concentração (µg mL⁻¹ de amostra)

foram obtidos a partir da redução da δ DO para cada volume de amostra avaliada, e os resultados em unidade de atividade ($U\ mL^{-1}$) foram determinados como a quantidade de enzima que produziu, em 450 nm, um δ DO de $0,001\ min^{-1}$ (WON et al., 2004).

5.1.3 Atividade hemolítica do complemento - via alternativa

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com metodologia descrita previamente por Biller-Takahashi et al. (2012). Uma alíquota de sangue total de carneiros foi misturada a um mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1) e a solução resultante filtrada em gaze estéril para retirada de material suspenso. Para a retirada total de outros componentes sanguíneos que não sejam os eritrócitos, foram realizadas três lavagens do sangue de carneiro com tampão PBS, cada lavagem sendo feita uma centrifugação de 3000 rpm, por 10 min a 4°C.

Os eritrócitos, após a última centrifugação, foram ressuspensos novamente no PBS na concentração de $2,8 \times 10^6\ cel\ mL^{-1}$ e armazenados em geladeira, sendo viáveis por até 15 dias. Para determinar a atividade hemolítica do complemento, foi realizada uma série de diluições da amostra em microplacas de fundo V utilizando 40 μ L de soro e 40 μ L de Tampão 'Start' pH 7,3 (0,1% gelatina, 5 mM de sódio barbitúrico, 0,13 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ e 10 mM EGTA). Após realizadas às diluições da amostra, foi acrescentado na placa 10 μ L de sangue a $2,8 \times 10^6\ cel\ mL^{-1}$ e incubado em temperatura ambiente por 100 minutos, homogeneizando a cada 20 minutos. Após incubação, foi adicionado 150 μ L do tampão 'Stop' gelado pH 7,3 (0,1% gelatina, 5 mM de sódio barbitúrico, 0,13 mM NaCl e 20 mM EDTA). A microplaca foi centrifugada à 1000 rpm por 3 minutos e transferido 200 μ L do sobrenadante para uma microplaca de fundo chato. A leitura foi realizada a 414 nm em leitor de microplaca tipo ELISA.

5.2 Estresse Oxidativo

5.2.1 Processamento das amostras

As amostras de fígado foram inicialmente descongeladas para confecção de um homogenato na proporção de 1 g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização (Tris HCl 100mM, EDTA 0,1 mM e triton x-100 a 0,1%, pH 7,8). O homogenato foi preparado em um homogeneizador tipo Potter (Modelo NT 136 - Novatecnica®) a 600 rpm por aproximadamente 3 minutos cada amostra. Após homogeneização, as amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugados a 5000 rpm, por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) Allegra X-30R Centrifuge – Beckman

Coulter®. Após centrifugação, os sobrenadantes foram separados em alíquotas para análise da atividade das enzimas do estresse oxidativo. No mesmo dia de preparo dos homogenatos, foi quantificada a concentração de proteína de cada amostra pelo método de Biureto em espectrofotômetro a 540 nm.

5.2.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi medida através do método do ferricitocromo C usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido. O coquetel de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8), EDTA a 0,1 mM, xantina a 0,1 mM, citocromo C a 0,013 mM e xantina oxidase a 0,024 IU / mL. A atividade esta apresentada em unidades de SOD por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma inibição de 50% da taxa de redução do ferricitocromo C (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2009).

5.2.3 Catalase (CAT)

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada medindo a diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio a 240 nm de acordo com Aebi (1984). O coquetel de reação consistiu em tampão de fosfato de potássio a 50 mM (pH 7) e H₂O₂ a 10,6 mM preparado no momento da utilização.

5.2.4 Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx (EC 1.11.1.9) foi medida seguindo o método de Pérez-Jiménez et al. (2009), modificado de Paglia e Valentine (1967). A glutathiona na forma oxidada (GSSG) gerada pela GPx foi reduzida pela glutathiona redutase (GR) e a oxidação de NADPH foi monitorada a 340 nm. O coquetel de reação consistiu em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,1), 3,6 mM de glutathiona na forma reduzida (GSH), 3,6 mM de azida de sódio, 1 IU mL⁻¹ de glutathiona redutase, 0,2 mM de NADPH e 1,2 mM de H₂O₂.

5.2.5 Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A determinação da concentração de GSH no homogenato de fígado foi realizada de acordo com Hissin e Hilf (1976) utilizando-se microtubos de centrifuga de 2 mL. Ao homogenato (1 mg de proteína), foi adicionado meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl, 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 para completar 1 mL e após uma leve

homogeneização foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético 13%. A mistura foi agitada e centrifugada a 9000 g por 3 min. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1800 μL de tampão contendo NaH_2PO_4 0,1 M, pH 8,0, com EDTA 5 mM, 100 μL do sobrenadante obtido da centrifugação e 100 μL de OPT (o-ftalaldeído) 1 mg mL^{-1} . Em seguida os tubos foram agitados e mantidos por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Foi efetuada a leitura em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301 com comprimento de onda de 350 e 420 nm para emissão e excitação, respectivamente. Para a dosagem de GSSG, 250 μL do sobrenadante inicial foram tratados com 250 μL de N-etilmaleimida (NEM) 0,04 M e submetidos ao mesmo procedimento de mistura com o OPT. As concentrações de GSH e GSSG foram estimadas por meio de uma curva padrão. Essa curva consistiu na leitura em espectrofluorímetro de soluções de GSH preparadas em diferentes concentrações (0,1 ; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 e 10 μM).

5.2.6 Estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H)

A determinação do estado oxidativo da NAD(P)H foi realizada no homogenato de fígado. Amostras de homogenato (1 mg de proteína mL^{-1}) foram adicionadas a um meio de reação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 (volume final de 2 mL) e a leitura foi realizada em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RFPC 5301, usando-se 366 e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente. Os resultados foram expressos como Unidade Relativa de Fluorescência (URF).

5.2.7 Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA)

A lipoperoxidação foi determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (BUEGE e AUST, 1978). O homogenato (5 mg de proteína) foi colocado em tubos de ensaio e adicionados 0,2 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) (8,1%), 1,5 mL de ácido acético (20%), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (solução aquosa a 0,67%), o volume foi completado até 4 mL com água deionizada (milli-Q) e a mistura colocada em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o período de incubação os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo e adicionado 1 mL de água milli-Q e o complexo MDA-TBA foi extraído com 5 mL de n-butanol. Em seguida os tubos foram centrifugados a 2000 g por 10 minutos, a parte orgânica foi coletada e a leitura da absorvância realizada a 535 nm. A concentração de

lipoperóxidos foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

6. Análises Estatísticas

Os dados, após teste de normalidade e homocedasticidade das variâncias, foram submetidos à análise de variância (two-way ANOVA) sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância através do programa estatístico SAS, versão 9.0.

RESULTADOS

Os resultados para peso final, peso do fígado, índice hepatossomático, atividade respiratória de leucócitos, atividade de lisozima sérica, atividade do sistema complemento, atividades hepáticas da SOD, CAT e GPx estão apresentados na Tabela 8. Foram observadas diferenças significativas para a interação (níveis de histidina e administração de LPS) para as variáveis lisozima, SOD, CAT e GPx, sendo os desdobramentos da interação apresentados mais a diante.

No peso final, peso do fígado e índice hepatossomático não foi observado diferença significativa entre os níveis de histidina. O peso do fígado e índice hepatossomático foi significativamente menor após o desafio com LPS. Essa resposta pode ter sido observada devido à mobilização de substratos como glicogênio e lipídios, durante o período entre essas duas amostragens.

A atividade respiratória dos leucócitos reduziu significativamente após os peixes serem desafiados com LPS, indicando que essa resposta pode ter sido suprimida através da superprodução de radicais livres resultantes do estresse metabólico (Biller-Takahashi et al., 2015). Da mesma forma, o tratamento contendo 0,98% também apresentou redução na atividade, não diferindo do tratamento com 0,60% de histidina, que apresentou maior atividade, juntamente com 0,51; 0,74; 0,87 e 1,12%.

Os resultados para a lisozima sérica referente ao desdobramento da interação entre níveis de histidina testados e coleta estão apresentados na Figura 9. A atividade da lisozima sérica foi significativamente maior após o desafio com LPS, com exceção do nível de inclusão de 0,98% que apresentou menor atividade. As dietas com menores inclusões de histidina apresentaram uma maior atividade dessa proteína, com o nível de 0,74% sendo significativamente maior tanto antes, como após o desafio. Os

níveis mais elevados de histidina na dieta resultaram em menores atividades dessa proteína.

Para o sistema complemento, no presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, mostrando que a inclusão de histidina dietética em níveis crescentes não influenciou diretamente este parâmetro do sistema imune dos peixes. Porém, observou-se um efeito significativo do desafio na atividade do sistema complemento, comprovando o potencial bactericida do LPS através da ativação do sistema complemento pela via alternativa.

Os resultados para a SOD referente ao desdobramento da interação entre níveis de histidina testados e coleta estão apresentados na Figura 10. Para a atividade hepática da enzima superóxido dismutase, foi possível observar que a condição homeostática do organismo dos peixes não foi afetada pela inclusão de histidina antes do desafio. Após inoculação com LPS, as dietas com menores níveis de inclusão (0,51; 0,61 e 0,74%) apresentaram maior atividade hepática da SOD comparados aos demais níveis.

Os resultados para a CAT referente ao desdobramento da interação entre níveis de histidina testados e coleta estão apresentados na Figura 11. A atividade hepática da catalase foi significativamente maior para os níveis 0,51 e 1,12% antes dos peixes serem desafiados. Após desafio, as dietas com menor inclusão apresentaram maior atividade da enzima, e os níveis mais elevados, de certa forma, suprimiram a atividade hepática da catalase.

Os resultados para a GPx referente ao desdobramento da interação entre níveis de histidina testados e coleta estão apresentados na Figura 12. O comportamento da atividade hepática da enzima glutathione peroxidase foi semelhante à SOD. Antes dos peixes serem desafiados, os níveis testados exerceram pouca influência sobre a atividade da GPx, com diferenças apenas para as tratamentos com as menores inclusões (0,51 e 0,61%), que apresentaram menores atividades para esta enzima comparado ao tratamento com inclusão de 1,12%. Após o desafio, foi observado que os menores níveis de inclusão de histidina (0,51; 0,61 e 0,74%) apresentaram maior atividade da enzima.

A lipoperoxidação foi avaliada pela medida da concentração de malondialdeído (MDA), e o desdobramento da interação entre níveis de histidina testados e coleta está apresentado na Figura 13. Foi observado que os tratamentos com maiores inclusões de histidina dietética (0,74; 0,87; 0,98 e 1,12%) apresentaram uma maior formação de

produtos citotóxicos (MDA) decorrentes da peroxidação lipídica, e que o desafio com o LPS reduziu significativamente a formação deste composto (MDA).

O tratamento com inclusão de 0,61% de histidina apresentou maior estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), sendo estatisticamente diferente apenas do tratamento 0,74%. O desafio não exerceu influência sobre esta variável (Tabela 9).

Para as concentrações de GSH e GSSG, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de inclusão de histidina na dieta. Foi observada uma redução significativa da glutathiona oxidada (GSSG) após os peixes serem submetidos ao desafio com LPS (Tabela 9).

Tabela 8. Valores médios e valores de P dos parâmetros biométricos, imunológicos e atividades de enzimas antioxidantes dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) após 60 dias de alimentação com diferentes inclusões de histidina na dieta e desafio com LPS.

Variáveis	DIETAS (%)						COLETAS		Two-way ANOVA		
	0,51	0,61	0,74	0,87	0,98	1,12	AD	DD	Dietas	Coleta	Interação
Peso Final (g)	124,51	114,2	114,3	126,9	119,2	115,2	121,1	116,6	0,3226	0,2844	0,3598
Peso do Fígado (g)	1,89	1,96	2,18	2,14	2,22	2,02	2,78a	1,37b	0,7550	<.0001	0,1552
Índice Hepatossomático (%)	1,49	1,72	1,86	1,66	3,59	1,94	2,88a	1,24b	0,5236	0,0230	0,3733
Atividade Respiratória de Leucócitos (DO)	0,25a	0,23ab	0,26a	0,25a	0,21b	0,25a	0,32a	0,17b	0,0028	<.0001	0,0886
Lisozima sérica (U mL ⁻¹)	198,9	227,4	346,9	185,4	133,6	166,3	248,6	170,9	<.0001	<.0001	<.0001
Complemento (U mL ⁻¹)	172,9	139,8	136,7	150,8	151,2	143,5	74,23b	224,1a	0,1654	<.0001	0,0977
SOD (U SOD mg proteína ⁻¹)	208,9	190,6	224,1	150,3	177,2	182,5	228,2	149,7	0,0001	<.0001	<.0001
CAT (U mg proteína ⁻¹)	203,2	143,9	194,1	131,8	148,0	184,3	176,3	158,8	<.0001	0,0101	<.0001
GPx (mU mg proteína ⁻¹)	99,14	124,1	159,5	102,6	99,9	108,2	127,7	103,4	<.0001	<.0001	<.0001

Média (n=6). Letras distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05). SOD = superóxido dismutase. CAT = catalase. GPx = Glutathiona peroxidase.

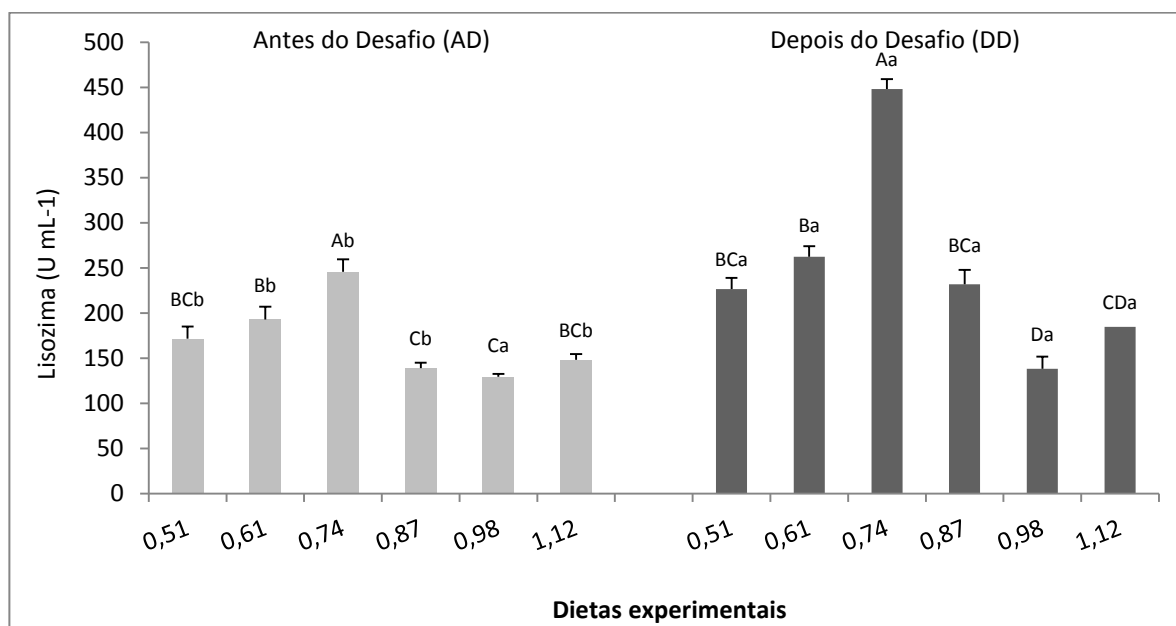


Figura 9. Atividade da lisozima sérica dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

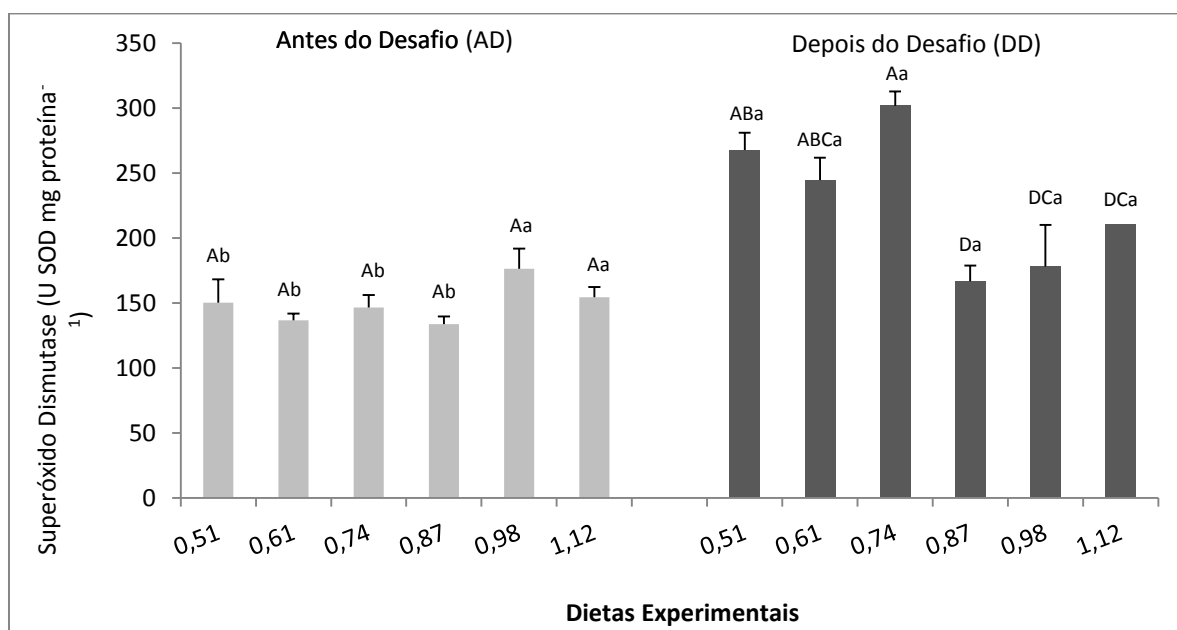


Figura 10. Atividade hepática da enzima superóxido dismutase dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

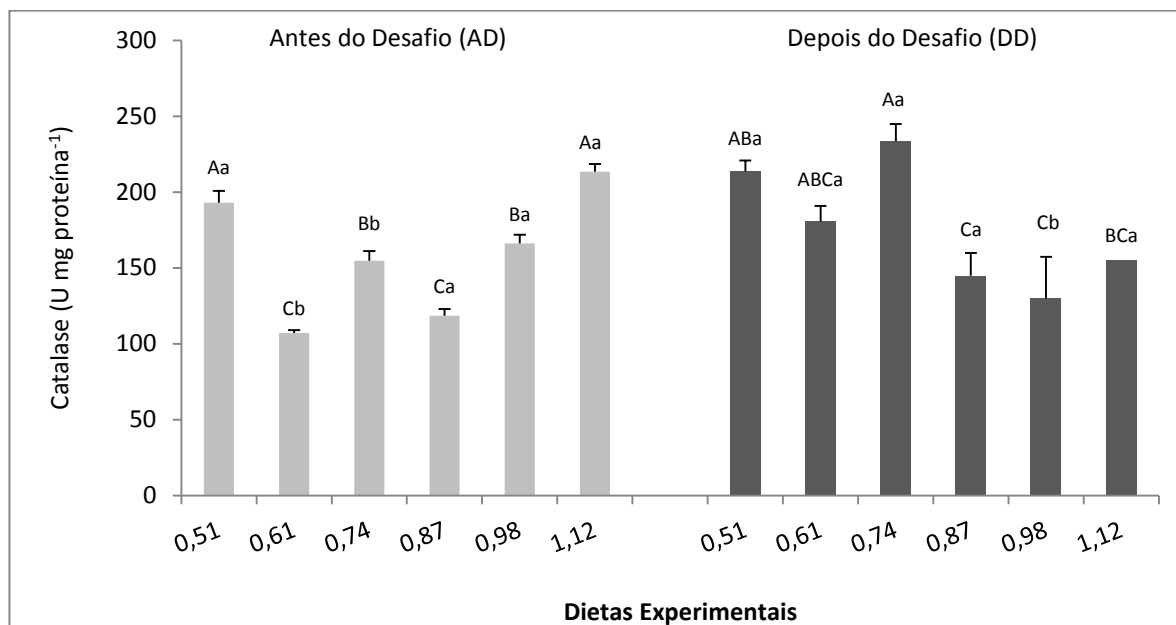


Figura 11. Atividade hepática da enzima catalase dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

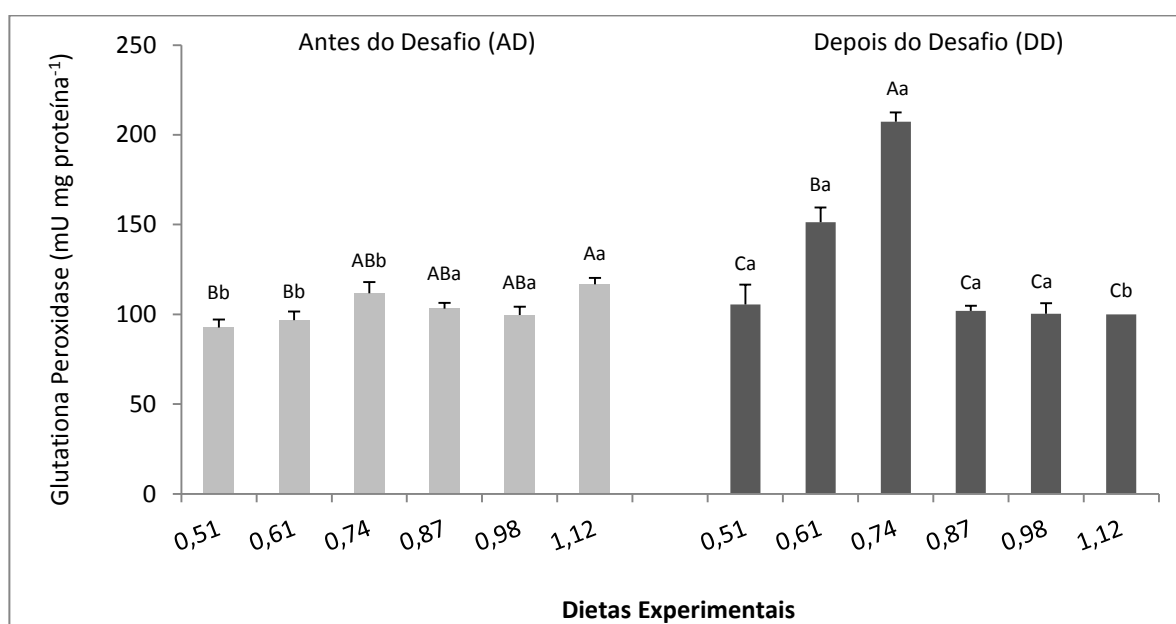


Figura 12. Atividade hepática da enzima glutathione peroxidase dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

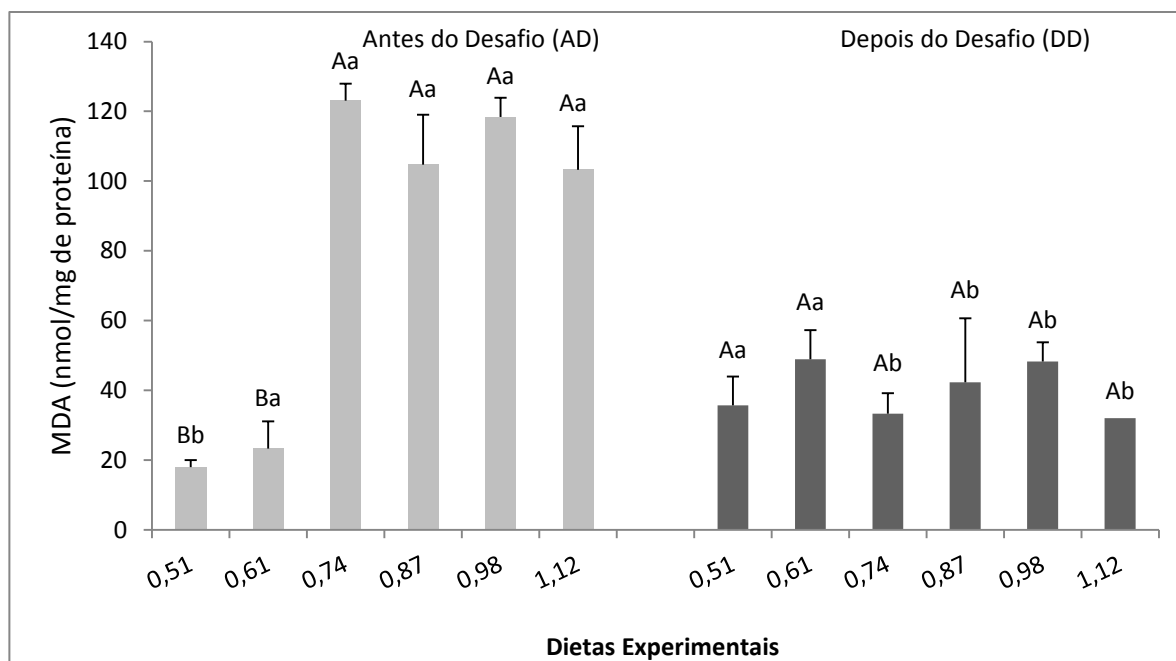


Figura 13. Atividade da lipoperoxidação (MDA) dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) alimentados com diferentes níveis de inclusão de histidina na dieta. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre desafio e maiúsculas entre tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9. Valores médios e valores de P dos indicadores de estresse oxidativo dos juvenis de tilápia (*O. niloticus*) após 60 dias de alimentação com diferentes inclusões de histidina na dieta e desafio com LPS.

Variáveis	% Histidina						COLETAS		Two-way ANOVA		
	0,48	0,6	0,75	0,9	1,05	1,2	AD	DD	Dietas	Coleta	Interação
MDA (nmol/mg de proteína)	26,81	36,11	78,2	73,5	83,33	67,62	81,76a	40,10b	<.0001	<.0001	<.0001
NAD(P)H (URF)	43,87ab	56,16a	38,60b	44,54ab	48,68ab	39,57ab	48,54	41,93	0,0490	0,0534	0.0706
GSH (nmol/mg de proteína)	2,01	1,86	1,68	2,34	1,50	1,98	2,18	1,61	0,8012	0,1182	0.2800
GSSG (nmol/mg de proteína)	0,07	0,12	0,11	0,07	0,11	0,06	0,12a	0,05b	0,4371	0,0015	0.1866

Média (n=6). Letras distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). MDA = lipoperoxidação. NAD(P)H = estado oxidativo dos nucleotídeos de piridina. GSH = glutatona reduzida. GSSG = glutatona oxidada.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o estabelecimento da necessidade de aminoácidos na dieta tem sido um dos principais focos nas pesquisas sobre nutrição de peixes, principalmente devido aos esforços para produzir não apenas dietas de baixo custo, mas também alimentos que potencializem o desempenho de crescimento e a saúde dos peixes (MICHELATO et al., 2017). No entanto, poucos estudos foram realizados para averiguar a influência que a inclusão de histidina na dieta exerce sobre o estado de saúde e sistema antioxidante da tilápia.

Nesse sentido não foi observado efeito significativo dos níveis de inclusão de histidina na dieta no peso final, peso do fígado e índice hepatossomático nos juvenis de tilápia. Segundo as tabelas brasileiras para nutrição de tilápias, a exigência do aminoácido histidina para juvenis pós-reversão até 100 g (faixa de peso utilizada neste experimento) é de 0,52% (FURUYA, 2010). Como todas as dietas atendiam a exigência da espécie para este aminoácido, não foi possível observar influência direta da suplementação nas variáveis de desempenho apresentadas. Além de atender a exigência, o aminoácido histidina não está ligado diretamente ao desempenho de crescimento dos peixes (FURUYA et al., 2004).

Foi observado um aumento no índice hepatossomático em um estudo que avaliou os efeitos da suplementação de L-histidina no crescimento, conversão alimentar, ganho de proteína e retenção de histidina em catfish (*Heteropneustes fossilis*) nos grupos que receberam as dietas com excesso de histidina (FARHAT, 2013). No presente estudo, os parâmetros de desempenho avaliados não foram diretamente influenciados pelos níveis de inclusão de histidina na dieta.

Algumas respostas imunes foram avaliadas, dentre elas a atividade respiratória de leucócitos, que avalia a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos fagócitos competentes, para destruição de patógenos invasores; e foi possível observar que os peixes alimentados com as dietas contendo 0,51; 0,74; 0,87 e 1,12% de inclusão de histidina apresentaram maiores atividades respiratórias de leucócitos, comparadas aos tratamentos 0,61 e 0,98%. Entretanto, após os peixes serem desafiados com LPS, a atividade respiratória dos leucócitos diminuiu significativamente, independentemente da dieta, sugerindo que esta resposta de defesa pode ter sido suprimida, possivelmente para evitar a superprodução de radicais livres, e consequentemente o estresse oxidativo (BILLER-TAKAHASHI et al., 2015).

A histidina, através da ação da histidina descarboxilase origina histamina, principal mediador de reações inflamatórias (TANAKA e ICHIKAWA, 2006). A histamina é importante para a regulação da atividade fagocitária, além de inibir fortemente a atividade respiratória dos fagócitos induzidas por desafio bacteriano, junto ao agonista da piridiletamina H1R. Os resultados obtidos no nosso trabalho sugerem que a histamina regula as funções fagocitárias nos peixes de maneira bastante complexa, envolvendo diferentes receptores.

A lisozima é uma importante proteína de defesa do sistema imunológico inato de peixes (SAURABH e SAHOO, 2008), onde sua atividade tem sido usada para avaliar a capacidade de defesa inespecífica em muitas espécies de peixes. Embora a atividade da lisozima entre as espécies de peixes possa ser diferente (SAURABH e SAHOO, 2008), no experimento atual, a menor atividade de lisozima plasmática foi encontrada nos grupos que receberam os tratamentos contendo 0,98 e 1,12% de histidina, indicando que as respostas de defesa dos peixes foram afetadas pela inclusão de níveis elevados de histidina na dieta (HAN, et al., 2013).

Após os peixes serem desafiados, os valores na concentração de lisozima praticamente dobraram, principalmente para o tratamento com inclusão de 0,74%, demonstrando a capacidade que os animais tiveram de responder após o reconhecimento do patógeno através destas proteínas a fim de defender o organismo contra o invasor.

A glicoproteína rica em histidina presente no plasma dos peixes é capaz de regular vários processos metabólicos, inclusive à ativação do sistema complemento (JONES et al., 2005). Uma deficiência de histidina na dieta pode diminuir a concentração dessa glicoproteína, prejudicando a resposta imune. Além disso, uma ingestão inadequada de histidina na dieta reduziu a resposta imune em galinhas, que pode ser revertida através de sua suplementação na dieta (KONASHI et al. 2000). Essa influência que a histidina exerce sobre a ativação do sistema complemento dos peixes não foi observada no presente trabalho.

O efeito protetor contra o dano oxidativo está relacionado à capacidade de eliminação das ERO, realizadas por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Em um estudo realizado com *Megalobrama amblycephala* (YANG et al., 2018), os autores indicaram que a atividade das enzimas antioxidantes apresentou queda na atividade conforme os níveis de histidina na dieta aumentaram. As dietas com 8 e 9,9 g kg⁻¹ apresentaram

atividades reduzidas dessas enzimas. O mesmo comportamento foi observado no presente trabalho, onde a atividade das enzimas oxidativas foi significativamente menor nos tratamentos com maior nível de inclusão de histidina dietética, indicando que a histidina pode estar envolvida no processo de eliminação dos radicais livres, pois uma vez que o dano oxidativo foi suprimido, as atividades dessas enzimas antioxidantes são suprimidas também.

Em contrapartida, quando os animais foram submetidos ao desafio com LPS, o tratamento com inclusão de 0,74% de histidina proporcionou maiores atividades para lisozima, SOD, CAT e GPx. Foi demonstrado que o desafio estimulou a defesa não específica de animais contra infecções, melhorando a atividade da lisozima, e promoveu um desequilíbrio no status oxidativo sistêmico através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Consequentemente, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes na tentativa de evitar dano oxidativo irreversível.

De forma semelhante, as atividades de SOD e CAT no hepatopâncreas foram reduzidas com o aumento dos níveis dietéticos de histidina em juvenis de carpa Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian). Uma possível explicação poderia ser que essas atividades de enzimas antioxidantes no hepatopâncreas foram inativadas pela geração de ERO (LIN et al., 2013).

Em juvenis de Jian carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian), o aumento de histidina na dieta reduziu a geração e aumentou a eliminação de espécies reativas de oxigênio (FENG et al., 2013). A capacidade de eliminação do radical superóxido também foi aprimorada devida à suplementação de histidina na dieta.

A peroxidação lipídica pode ser definida como a deterioração oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados, e é uma consequência importante do estresse oxidativo, conforme indicado pelos níveis de malondialdeído (MDA), que é um metabólito derivado da oxidação lipídica (MOURENTE et al., 2007). O presente estudo mostrou que o conteúdo de MDA foi elevado nos tratamentos com maiores suplementações de histidina na dieta antes do desafio, o que indicou que a peroxidação lipídica foi estimulada pela histidina, induzindo mudanças no estado redox das células hepáticas.

A modificação oxidativa de proteínas envolve a conversão de aminoácidos em suas formas oxidadas e o resíduo de histidina é um dos principais alvos de dano durante o ataque radical às proteínas (UCHIDA, 2003). Os resultados do presente estudo sugerem que o nível ideal de histidina na dieta pode suprimir o estresse oxidativo; assim como de forma inversa, os níveis incluídos em excesso, favoreceram a geração

de malondialdeído, induzindo um aumento na atividade das enzimas antioxidantes hepáticas.

Erickson e Hultin (1988, 1992) sugeriram que a histidina é capaz de inibir a geração do radical hidroxila (OH) por sua capacidade de interferir na reação de Fenton, juntamente com ferro e cobre. A histidina também pode formar um complexo rígido com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, assim, diminuir a taxa de formação do radical hidroxila (OH-) (CHEVION, 1988). Portanto, a diminuição da peroxidação lipídica nos grupos que receberam dietas com inclusão de 0,48 e 0,60% pode ter sido em parte devido à promoção da capacidade de eliminação de OH-. De certa forma, a inclusão de histidina nestes níveis aliviou o dano oxidativo de duas maneiras principais: diminuindo a geração e / ou aumentando a eliminação de ERO. A glutathione na sua forma reduzida (GSH) é um tripeptídeo contendo um grupo tiol e é um importante antioxidante não enzimático protetor contra radicais livres e outros oxidantes (RAHMAN e MACNEE 2000). O presente estudo indicou que o conteúdo de GSH no fígado das tilápias não sofreu influência de inclusão de histidina na dieta. Esses resultados discordam dos encontrados por Liu et al. (2008) que observaram que a histidina foi capaz de melhorar o efeito protetor da GSH em fígados de camundongos.

Após a exposição da GSH a qualquer agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. Sua recuperação depende da enzima glutathione redutase (GR) e é importante para manter a integridade do sistema de proteção celular. A GR é uma flavoproteína dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NAD(P)H), e, portanto, também depende da integridade da via das pentoses. Sob condições de excesso de agente oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, caracterizando estresse oxidativo. No presente trabalho, a histidina não foi capaz de estimular um quadro de estresse oxidativo, pelo contrário, ela contribuiu para as defesas enzimáticas e não enzimáticas desse importante mecanismo de proteção celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em resumo, o presente trabalho mostrou que a inclusão em níveis adequados de histidina na dieta pode potencializar as atividades das enzimas antioxidantes, aumentar a capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio reduzindo a peroxidação lipídica e os danos oxidativos nos fígados das tilápias. No entanto, mais estudos devem ser realizados para revelar os mecanismos subjacentes da histidina na dieta sobre a capacidade antioxidante dessa e demais espécies de peixes. No geral, essas abordagens desempenharão um papel importante no desenvolvimento de alimentos

nutricionalmente equilibrados, econômicos, ecológicos e saudáveis para a produção sustentável de peixes na aquicultura.

CONCLUSÃO

A suplementação de 0,74% histidina na dieta contribuiu para a melhora da atividade da lisozima, além das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, principalmente após as tilápias serem submetidas ao desafio com lipopolissacarídeo. A histidina exerce influência positiva sobre o sistema imune e defesas oxidativas de juvenis de tilápia. Entretanto, a inclusão de níveis muito acima da exigência da espécie podem comprometer as capacidades de defesa inata e oxidativa.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. (1984) Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126.
- AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. (1998). Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 27–37.
- AKIYAMA, T., ARAI, S., MURAI, T., & NOSE, T. (1985). Threonine, histidine and lysine requirements of chum salmon fry. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 51, p. 635–639.
- BAI, S. C.; GATLIN, D. M. (1994). Effects of L-lysine supplementation of diets with different protein levels and sources on channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture and Fisheries Management**, v.25, p.465-474.
- BARTON, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413-420.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. (2012). Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 237-241.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., SAITA, M. V., GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C., (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L.S., MINGATTO, F. E., URBINATI, E.C. (2015). The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, p. 360-367.
- BLAZER, V. (1992). Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 309-323.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978
- CHEVION, M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox active transition metals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 5, p. 27–37.
- CONCEICAO, L. E. C.; ARAGAO, C.; DIAS, J.; COSTAS, B.; TEROVA, G.; MARTINS, C.; TORT, L. (2012). Dietary nitrogen and fish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 119-141.
- DAVIES, S.J.; MORRIS, P.C.; BAKER, R.T. (1997). Partial substitution of fish meal and full-fat soya bean meal with wheat gluten and influence of lysine supplementation in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v.28, p. 317-328.
- DIÓGENES, A. F., FERNANDES, J. B. K., DORIGAM, J.C.P., SAKOMURA, N. K., RODRIGUES, F. H. F., LIMA, AND B. T. M., GONÇALVES, F. H. (2016): Establishing the optimal essential amino acid ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method, **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 435-443.
- DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. (2002). The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 13, p. 183-198.
- ELLIS, A. E. (1999). Immunity to bacteria to fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 291-308.
- ELLIS, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839.

- ERICKSON, M. C.; HULTIN, H. O. (1988) A unique role of histidine in Fe-catalyzed lipid oxidation by fish sarcoplasmic reticulum. **Oxygen Radicals in Biology and Medicine**, v. 49, p. 307–312.
- ERICKSON, M. C.; HULTIN, H. O. (1992) Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 292, p. 427–432.
- FARHAT, M. A. K. (2013) Effects of varying levels os dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerling stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Block). **Aquaculture**, v. 404-405, p. 130-138.
- FENG, L.; ZHAO, B.; CHEND, G.; JIANG, W.; LIU, Y.; JIANG, J.; HU, K.; LI, S.; ZHOU, X. (2013) Effects of dietary histidine on antioxidant capacity in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 559-571.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina do Brasil**, v. 43, p. 61-68.
- FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PEZZATO, A. C. (2004). Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, v.35, p.1110-1116.
- FURUYA, W. M. (2010). **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM. 100p.
- HABTE-TSION, H. M., REN, M., LIU, B., GE, X., XIE, J., & CHEN, R. (2016). Threonine modulates immune response, antioxidant status and gene expressions of antioxidant enzymes and antioxidant-immunecytokine-related signaling molecules in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 51, p. 189–199.
- HAN, Y.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S. (2013). Interactive effects of dietary arginine and histidine on the performances of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. **Aquaculture**, v. 414-415, p. 173-182.
- HISSIN, P.J.; HILF, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, p. 214-226.
- JONES, A. L.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. (2005) Histidine-rich glycoproteins: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, p. 106–118.
- KLEIN, J. (1990) **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. p.311 -334.
- KONASHI, S.; TAKAHASHI, K.; AKIBA, Y. (2000) Effects of dietary essential amino acid deficiencies on immunological variables in broiler chickens. **The British Journal of Nutrition**, v. 83, p. 449–456.
- LI, P., YIN, Y.-L., LI, D., WOO KIM, S., WU, G., 2007. Amino acids and immune function. **The British Journal of Nutrition**. v. 98, p. 237–252.
- LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**. v. 37, p. 43-53.
- LIN, F., BO, Z., CHEN, G., JIANG, W., YANG, L., JIANG, J.; ZHOU, X. (2013). Effects of dietary histidine on antioxidant capacity in juvenile jian carp (*Cyprinus carpio*, var. Jian). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 559-571.
- LIU, W. H.; LIU, T. C.; YIN, M. C. (2008). Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver injury. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1503–1509.
- MICHELATO, M., ZAMINHAN, M., BOSCOLO, W. R., NOGAROTO, V., VICARI, M., ARTONI, R. F., FURUYA, V. R. B., AND FURUYA, W. M. (2017): Dietary histidine requirement of Nile tilapia juveniles

based on growth performance, expression of muscle-growth-related genes and haematological responses, **Aquaculture**, v. 467, p. 63-70.

MOURENTE, G.; BELL, J. G.; TOCHER, D. R. (2007) Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 269–280.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (1993). *Nutrient Requirements of Fish*. Washington, DC: National Academy Press.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*, Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington DC, USA: The National Academies Press.

PARRY, Jr. R. M.; CHANDAN, C. R.; SHAHANI, M. K. (1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. **Experimental Biology and Medicine**.

PAULSEN, S. M.; LUNDE, H.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. (2003). In vivo effects of Bglucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39- 54.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A., HIDALGO, M.C., MORALES, A.E., ARIZCUN, M., ABELLÁN, E., CARDENETE, G. (2009). Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on different dietary macronutrient levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 150, 537-545.

RAHMAN I, MACNEE W (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. **The European Respiratory Journal**, v. 16, p. 534–554.

RIEGER, A. M.; BARREDA, D. R. (2011). Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 1238-1245.

SANTIAGO, C. B.; LOVELL, R. T. (1988). Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 1540-1546.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 223–239.

SECOMBES, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defense. In: IWAMA G, NAKANISHI T, editors. *The fish immune system*. San Diego, USA: **Academic Press** Inc; 1-378.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. (1949). The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v.58, p.731-736.

TANAKA S & ICHIKAWA A (2006) Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: immune regulatory roles of histamine produced by leukocytes. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 101, p. 19–23.

UCHIDA, K. (2003) Histidine and lysine as targets of oxidative modification. **Amino Acids**, v. 25, p. 249–257.

WANG, B., FENG, L., CHEN, G. F., JIANG, W. D., LIU, Y., KUANG, S. Y. ZHOU, Z. Q. (2016). Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian) intestinal immune responses, antioxidant status and tight junction protein mRNA expression are modulated via nrf2 and pkc in response to dietary arginine deficiency. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 51, p. 116–124.

WON, K. M.; KIM, S. M.; PARK, S. I. (2004). The effects of b-1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology**, v. 17, p. 29–38.

YANG, Q.; LIANG, H.; MOKRANI, A.; JI, K.; YU, H.; GE, X.; REN, X.; XIE, J.; PAN, L.; SUN, A. (2018). Dietary histidine affects intestinal antioxidant enzyme activities, antioxidant gene expressions and

inflammatory factors in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, p. 249-259.

ZHAO, B., FENG, L., LIU, Y., KUANG, S.-Y., TANG, L., JIANG, J., ... ZHOU, X.-Q. (2012). Effects of dietary histidine levels on growth performance, body composition and intestinal enzymes activities of juvenile jian carp (*cyprinus carpio* var. jian). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 220–232.

ZHOU, Q., JIN, M., ELMADA, Z. C., LIANG, X., & MAI, K. (2015). Growth, immune response and resistance to aeromonas hydrophila, of juvenile yellow catfish, *pelteobagrus fulvidraco*, fed diets with different arginine levels. **Aquaculture**, v. 437, p. 84–91.