

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

WELITON VILHALBA DA SILVA

**DANOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS PELA TEMPERATURA E O POSSÍVEL
PAPEL MITIGADOR DA TAURINA**

Jaboticabal-SP

Julho de 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**DANOS FISIOLÓGICOS CAUSADOS PELA TEMPEREATURA E O POSSÍVEL
PAPEL MITIGADOR DA TAURINA**

Weliton Vilhalba da Silva

Orientadora: Prof^a. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientadora: Dra. Camila de Fátima Pereira de Faria

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal-SP

Julho de 2024

V711d	Vilhalba, Weliton da Silva Danos fisiológicos causados pela temperatura e o possível papel mitigador da taurina : respostas fisiológicas à exposição aguda e crônica do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) à baixa temperatura e sua modulação pela suplementação de dietas com taurina / Weliton da Silva Vilhalba. -- Jaboticabal, 2024 80 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati Coorientadora: Camila de Fátima Pereira de Faria 1. Aminoácidos na nutrição. 2. <i>Piaractus mesopotamicus</i>. 3. Estresse. 4. Ação antioxidante. 5. Sistema imunológico. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Suplementação de dietas com taurina para *Piaractus mesopotamicus* e respostas fisiológicas a desafios de estresse agudo e crônico causado por exposição a baixa temperatura

AUTOR: WELITON VILHALBA DA SILVA

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

COORIENTADORA: CAMILA DE FÁTIMA PEREIRA DE FARIA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente



ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Data: 21/07/2024 11:28:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP

Documento assinado digitalmente



FABIANO BENDHACK

Data: 19/07/2024 12:05:44-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. FABIANO BENDHACK (Participação Virtual)
Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná / UFPR, Pontal do Paraná-PR

Documento assinado digitalmente



CLAUCIA APARECIDA HONORATO DA SILVA

Data: 21/07/2024 10:53:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CLAUCIA APARECIDA HONORATO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Aquicultura / UFGD, Dourados-MS

Jaboticabal, 15 de julho de 2024

APOIO FINANCEIRO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado, processo número 130951/2022-6.

SUMÁRIO

1	Aquicultura e os fatores do ambiente de criação considerados estressores -----	6
2	Estresse em peixes -----	7
3	Sistema imune -----	8
4	Sistema antioxidante/estresse oxidativo -----	10
5	Impactos da temperatura na fisiologia dos peixes e na produção -----	11
6	Taurina-----	12
7	Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) como modelo biológico-----	14
8	Referências -----	17
1	Introdução -----	33
2	Materiais e métodos-----	35
2.1	Protocolo experimental -----	35
2.1.1	Qualidade da água-----	36
3	Análises laboratoriais-----	37
3.1	Biomarcadores de estresse -----	38
3.2	Biomarcadores de imunidade inata -----	38
3.3	Avaliações hematológicas-----	39
3.4	Biomarcadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo -----	40
3.4.1	Atividade da enzima superóxido dismutase -----	40
3.4.2	Atividade da enzima catalase-----	40
3.4.3	Atividade da enzima glutational peroxidase -----	40
3.4.4	Atividade da enzima glutational S-transferase-----	41
3.4.5	Concentração hepática da glutational reduzida (GSH) -----	41
3.4.6	Peroxidação lipídica -----	41
3.5	Biomarcadores metabólicos sanguíneos-----	41
3.5.1	Concentração plasmática de triglicérides -----	41

3.5.2	Concentração sérica de colesterol-----	42
3.5.3	Concentração plasmática de proteína total -----	42
3.6	Biomarcadores teciduais-----	42
3.6.1	Perfil lipídico tecidual (fígado e músculo) -----	42
3.6.2	Concentração hepática de proteínas totais -----	43
3.6.3	Concentração hepática de glicogênio -----	43
3.7	Indicadores do desempenho zootécnico (ganho de peso; taxa de crescimento específico e conversão alimentar) -----	44
3.7.1	Ganho de peso (GP)-----	44
3.7.2	Taxa de crescimento específico (TCE)-----	44
3.7.3	Conversão alimentar (CA)-----	44
3.8	Índices morfométricos -----	45
4	Análise estatística -----	45
5	Resultados-----	46
5.1	Biomarcadores de estresse (concentrações plasmáticas de cortisol e glicose)	46
5.2	Biomarcadores de imunidade inata (Atividade respiratória dos leucócitos (ARL), Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC), concentração sérica da lisozima)	46
5.2.1	Atividade respiratória de leucócitos (ARL) -----	46
5.2.2	Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC)-----	46
5.2.3	Concentração sérica de lisozima -----	47
5.3	Contagem de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e monócitos circulante-----	48
5.4	Biomarcadores do sistema antioxidante (SOD, CAT, GPx, GST, GSH, LPO)	49
5.4.1	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) -----	49
5.4.2	Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) -----	49
5.4.3	Atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST)-----	49
5.4.4	Concentração da glutathiona reduzida (GSH) -----	50

5.5	Biomarcadores metabólicos (concentração plasmática de triglicerídeos, sérica de colesterol e proteína total)-----	51
5.5.1	Concentração plasmática de triglicerídeos -----	51
5.5.2	Concentração sérica de colesterol-----	51
5.5.3	Concentração plasmática de proteína total -----	51
5.6	Biomarcadores teciduais (concentração de lipídeo hepático e muscular, concentração de proteína hepática, concentração de glicogênio hepático) -----	52
5.6.1	Concentração de lipídeo hepático e muscular-----	52
5.6.2	Concentração de proteína total hepática -----	52
5.6.3	Concentração de glicogênio hepático -----	53
5.7	Indicadores de desempenho (Peso médio final, ganho de peso, taxa de crescimento específica, conversão alimentar)-----	53
5.8	Indicadores morfométricos (IHS e IGVS) -----	54
6	Discussão-----	56
7	Conclusão -----	61
8	Referências -----	62

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Esquema demonstrativo do período dos peixes em diferentes temperaturas e momento de cada amostragem.....	36
Figura II. Concentração de cortisol (A) e glicose (B) do plasma no sangue de juvenis de pacu alimentados por 43 dias.	46
Figura III. Atividade Respiratória dos Leucócitos (ARL) (A) do sangue com heparina, Atividade Hemolítica do sistema Complemento (AHC) (B) do soro do sangue e concentração sérica de lisozima (C) do soro do sangue sem anticoagulante de juvenis de pacu alimentados por 43 dias.	47
Figura IV. Número de Neutrófilos (A), Eosinófilos (B), Monócitos (C) e Linfócitos (D) circulantes no sangue em juvenis de pacu alimentados por 43 dias.....	48
Figura V. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), glutathione peroxidase (GPx) (C) e glutathione-S-transferase (GST) (D) no fígado de juvenis de pacu alimentados por 43 dias.....	50
Figura VI. Concentração da glutathione reduzida (GSH) (A) e determinação da peroxidação lipídica (LPO) (B) no fígado de juvenis de pacu alimentados por 43 dias.....	51
Figura VII. Concentração de triglicerídeos no plasma (A), concentração de colesterol no soro (B) e proteína plasmática (C) de juvenis de pacu alimentados por 43 dias.....	52
Figura VIII. Concentração de lipídeo hepático (A), muscular (B), concentração de proteína total hepática (C) e concentração de glicogênio hepático (D) de juvenis de pacu alimentados por 43 dias.....	53
Figura IX. Índice Hepatossomático (IHS) (A) e Índice Gordura Viscero-somático (IGVS) (B) em juvenis de pacu alimentados por 43 dias.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Qualidade da água do sistema de recirculação de pacus alimentados com diferentes porcentagens de taurina na ração.....	37
Tabela 2. Desempenho produtivo do <i>P. mesopotamicus</i> alimentados com dietas suplementadas de taurina por 43 dias.....	54

RESUMO

Uma série de estressores em um sistema de cultivo de peixes pode levar o animal a uma condição de vulnerabilidade, ativando uma sequência de reações metabólicas e do sistema imunológico, que impõem uma sobrecarga no sistema de produção de energia e afetam o equilíbrio redox celular. Em caso de se ultrapassar a capacidade de ajuste do organismo, pode ocorrer danos oxidativos em diferentes estruturas celulares, o que se reflete em vários sistemas biológicos e na qualidade de vida dos peixes, com prejuízo para a produção. A suplementação da dieta com substâncias que previnam ou reduzam o impacto do estresse nos diferentes sistemas afetados é uma estratégia que deve ser testada quanto aos potenciais benefícios que pode promover. Desta forma, esse trabalho avaliou se a suplementação de taurina (TAU) em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) possui efeito protetor ou remediador de efeitos causados no sistema de estresse, da imunidade e do sistema antioxidante dos peixes expostos à baixa temperatura, de forma aguda e crônica, bem como uma melhora na resposta de desempenho dos peixes alimentados com suplementação de TAU. Um total de 84 pacus jovem ($122,23 \pm 41,17\text{g}$ e $23,01 \pm 17,95\text{cm}$, média $\pm$ DP) foi alimentado com ração suplementada de TAU (1; 2 e 4 % de taurina/kg ração) por 43 dias, quando foram mantidos a 28 °C, seguido de exposição por 24 horas e 7 dias a 16 °C. Os indicadores de respostas metabólicas, de estresse, da imunidade e do sistema antioxidante foram avaliados no sangue e tecidos (fígado e músculo). Os resultados encontrados mostram que a suplementação de 2% TAU proporcionou maiores concentrações de cortisol nos peixes, entre os tratamentos, após exposição crônica ao frio. Os peixes de todos os tratamentos apresentaram aumento da glicose frente a cronicidade estressora. A suplementação dietética de 1 e 2 % TAU proporcionou diminuição da atividade respiratória dos leucócitos (ARL) frente ao estressor de forma aguda, no entanto, apenas com suplementação de 2% TAU manteve baixo os valores de ARL nos peixes após a cronicidade estressora. A atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) nos peixes não teve um padrão claro de resposta, no entanto a taurina suplementada em 2% proporcionou maior AHC nos peixes após 43 dias de alimentação e maior atividade nos peixes alimentados com suplementação de 1% TAU após a cronicidade estressora. A concentração de lisozima foi maior nos peixes alimentados com suplementação de 2% TAU após 43 dias de alimentação, comparados aos peixes da dieta controle. O sistema antioxidante dos peixes foi ativado após estresse térmico a 16°C e a suplementação com TAU modulou, cronicamente, o sistema antioxidante da superóxido dismutase (SOD), glutationala peroxidase (GPx) e glutationala

reduzida (GHS) com suplementação de TAU (2%, 1%, 2% e 4%, respectivamente) dos peixes após estímulo estressor térmico. A suplementação de 1% TAU promoveu o melhor desempenho de crescimento e de aproveitamento do alimento pelos peixes, assim como os níveis suplementares de 2% e 4% TAU aumentou o percentual de ganho de peso dos peixes. Concluindo assim que a exposição crônica do pacu a 16°C se mostrou promotor de estresse nos peixes, considerando o perfil das concentrações sanguíneas de glicose. A taurina ativou agudamente o sistema complemento e modulou o sistema antioxidante. Bem como a suplementação de TAU demonstrou melhorar o desempenho dos peixes.

Palavras-chave: aminoácido na nutrição; pacu; estresse; sistema antioxidante; sistema imune; homeostase.

ABSTRACT

A series of stressors in a fish farming system can lead the animal to a vulnerable condition, activating a sequence of metabolic and immune system reactions, which impose an overload on the energy production system and affect cellular redox balance. If the organism's ability to adjust is exceeded, oxidative damage can occur in different cellular structures, which is reflected in various biological systems and in the quality of life of fish, with harm to production. Supplementing the diet with substances that prevent or reduce the impact of stress on the different affected systems is a strategy that should be tested for the potential benefits it can promote. Thus, this work evaluated whether taurine (TAU) supplementation in diets for juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) has a protective or remedial effect on the effects caused on the stress system, immunity and antioxidant system of fish exposed to low temperature, acutely and chronically, as well as an improvement in the performance response of fish fed with TAU supplementation. A total of 84 young pacus ($122.23 \pm 41.17\text{g}$ and $23.01 \pm 17.95\text{cm}$, mean $\pm$ SD) were fed TAU-supplemented feed (1, 2 and 4% taurine/kg feed) for 43 days, when they were kept at 28 °C, followed by exposure for 24 hours and 7 days at 16 °C. Indicators of metabolic responses, stress, immunity and the antioxidant system were evaluated in blood and tissues (liver and muscle). The results found show that 2% TAU supplementation provided higher concentrations of cortisol in fish, between treatments, after chronic exposure to cold. Fish from all treatments showed an increase in glucose in the face of chronic stress. Dietary supplementation of 1 and 2% TAU provided a decrease in the respiratory activity of leukocytes (ARL) in the face of the stressor in an acute form, however, only 2% TAU supplementation maintained low ARL values in fish after the chronic stressor. The hemolytic activity of the complement system (AHC) in fish did not have a clear pattern of response, however taurine supplemented at 2% provided greater AHC in fish after 43 days of feeding and greater activity in fish fed with 1% TAU supplementation after stressful chronicity. Lysozyme concentration was higher in fish fed with 2% TAU supplementation after 43 days of feeding, compared to fish on the control diet. The fish antioxidant system was activated after heat stress

at 16°C and TAU supplementation chronically modulated the antioxidant system of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and reduced glutathione (GHS) with TAU supplementation (2 %, 1%, 2% and 4%, respectively) of fish after thermal stressor stimulation. The 1% TAU supplementation promoted better growth performance and food utilization by the fish, just as the supplemental levels of 2% and 4% TAU increased the percentage of fish weight gain. Concluding that the chronic exposure of pacu to 16°C proved to promote stress in fish, considering the profile of blood glucose concentrations. Taurine acutely activated the complement system and modulated the antioxidant system. As well as TAU supplementation has been shown to improve fish performance.

Kay words: amino acid in nutrition; pacu; stress; antioxidant system; Imune system; homeostasis.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 Aquicultura e os fatores do ambiente de criação considerados estressores

A produção de peixes vem se intensificando a cada novo ano, em todo o mundo. No Brasil, a produção foi 887.029 toneladas em 2023 e, só o estado de São Paulo participou com um total de 75.700 toneladas. As espécies nativas atingiram um total de 263.479 toneladas no mesmo ano (PeixeBR, 2024). Os peixes nativos têm tido um papel significativo no desenvolvimento da aquicultura no país, pois nos últimos anos houve um número crescente na produção e na pesquisa nacional, priorizando essas espécies (Saint-Paul, 2017; Valenti *et al.*, 2021).

Apesar da intensificação no cultivo ser benéfica para os produtores aumentando a produtividade, em criações intensivas de peixes, inúmeros fatores, de diferentes naturezas, são considerados estressantes. Podendo ser de natureza química como variações de oxigênio dissolvido na água, concentração elevada de amônia e nitrito decorrente da degradação de matéria orgânica e presença de poluentes orgânicos e inorgânicos (Costa *et al.*, 2004) ou de natureza física como manuseio, altas densidades de estocagem, confinamento, variação na temperatura da água, captura ou transporte (Urbinati *et al.*, 2004b; Baldisseroto, 2009; Diniz & Honorato, 2012; Leira *et al.*, 2017). O estresse é o principal fator que tem causado prejuízo econômico nas pisciculturas, uma vez que interfere na homeostase biológica, afetando o metabolismo e a imunidade e, conseqüentemente, o desempenho dos peixes, que seja em relação ao crescimento, reprodução e imunidade (Wendelaar Bonga, 2011).

A exposição dos peixes aos diferentes estressores pode ser tanto rápida e intensa (aguda) quanto prolongada e contínua (crônica) e é um evento frequente e inevitável na rotina de uma piscicultura (Barcellos *et al.*, 2018). Enquanto a resposta de estresse desenvolve um mecanismo adaptativo diante de ameaças agudas e de curto prazo, a exposição contínua ou crônica ao estressor pode resultar em danos ao sistema de defesa, crescimento e capacidade reprodutiva dos peixes (McEwen, 2007; Russell & Lightman, 2019; Bienertova-Vasku *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021).

Os peixes absorvem o oxigênio dissolvido na água por meio de trocas gasosas nas brânquias. Para a maioria das espécies de peixes tropicais, é crucial que a concentração mínima de oxigênio dissolvido na água seja superior a 4 mg/L, quando expostos a concentrações inferiores por períodos prolongados, os peixes enfrentam estresse (Leira *et al.*, 2017b). Concentração de resíduos nitrogenados como amônia ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) e nitrito (NO_2^-) que são os principais produtos de excreção derivados do metabolismo de proteínas da dieta, podem

alcançar níveis tóxicos em sistemas intensivos mal manejados. A forma tóxica da amônia (NH_3) é eliminada por difusão passiva pelas brânquias dos peixes, no entanto, quando há alta concentração de NH_3 na água do viveiro, reduz o gradiente de concentração entre o meio interno (sangue) e o meio externo (água) e sua eliminação pelos peixes é dificultada, levando a um aumento na concentração interna e consequentes alterações fisiológicas negativas. O nitrito, em concentrações superiores às toleradas pelos peixes, pode afetar a capacidade de transporte de oxigênio, dificultando a ligação de O_2 com a hemoglobina, podendo ocasionar hipóxia ou até anoxia nos peixes (Urbinati *et al.*, 2004b; Oba *et al.*, 2009; Leira *et al.*, 2017a).

2 Estresse em peixes

Hans Selye (1936) descreve em 1930 como “síndrome da adaptação geral” que diferentes indivíduos apresentam um mesmo padrão de resposta fisiológica para uma série de situações sensoriais tendo efeitos nocivos em órgão, tecidos ou processos metabólicos.

Quando confrontados com uma ameaça ou expostos a condições ambientais adversas, a maioria dos peixes manifesta uma série de mudanças orgânicas, fisiológicas e comportamentais, que aumentam suas chances de sobrevivência imediata (Dhabhar, 2000; Dang *et al.*, 2019). Essas mudanças são marcadas pelo redirecionamento do investimento energético do corpo para órgãos prioritários como coração, músculo e cérebro, que sustentam e intensificam os processos vitais, permitindo que o peixe evite ou supere a ameaça imediata, desviando a atenção do organismo de funções consideradas não essenciais no momento.

A reação do peixe à exposição de um agente estressor pode ser dividida em três etapas. Primeiramente ocorre a fase de alarme, quando o organismo reconhece o estímulo como estressante, gerando a ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI), resultando na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroides, respectivamente (Winberg *et al.*, 2016).

No segundo estágio, denominado de adaptação, em resposta aos hormônios liberados pelos dois eixos ativados, ocorrem mudanças com as quais o organismo busca manter a homeostase biológica (Schreck & Tort, 2016), como aumento da taxa cardiorrespiratória e mobilização de energia a partir de reservas de hidratos de carbono, lipídeos e proteínas (Iwama *et al.*, 2004). Na fase adaptativa, enquanto as catecolaminas aumentam os níveis de glicose no plasma através da mobilização das reservas de glicogênio, os corticosteroides mantêm a hiperglicemia estimulando o catabolismo proteico e a gliconeogênese (Pankhurst, 2011; Tejpal

et al., 2009). A hipersecreção de catecolaminas e corticosteroides pode causar hemodiluição ou hemoconcentração em muitas espécies de peixes teleósteos, alterando os valores hematócritos e outros valores hematológicos (Tejpal *et al.*, 2009) e distúrbios osmorregulatórios (Carneiro, 2001; Baldisserotto *et al.*, 2008; Shields *et al.*, 2016). Nesta fase inicial, o sistema imune é agudamente ativado (Urbinati *et al.*, 2020).

Numa terceira fase, com o prolongamento da exposição do animal ao estressor, a capacidade de adaptação é superada e tem início um processo de exaustão biológica com comprometimento de funções como o crescimento, reprodução e resistência a doenças (Urbinati *et al.*, 2014).

3 Sistema imune

O sistema de defesa de um organismo é composto por diferentes mecanismos biológicos que identificam e combatem uma grande diversidade de elementos invasores. Os mecanismos formados por componentes celulares, que atacando os agentes virais que invadem o organismo e por componentes humorais, combatendo os antígenos e alertando o organismo sobre sua presença (Acunha *et al.*, 2023). O sistema imune é constituído por dois mecanismos de defesa, a imunidade inata e a imunidade adquirida. As respostas inatas são a primeira linha de defesa do organismo caracterizada pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio. Os peixes possuem um sistema imunológico semelhante ao dos vertebrados, utilizando respostas imune inatas e adquiridas mas, diferem por terem respostas imune e memória imunológica relativamente curta (Awad & Awaad, 2017).

O sistema linfóide dos peixes inclui os órgãos linfóides primários (rins, timo, baço) e os componentes do sistema de defesa, como mucosa da pele, brânquias, fígado e intestino, que apresentam estruturas especializadas na produção de linfócitos com papel fundamental no desenvolvimento das respostas imunológicas e produção de anticorpos (Urbinati *et al.*, 2014).

Na subdivisão do sistema imune, os componentes humorais responsáveis pela defesa imunológica dos peixes são inibidores de crescimento de bactérias, fatores de aglutinação, interferon, transferrina, antiprotease, lisozima, proteína C reativa, peptídeos bacterianos, proteínas do sistema complemento na via clássica ou alternativa e as lectinas (Urbinati *et al.*, 2014).

O sistema complemento é o principal facilitador no processo inflamatório juntamente com os anticorpos. É composto por um grupo de proteínas, encontrados tanto no plasma quanto

na membrana celular, sendo acionado por diferentes mecanismos através de duas vias, a clássica e a alternativa (Urbinati *et al.*, 2014) sendo produzido no fígado e macrófagos teciduais. A ativação do complemento é desencadeada por um componente central do sistema complemento (C3), do qual está envolvido na cascata de três vias (Merle *et al.*, 2015; Bruce & Brown, 2017). A via alternativa tem sido analisada em peixes, determinando o tempo em que as proteínas do sistema complemento lisam as hemácias de coelho (Biller-Takahashi *et al.*, 2012; Zanuzzo *et al.*, 2015).

A lisozima é encontrada na maioria das secreções biológicas, no muco e leucócitos (Saurabh & Sahoo, 2008; Magnadóttir, 2010; Gomez *et al.*, 2013). Sua atividade é reportada no muco tegumentar, soro, brânquia, fígado, músculo e tecidos onde há a presença de leucócitos (Saurabh & Sahoo, 2008). Sua concentração ou atividade é um ótimo indicador da imunidade inata em peixes. Esta enzima tem ação opsonizante, ativa o sistema complemento e fagócitos (Magnadóttir, 2006; Saurabh & Sahoo, 2008).

Os indicadores celulares são compostos por células importantes do sistema imune inato, as chamadas células fagocíticas, sendo os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos / macrófagos e células citotóxicas (Magnadóttir, 2006). Um dos mecanismos de defesa mais importantes do sistema imune inato é a fagocitose, com papel primordial na defesa do organismo contra infecções (Ellis, 2001; Talpur & Ikhwanuddin, 2012; Biller-Takahashi *et al.*, 2015). Uma importante etapa dentre os diferentes processos de fagocitose é a chamada ‘explosão’ respiratória (2010; Talpur & Ikhwanuddin, 2012; Biller-Takahashi *et al.*, 2015). Durante este processo, o oxigênio é reduzido e através de uma série de reações metabólicas intracelulares, uma variedade de espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$), ânion oxigênio (O_2^-) e superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Betteridge, 2000). Esses mecanismos são importantes quando se pretende avaliar a capacidade microbiana e o metabolismo oxidativo dessas células.

O sistema imunológico dos peixes pode ser afetado quando os animais são submetidos a agentes estressores causados pela alta densidade de estocagem, manejo contínuo e/ou inadequado, ampla variação de temperatura e demais parâmetros de qualidade da água, utilização indiscriminada de antibióticos e quimioterápicos (Herrera *et al.*, 2019; Vanderzwalmen *et al.*, 2019).

4 Sistema antioxidante/estresse oxidativo

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema antioxidante de defesa do organismo. A oxidação é considerada um processo fundamental na vida aeróbica e no metabolismo celular, gerando naturalmente radicais livres ou devido a disfunções biológicas, seja por demanda do organismo ou aumento da atividade leucocitária (Aschbacher *et al.*, 2013; Biller & Takahashi, 2018). A produção de espécies reativas de oxigênio ocorre naturalmente nas células, principalmente nas mitocôndrias, membranas celulares, citoplasma e enzimas do citocromo P450, sendo as mitocôndrias as principais fontes de radicais livres através da cadeia de transporte de elétrons durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio (Barbosa *et al.*, 2010). As enzimas NADPH oxidases também contribuem para a geração de radicais livres, transferindo elétrons através da membrana celular (Biller & Takahashi, 2018).

Durante a respiração celular, em seu metabolismo inicial, a célula produz ATP através da redução completa do O_2 na crista mitocondrial, resultando na formação de água (Biller-Takahashi *et al.*, 2015). Contudo, o oxigênio também pode ser reduzido de maneira incompleta, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Espécies reativas como ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH), são classificados como radicais livres devido à presença de elétrons não emparelhados (Barreiros & David, 2006), levando-as a interagir com elétrons de outros átomos para alcançar estabilidade, afetando diversos alvos biológicos (Biller & Takahashi, 2018). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) atua como uma espécie intermediária, embora não tenha elétrons não emparelhados, pode gerar facilmente o radical OH através da reação de Fenton (Del Maestro, 1980). O radical hidroxil é considerado a EROs mais danosa, uma vez que não há antioxidante capaz de neutralizar sua ação devido à sua curta duração (Biller & Takahashi, 2018).

Para regular as concentrações intracelulares de EROs e prevenir danos, o organismo possui mecanismos de defesa conhecidos como sistema antioxidante. O dano oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio celular entre a produção de espécie reativas de oxigênio e os mecanismos antioxidantes responsáveis por neutralizá-las (Betteridge, 2000; Aschbacher *et al.*, 2013; Biller & Takahashi, 2018). Antioxidantes são substâncias que retardam ou evitam a oxidação, sendo produzidas naturalmente pelas células (Van Der Oost *et al.*, 2003; Biller & Takahashi, 2018).

De acordo com a sua função biológica, o sistema antioxidante pode ser classificado em sistema enzimático (prevenindo, inibindo e retardando ou impedindo a proximidade das EROs com os alvos celulares) ou sistema não enzimático (repara lesões causadas por EROs) (Cotinguiba *et al.*, 2013). As enzimas do sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione-S-transferase (GST)) são encontradas abundantemente nos tecidos de peixes (Fogaça & Sant'ana, 2009), agindo de maneira profilática na produção de EROs. Já os componentes do sistema antioxidante não-enzimático são representados pela glutathione reduzida (GSH), carotenoides, vitaminas (A, C e E), bioflavonóides, ácido úrico, indóis e catecóis (Cotinguiba *et al.*, 2013).

A ação da SOD auxilia na defesa contra EROs, catalisando a dismutação do ânion superóxido (O_2^-), gerados pela mitocôndria e peroxissomos, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo ser degradado pela CAT (Biller & Takahashi, 2018). A enzima CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos de eritrócitos, tecido hepático e renal, catalisando a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2), evitando a formação do radical hidroxil (OH) (Biller & Takahashi, 2018). A atividade enzimática da GSH-Px é responsável pela redução de diversos tipos de peróxidos, inclusive do H_2O_2 . Nesta reação, a GSH-Px utiliza a GSH como cofator, gerando a glutathione oxidase (GSSG) como produto final (Halliwell & Gutteridge, 2007). A enzima GSH atua no transporte de aminoácidos, remoção de toxinas e degradando peróxidos endógenos, atuando dessa forma em diversas funções fisiológicas (Halliwell & Gutteridge, 2007). A estimulação da enzima GST envolve reações de conjugação na presença de glutathione, desempenhando papel importante na remoção de toxinas e compostos eletrolíticos (Cho *et al.*, 1999).

5 Impactos da temperatura na fisiologia dos peixes

Ao longo da história, as mudanças climáticas têm sido responsáveis na oscilação da temperatura global, representando um desafio ambiental significativo para inúmeras espécies de peixes e para a aquicultura (Xie, 2020; Mugwany *et al.*, 2022).

A temperatura desempenha um papel crucial para os peixes, visto que a maioria das espécies são ectotérmicas, requerendo uma temperatura ambiente adequada para regular suas funções orgânicas. A temperatura influencia diretamente nos tecidos, células e moléculas dos peixes, modificando a cinética e os pontos de equilíbrio das reações através de ligações intramolecular e intermoleculares (Baldisserotto, 2009).

A temperatura pode impactar o desenvolvimento embrionário (Radonié *et al.*, 2005), larval (Lee *et al.*, 2017), atividade enzimática (Piedras *et al.*, 2004), sistema osmorregulatório (Sardella *et al.*, 2004) e expressão gênica, incluindo genes relacionados à atividade antioxidante (Cheng *et al.*, 2015). Além disso, a temperatura pode ser um fator determinante positivo ou negativo no crescimento dos peixes (Besson *et al.*, 2016).

Estudo recente com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) mostrou que sua exposição a 16 °C ativou o sistema imunológico inato e promoveu estresse oxidativo com ativação de algumas enzimas do sistema antioxidante, provavelmente como um processo compensatório para reduzir danos aos tecidos. O pacu foi sensível a mudanças de temperatura, mas foi capaz de ativar respostas imunológicas e compensatórias para mitigar o estresse oxidativo (Faria *et al.*, 2023).

6 Taurina

A adoção de alimentos funcionais que auxiliam na manutenção do equilíbrio orgânico dos peixes diante das condições estressoras inerentes a produção intensiva, emerge como uma alternativa promissora para substituir os antibióticos na aquicultura. Exemplos desses alimentos incluem as vitaminas, extratos de plantas, óleos essenciais, prebióticos, probióticos, simbióticos e aminoácidos funcionais (Vanderzwalmen *et al.*, 2019).

A quantidade e a composição dos alimentos têm efeitos nas respostas ao estresse e podem ser fatores que geram variação no perfil de resposta de estresse. Neste sentido, a composição de aminoácidos (AA) dos alimentos parece ser importante, uma vez que os AAs possuem efeitos na síntese de neurotransmissores, na composição da membrana e na excitabilidade neuronal (Wu, 2013; Li & Wu, 2021).

A exigência de aminoácidos não está completamente determinada para a maioria dos peixes cultivados. Em geral, são reconhecidos dez aminoácidos essenciais e entre eles estão, a arginina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, leucina, triptofano e valina (Luo *et al.*, 2005; Muhammadar *et al.*, 2011). Apesar de não possuir um grupo carboxila em sua estrutura química em relação aos demais aminoácidos, a taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) (Al-feky *et al.*, 2016) tem sido objetivo de muitos estudos e é considerada um aminoácido condicionalmente essencial ou parcialmente essencial para muitas espécies de peixes (Takagi *et al.*, 2008; Espe *et al.*, 2012; El-sayed, 2014; Wei *et al.*, 2018), nos quais a suplementação dietética com este aminoácido tem demonstrado ser benéfica para

algumas espécies (Salze & Davis, 2015; Al-feky *et al.*, 2016; Koven *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2018; Lin & Lu, 2020).

A taurina está envolvida na defesa antioxidante das células, na regulação osmótica celular, no desenvolvimento muscular, neural e visual, na manutenção da função hepática, exerce ação anti-inflamatória nos tecidos (Wu, 2013; Salze & Davis, 2015), processos de desintoxicação e função do sistema nervoso (Stipanuk *et al.*, 2018).

O total de taurina presente no corpo é mantido por um equilíbrio entre a ingestão dietética e a sua síntese a partir do metabolismo da metionina, concomitante com a reabsorção pelo rim e intestino médio na forma de ácido biliar (Wu, 2013).

A síntese de taurina em peixes é variável entre as espécies e depende do ambiente aquático em que vivem. Essa variação está relacionada à atividade da enzima L-cisteinesulfinato descarboxilase (CSD), que desempenha um papel fundamental na oxidação e na conversão direta de cisteína em taurina, ou na conversão de metionina em cisteína, principalmente no fígado e no cérebro (Chang *et al.*, 2013). A partir do metabolismo da metionina, principalmente pela via dependente de cisteína dioxigenase (CDO)/cisteína sulfínica descarboxilase (CSD), a cisteína é oxidada em ácido cisteínico sulfínico pela CDO e descarboxilizado em hipotaurina pela CSD (Haga *et al.*, 2015; Salze *et al.*, 2016).

A taurina é um AA encontrado abundantemente nos tecidos animais (músculo, vísceras e cérebro), mas é raramente encontrada em plantas, exceto em algumas algas (Jacobsen & Smith, 1968; Larsen *et al.*, 2011). Como resultado, dietas baseadas em proteína vegetal e indivíduos alimentados por via parentérica não suplementados de taurina apresentam baixos níveis plasmáticos desse aminoácido (Bouckennooghe *et al.*, 2016; Gormley *et al.*, 2007; Salze & Davis, 2015).

A maioria dos peixes onívoros e herbívoros é capaz de sintetizar toda a taurina a partir dos aminoácidos sulfurados obtidos na dieta, como a metionina e a cisteína, no entanto, pode não ser sintetizada em quantidades adequadas para o organismo, necessitando de taurina de forma dietética, uma vez que os ingredientes base na formulação de dietas (fibrosos, energéticos e proteicos) para espécies de peixes onívoros e herbívoros são geralmente de origem vegetal (Jahan *et al.*, 2003; Gatlin *et al.*, 2007; Fracalossi & Cyrino, 2012; Kiron, 2012).

7 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) como modelo biológico

O pacu possui elevada importância no cenário da aquicultura nacional, sendo a segunda espécie nativa mais representativa nas unidades de produção, com 2.212 ocorrências. Na região Sul, sua produção representou 92% do total de peixes redondos (MPA, 2013), no ano de 2022 sua produção foi de 453,5 toneladas (RAP, 2023).

Pertencente à família Characidae, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe de ampla distribuição na América do Sul, estando presente desde a bacia do rio Orionoco na Venezuela, até o rio da Prata no Uruguai e no Brasil (Petrere Jr., 1989). Tem corpo comprimido, alto e em forma de disco, é coberto por pequenas escamas e sua coloração é cinza-escuro no dorso e amarelo-dourado no ventre, podendo variar de acordo com o ambiente que vive (Ferraz *et al.*, 1988).

O pacu é considerado umas das espécies nativas promissor para o cultivo por sua facilidade de adaptação em ambiente de cultivo, rápido crescimento e ganho de peso (Abimorad *et al.*, 2007), fácil adaptação ao arrazoamento, tamanho médio da primeira maturação gonadal ocorre aproximadamente aos três anos de idade, média de 34 cm (Ferraz *et al.*, 1988), apresentando fecundação externa e desova total, induzida por hormônios sintéticos ou extrato de hipófise (Urbinati & Takahashi, 2020).

Sua maior produção se concentra nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país devido as características do clima destas regiões serem favoráveis para a espécie (Ferraz *et al.*, 1988), a temperatura ideal para seu desenvolvimento é de 23 a 29 °C, inferiores a 22°C podem prejudicar seu crescimento, embora alevinos resistam a médias de oscilações térmicas de 5 a 6 °C (Garcia *et al.*, 2008).

Tratando-se de uma espécie herbívora, no ambiente natural o pacu se alimenta de folhas, frutos, resíduos vegetais e sementes. Raramente pode se alimentar de insetos, moluscos e peixes, de acordo com a disponibilidade de alimento em consequência de variações ambientais e migração reprodutiva (Urbinati *et al.*, 2020).

A formulação de dietas para cada espécie de peixe, baseia-se no hábito alimentar em ambiente natural (Pezzato *et al.*, 2009). A nutrição do pacu tem sido objetivo de vários estudos, mas todos partem da premissa de ingredientes de origem vegetal (Fernandes *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2001; Abimorad & Carneiro, 2004; Dias-Koberstein *et al.*, 2005; Urbinati & Gonçalves, 2005; Abimorad & Carneiro, 2007; Abimorad *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2010a; Rodrigues *et al.*, 2010b), o que destaca a importância de estudos com dietas suplementadas com

componentes que completem as necessidades nutricionais como a taurina e que são mais comumente encontradas em dietas formuladas a partir de ingredientes de origem animal.

8 Objetivos

Pelo exposto, este estudo avaliou o impacto da exposição do pacu à temperatura inferior às da faixa de conforto térmico para a espécie no sistema metabólico, nas respostas de estresse, no sistema imune inato e no sistema antioxidante, considerando que ao desencadear uma resposta de estresse ocorre intensa mobilização energética, o que pode afetar as respostas imunes que exigem grande aporte de energia. Por outro lado, a maior demanda de energia acarretará maior exigência dos processos de respiração celular, o que, por outro lado, pode exigir mais do sistema antioxidante. Adicionalmente, além de estabelecer o padrão de resposta dos diferentes sistemas fisiológicos ativados pela exposição ao frio, a suplementação da dieta dos peixes com taurina poderá alterar as respostas e melhorar as condições de saúde dos peixes.

9 Referências

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1101-1109, 2004.

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles-Fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v.13, n.1, p.1-9, 2007.

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO D.J.; URBINATI, E.C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 36-44, 2007.

ACUNHA, R. M. G.; SANCHES, D. S.; ALMEIDA, R. G. S.; OLIVEIRA, F. C.; SOARES, M. P.; DAVALO, M. R. S.; SILVA, M. E. V. M.; OLIVEIRA, K. K. C.; CAMPOS, C. M. The use of immunomodulators in fish feed: A review. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 4, p. e11312440964, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i4.40964.

AL-FEKY, S. S. A.; EL-SAYED, A. F. M.; EZZAT, A. A. Dietary taurine enhances growth and feed utilization in larval Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed soybean meal-based diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 457–464, 2016.

ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, O.M.; DHABHAR, F. S.; SU, Y.; EPEL, E. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 9, p. 1698-1708, 2013.

AWAD, E.; AWAAD, A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 67, p. 40-54, 2017.

BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C. E.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P., ROUBACH, R. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata)

and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian waters. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 405-412, 2008.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciencia rural**, v. 39, p. 291-299, 2009.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARCELLOS, L. J. G.; SOUZA, S. M. G.; WOHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências iniciais (revisão). **Journal Volume & Issue**. v. 26, n. 1, p. 1678-2305, 2018.

BARREIROS A. L. B. S.; DAVID J. M. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Quimica Nova, v. 29, p. 113-123, 2006

BETTERIDGE, D.J. What Is Oxidative Stress? *Metabolism*, v. 49, p. 3-8, 2000.

BIENERTOVA-VASKU, J.; LENART, P.; SCHERINGER, M. Eustress and Distress: Neither Good Nor Bad, but Rather the Same? **BioEssays**, v. 42, n. 7, p. 1–5, 2020.

BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., MARZOCCHI-MACHADO, C. M, ZANUZZO, F. S., SABIONI, R.E; URBINATI, E.C. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 41, p. 237-241, 2012.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MINGATTO, F. E.; URBINATI, E. C. 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, 2015.

BILLER, J.D.; TAKAHASHI, L.S. **Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 90, n. 4, p. 3403-3414, 2018.

BESSON, M.; ANDEPUTTE, M.; VAN ARENDONK, J. A. M.; AUBIN, J.; DE BOER, I. J. M.; QUILLET, E.; KOMEN, H. Influence of water temperature on the economic value of growth rate in the Mediterranean. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 462, p. 47-55, 2016.

BOUCKENOOGHE, T., REMACLE, C., REUSENS, B. Is taurine a functional nutrient? **Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 9, n. 6, p. 728-733, 2016.

BRUCE, T.; BROWN, M. A Review of Immune System Components, Cytokines, and Immunostimulants in Cultured Finfish Species. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 7, n. 3, p. 267-288, 2017.

CHANG, Y. C.; DING, S. T.; LEE, Y. H.; WANG, Y. C.; HUANG, M. F.; LIU, I. H. Taurine homeostasis requires de novo synthesis via cysteine sulfinic acid decarboxylase during zebrafish early embryogenesis. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 615-629, 2013.

CHENG, C. H.; YANG, F. F.; LIAO, S. A.; MIAO, Y. T.; YE, C. X.; WANG, A. L.; CHEN, X. Y. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 53, p. 172-179, 2015.

CHO J.R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J.O.; AHN Y. J.; CHO J.R.; KIM Y.J.; HONG K.J.; YOO J.K.; LEE J.O.; AHN Y.J. Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea aphid, *Aphis citricola* Van der Goot. **Journal of Asian Pacific Entomology**, v. 2, p.113-119, 1999.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. A.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2013.

COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 627-636, 2004.

DANG, R.; GUO, Y. Y.; ZHANG, K.; JIANG, P.; ZHAO, M. G. Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019.

DEL MAESTRO, R. F. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 40, n. 7, p. 153-168, 1980.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Tempo de trânsito gastrintestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.27, p.413-417, 2005.

DINIZ, N. M.; HONORATO, C. A. Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo-revisão. **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, 2012.

DHABHAR, F. S. Stress-induced Enhancement of Immune Function. In: FINK, G., ed. Encyclopedia of stress. **New York: Academic Press**, v. 2, p. 515-523, 2000.

EL-SAYED, A. F. M. Is dietary taurine supplementation beneficial for farmed fish and shrimo? A comprehensive review. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 4, p. 241-255, 2014.

ELLIS, A. E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bactéria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 827-839, 2001.

ESPE, M.; RUOHONEN, K.; EL-MOWAFI, A. Effect of taurine supplementation on the metabolismo and body lipid-to-protein ration in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 349-360, 2012.

FARIA, C. F. P.; PIEDADE, A. E.; URBINATI, E. C. Effect of low water temperature on the stress, innate immune, and antioxidant responses of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a sub-

tropical fish. **Aquaculture International**, v. 31, p. 3297–3310, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s10499-023-01125-4>

FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira e Aquicultura e Biologia Aquática, 2012. 375 p.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 646-653, 2000.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 617-626, 2001.

FERRAZ, J. A. F.; FERRARI, V. A.; COLARES DE MELO, J. S. Comportamento do pacu, *Colossoma mitrei*, em cultivo experimental, no Centro-Oeste do Brasil. Boletim Técnico do CEPTA, v.1, p.15-28, 1988.

FOGAÇA, F.; SANT'ANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. **Veterinary Science**, p. 117-127, 2009.

GATLIN III, D.M.; BARROWS, F.T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T.G.; HARDY, R.W.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, Å.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E.J.; STONE, D.; WILSON, R.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 551-579, 2007.

GARCIA, L. O.; COPATTI, C. E.; WACHHOLZ, F.; PEREIRA-FILHO, W. BALDISSEROTTO, B. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, n. 2, p. 275-281, 2008.

GOMEZ, D.; SUNYER, J. O.; SALINAS, I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1729-1739, 2013.

GORMLEY, T. R.; NEUMANN, T.; FAGAN, J. D.; BRUNTON, N. P.; Taurine content of raw and processed fish fillets/portions. **European Food Research and Technology**, v. 250, n. 5-6, p. 837-842, 2007.

HAGA, Y.; KONDO, H.; KUMAGAI, A.; SATOH, N.; HIRONO, I.; SATOH, S. Isolation, molecular characterization of cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD) of red sea bream *Pagrus major* and yellowtail *Seriola quinqueradiata* and expression analysis of CSD from several marine fish species. **Aquaculture**, v. 449, p. 8–17, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Biology and Medicine**, v. 4, p. 187-267, 2007.

HERRERA, M.; MANCERA, J. M.; COSTAS, B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, n. 447, p. 1-22, 2019.

IWAMA, G.; AFFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are Hsps suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p.15-19, 2004.

JACOBSEN, J. G., & SMITH, L. H. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. **Physiological Reviews**, v. 48, n. 2, p. 424-511, 1968.

JAHAN, P.; WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Balancing protein ingredients in carp feeds to limit discharge of phosphorus and nitrogen into water bodies. **Fisheries Science**, v. 69, p. 226-233, 2003.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science Technology**, v. 173, p. 111-133, 2012.

KOVEN, W.; PEDUEL, A.; GADA, M.; NIXON, O.; UCKO, M. Taurine improves the performance of white grouper juvenile (*Epinephelus aeneus*) fed a reduced fish meal diet. **Aquaculture**, v. 640, p. 8-14, 2016.

LARSEN, R., EILERTSEN, K., ELVEVOLL, E. Health benefits of marine foods and ingredients. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 508-18, 2011.

LEE, J. S. F.; COOK, M. A.; LUCKENBACH, J. A.; BEREJIKIAN, B. A.; SIMCHICK, C. A.; ODEN, S. M.; GOETZ, F. W. Investigation of long-term effects of larval rearing temperature on growth, deformities, flesh quality, and phenotypic sex of culture sablefish (*Anoplopoma fimbria*). **Aquaculture**, v. 479, p. 91-99, 2017.

LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; DA CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; MELO, C. C. V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **Pubvet**, v. 11, p. 538-645, 2017a.

LEIRA, M. H.; CUNHA, L. D.; BRAZ, M. S.; MELO, C. C. V.; BOTELHO, H. A.; REGHIM, L. S. Qualidade da água e seu uso em pisciculturas. **Pubvet**, v. 11, n. 1, p. 11-17, 2017b.

LI, X., ZHENG, S., WU, G. Nutrition and Functions of Amino Acids in Fish. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1285, p. 133-168, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-54462-1_8.

LIN, Y. H.; LU, R. M. Dietary tauryne supplementation enhances growth and nutrient digestibility in giant grouper *Epinephelus lanceolatus* fed a diet with soybean meal. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1-4, 2020.

LU, S.; WEI, F.; LI, G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. **Cell Stress**, v. 5, n. 6, p. 76–85, 2021.

LUO, Z.; LIU, Y. J.; MAI, K. S.; TIAN, L. X. Advances in the Study on nutrients requirements of grouper (*Epinephelus* sp.) a Review. **Journal of Ocean University of China**, v. 4, n. 2, p. 93-98, 2005.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006. Doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006

MAGNADÓTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361–379, 2010.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, 2007.

MERLE, N.S.; CHURCH, S.E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L.T. Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 262, p. 134-383, 2015. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00262

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2013. Boletim estatístico da pesca e aquicultura.

MUGWANY M., DAWOOD, M.A.O., KIMERA, F., SEWILAM, H. Anthropogenic temperature fluctuations and their effect on aquaculture: A comprehensive review. **Aquaculture and Fisheries**, v. 7, n. 3, p. 223-243, 2022.

MUHAMMADAR, A. A.; MAZLAN, A. G.; SAMAT, A.; MUCHLISIN, Z. A.; SIMON, K. D. Crude protein and amino acids content in some common feeds of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) juvenile. **AACL Bioflux**, v. 4, n. 4, p. 499-504, 2011.

OBA, E. T.; MARIANO, W. D. S.; DOS SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável, *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*, v. 8 p. 226-247, 2009.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265-275, 2011.

PeixeBR – Associação Brasileira de Piscicultura (2024) Anuário Brasileiro de Piscicultura. Edição 2024. São Paulo, Brasil, p 16. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario/>. Acessado em 08 de abril de 2024

PETREIRE JR., M. River fisheries in Brazil: a review. **Regulated Rivers: Research and Management**, v.4, n. 1, p.1-6, 1989.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FURUYA, W. M. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 43-51, 2009.

PIEDRAS, S. R. N.; MORAES, P. R. R.; POUEY, J. L. O. F. **Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água**. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 177-182, 2004.

RADONIÉ, M.; LÓPEZ, A. V.; OKA, M.; ARISTIZÁBAL, E. O. Effect of the incubation temperature on the embryonic development and hatching time of eggs of the red porgy *Pagrus pagrus* (Linne, 1758) (Pisces: Sparidae). **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, Vina del Mar, v. 40, n. 2, p. 91-99, 2005.

RAP. Relatório Anual de Produção. Boletim da Aquicultura em Água da União. Brasília-DF – Outubro de 2023.

RUSSELL, G., LIGHTMAN, S. The human stress response. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 9, p. 525-534, 2019.

RODRIGUES, L.A.; FABREGAT, T.E.H.P.; FERNANDES, J.B.K.; NASCIMENTO, T.M.T. Digestibilidade e tempo de trânsito gastrointestinal de dietas contendo níveis crescentes de fibra bruta para pacu. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 32, p. 169-173, 2010a.

RODRIGUES, L.A.; FERNANDES, J.B.K.; FABREGAT, T.E.H.P.; SAKOMURA, N.K. Desempenho produtivo, composição corporal e parâmetros fisiológicos de pacu alimentado com níveis crescentes de fibra. **Pesquisa Agropecaria. Brasileira**, v.45, p.897-903, 2010b.

SALZE, G. P.; DAVIS, A. Taurine: a critical nutriente for future fish feed. **Aquaculture**, v. 437, p. 215-229, 2015.

SALZE, G. P.; SPANGLER, E.; COBINE, P. A.; RHODES, M.; DAVIS, D. A. Investigation of biomarkers of early taurine deficiency in Florida pompano *Trachinotus carolinus*. **Aquaculture**, v. 451, p. 254–265, 2016.

SAINT-PAUL U. Espécies de peixes nativos impulsionando o desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Acta de Pesca e Recursos Aquáticos**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2017.

SARDELLA, B. A.; COOPER, J.; GONZALEZ, R. J. The effect of temperature on juvenile Mozambique tilapia hybrids (*Oreochromis mossambicus* x *O. urolepis hornorum*) exposed to full-strength and hypersaline seawater. **Comp. Biochem Physiol**, v. 137, p. 621-629, 2004.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SCHRECK, C. B.; Tort, L. The concept of stress in fish. **Fish Physiology**, v. 35, p. 1-34, 2016.

SELYE H. A syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SHIELDS, G., SAZMA, M. AND YONELINAS, A. The effects of acute stress on core executive functions: A meta-analysis and comparison with cortisol. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p.651-668, 2016.

STIPANUK, M. H. et al. Enzymes and Metabolites of Cysteine Metabolism in Nonhepatic Tissues of Rats Show Little Response to Changes in Dietary Protein or Sulfur Amino Acid Levels. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3369–3378, 2018.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). **Aquaculture**, v. 364, p. 6-12, 2012.

TAKAGI, S.; MURATA, H.; GOTO, T.; ENDO, M.; YAMASHITA, H.; UKAWA, M. Taurine is na essential nutriente for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 198-205, 2008.

TEJPAL, C. S.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; KUMAR, J. A.; MUTHAPPA, N. A.; VIDYA, S.; RAJAN, M. G. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala fingerlings*. **Aquaculture**, v. 293, p. 272–277, 2009.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; LANDINES, M. A. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p. 389-400, 2004a.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura**. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, p.71-193, 2004b.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 16, n. 1, p. 75-85, 2001.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, p.87-105, 2014.

URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; SERRA, M.; WOLKERS, C. P. B.; SABIONI, R. E. Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas. In: Tavares-Dias & Mariano, W. S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. (381-416), 2015. Ed 1. Capítulo 19. São Carlos, Editora Pedro & João.

URBINATI, E.C., TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In Espécies nativas para piscicultura no Brasil, 3ª edição pp. 169-191. Editora UFSM, Santa Maria. 2020.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO G. W.; CAVALLI, R. O. Aquicultura no Brasil: passado, presente e futuro. **Relatórios Aquaculture**, v. 19, p. 100-611, 2021.

VANDERZWALMEN, M.; LEWIS, E.; MULLEN, C.; HENRIQUEZ, F.; CAREY, P.; SNELLGROVE, D.; SLOMAN, C. A. The use of feed and water additives for live fish transport. Reviews in **Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 263-278, 2019.

WEI, Y.; LIANG, M.; XU, H.; ZHENG, K. Taurine alone or in combination with fish protein hydrolysate effects growth performance, taurine transport and metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 1-10, 2018.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormone Response to Stress. In: Farrel AP, Cech JJ, Richards JG, Stevens ED (eds.). Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment. Elsevier Academic Press Inc, UK, pp.1515-1523, 2011.

WINBERG S.; HÖGLUND E.; ØVERLI Ø. Variation in the neuroendocrine stress response. **Fish Physiology**, v. 35, p. 35-74, 2016.

WU, G. **Amino acids: biochemistry and nutrition**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2013.

Xie, S-P. Ocean Warming Pattern Effect On Global And Regional Climate Change. **AGU Advances**, v. 1, n. 1, p. e2019AV000130, 2020. <https://doi.org/10.1029/2019AV000130>

ZANUZZO, F. S., URBINATI, E. C., RISE, M. L., HALL, J. R., NASH, A. K. Gamperl *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**, v. 425, p. 1-9, 2015.

CAPITULO II

Respostas fisiológicas à exposição aguda e crônica do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) à baixa temperatura e sua modulação pela suplementação de dietas com taurina

RESUMO

A ocorrência de flutuações intensas de temperatura pode prejudicar a saúde dos peixes e resultar em impacto negativo na produção aquícola. Apesar do reconhecimento do papel crucial que a temperatura desempenha na aquicultura, ainda faltam informações sobre as consequências das flutuações extremas de temperatura na saúde dos peixes nativos, além de estratégias para reduzir os danos fisiológicos. Para investigar o perfil de indicadores dos sistemas metabólico, de estresse, da imunidade inata e do sistema antioxidante no sangue e tecidos (fígado e músculo), um total de 84 pacus jovens ($122,23 \pm 41,17$ g e $23,01 \pm 17,95$ cm, média $\pm$ DP) foi alimentado com ração suplementada de taurina (TAU) (1; 2 e 4 % TAU/kg ração) por 43 dias, mantidos a 28°C, seguido de exposição a 16°C por 24 horas e 7 dias. Os resultados encontrados mostram que a suplementação de 2% TAU proporcionou maiores concentrações de cortisol nos peixes, entre os tratamentos, após exposição crônica ao frio. Os peixes de todos os tratamentos apresentaram aumento da glicose frente a cronicidade estressora. A suplementação dietética de 1 e 2 % TAU proporcionou diminuição da Atividade Respiratória dos Leucócitos (ARL) frente ao estressor de forma aguda, no entanto, apenas com suplementação de 2% TAU manteve baixo os valores da ARL nos peixes após a cronicidade estressora. A Atividade Hemolítica do Sistema Complemento (AHC) nos peixes não teve um padrão claro de resposta, no entanto a suplementação de 2% TAU proporcionou maior AHC nos peixes após 43 dias de alimentação e maior atividade nos peixes alimentados com suplementação de 1% TAU após a cronicidade estressora. A concentração de lisozima foi maior nos peixes alimentados com suplementação de 2% TAU após 43 dias de alimentação, comparados aos peixes da dieta controle. O sistema antioxidante dos peixes foi ativado após estresse térmico a 16°C e a taurina modulou, cronicamente, a atividade da superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), bem como a concentração da glutathione reduzida (GHS) com a suplementação de (2%, 1%, 2% e 4%, respectivamente) dos peixes após estímulo estressor térmico. A suplementação de 1% TAU promoveu o melhor desempenho de crescimento e de aproveitamento do alimento pelos peixes, assim como os níveis suplementares de 2% e 4% TAU aumentou o percentual de ganho de peso dos peixes. Concluindo assim que a exposição crônica do pacu a 16°C se mostrou promotor de estresse nos peixes, considerando o perfil das concentrações sanguíneas de glicose. A taurina ativou agudamente o sistema complemento e modulou o sistema antioxidante. Bem como a suplementação de TAU demonstrou melhorar o desempenho dos peixes.

Palavras-chave: aminoácido na nutrição; pacu; estresse; sistema antioxidante; sistema imune; homeostase.

ABSTRACT

The occurrence of intense temperature fluctuations can harm fish health and result in a negative impact on aquaculture production. Despite recognition of the crucial role that temperature plays in aquaculture, there is still a lack of information on the consequences of extreme temperature fluctuations on the health of native fish, as well as strategies to reduce physiological damage. To investigate the profile of indicators of metabolic systems, stress, innate immunity and antioxidant system in blood and tissues (liver and muscle), a total of 84 young pacu ($122.23 \pm 41.17\text{g}$ and $23.01 \pm 17.95\text{cm}$, mean $\pm$ SD) was fed with taurine supplemented feed (TAU) (1; 2 and 4% TAU/kg feed) for 43 days, maintained at 28°C, followed by exposure to 16°C for 24 hours and 7 days. The results found show that 2% TAU supplementation provided higher concentrations of cortisol in fish, between treatments, after chronic exposure to cold. Fish from all treatments showed an increase in glucose in the face of chronic stress. Dietary supplementation of 1 and 2% TAU provided a decrease in Leukocyte Respiratory Activity (ARL) in the face of the stressor in an acute form, however, only 2% TAU supplementation maintained low ARL values in fish after the chronic stressor. The Hemolytic Activity of the Complement System (AHC) in fish did not have a clear pattern of response, however, 2% TAU supplementation provided greater AHC in fish after 43 days of feeding and greater activity in fish fed with 1% TAU supplementation after stressful chronicity. Lysozyme concentration was higher in fish fed with 2% TAU supplementation after 43 days of feeding, compared to fish on the control diet. The fish antioxidant system was activated after heat stress at 16°C and taurine chronically modulated the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), as well as the concentration of reduced glutathione (GHS) with supplementation of (2%, 1%, 2% and 4%, respectively) of fish after thermal stressor stimulation. The 1% TAU supplementation promoted better growth performance and food utilization by the fish, just as the supplemental levels of 2% and 4% TAU increased the percentage of fish weight gain. Concluding that the chronic exposure of pacu to 16°C proved to promote stress in fish, considering the profile of blood glucose concentrations. Taurine acutely activated the complement system and modulated the antioxidant system. As well as TAU supplementation has been shown to improve fish performance.

Kay words: amino acid in nutrition; pacu; stress; antioxidant system; Immune system; homeostasis

1 Introdução

Os peixes são animais ectotérmicos, possuindo capacidade de regular sua temperatura corporal com a temperatura do meio em que se encontra (Schmidt-Nielsen, 2002). A temperatura é um importante fator de estresse na criação de peixes (Islam *et al.*, 2021), podendo interferir em diversas funções fisiológicas, comprometimento da saúde (Abram *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019) e crescimento dos peixes (Milstein *et al.*, 2000). Respostas de estresse foram relatadas em peixes expostos agudamente a baixas temperaturas (Liu *et al.*, 2011; Alzaid *et al.*, 2015; Faria *et al.*, 2023), promovendo alterações bioquímicas (Pörtner, 2002), distúrbios metabólicos (Paschke *et al.*, 2018; Faria *et al.*, 2023) e imunológicos (Ahmad *et al.*, 2011; Abram *et al.*, 2017; Abram *et al.*, 2019; Faria *et al.*, 2023).

Uma estratégia que deve ser considerada na piscicultura para preparar os peixes para desafios como quedas de temperatura é o fornecimento de dietas equilibradas e nutricionalmente completas que melhorem as respostas imunes dos peixes (Kiron, 2012; Assefa & Abunna, 2018), atendam o desempenho dos animais (Rombenso *et al.*, 2022) e, assim, diminuam os custos de produção e os impactos que a produção de peixes possam causar no ambiente.

A suplementação dietária de AA tanto essenciais quanto não essenciais, em quantidades adequadas, têm sido uma das principais ferramentas na elaboração de rações que atendam melhor o desempenho dos animais e melhorem ou regulem os danos causados por estresse nos peixes (Wu, 2013, 2014; Li *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2022).

A taurina (TAU) por meio do ácido cólico produz taurocolato, envolvido na produção de sais biliares e na digestão de gorduras, defesa antioxidante das células, osmorregulação celular, desenvolvimento muscular, neural e visual, manutenção das funções hepáticas e ação anti-inflamatórias nos tecidos (Salze & Davis, 2015; Lima *et al.*, 2020).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), peixe-alvo deste estudo, é uma das espécies nativas mais utilizadas na piscicultura nacional por seu valor econômico (Valladão *et al.*, 2018), e se distribui em regiões do país onde são comuns quedas de temperatura causadas por frentes frias, no outono e inverno (Garcia *et al.*, 2008; Sant'Anna Neto *et al.*, 2015). O conhecimento do impacto de baixas temperaturas na fisiologia desta espécie se torna importante para otimizar sua criação.

Com vista ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar respostas de estresse, do sistema imune inato, do sistema antioxidante e respostas metabólicas do pacu, quando exposto

a baixa temperatura de forma aguda (24 horas) e crônica (7 dias). Além disso, o estudo investigou se a suplementação das dietas com taurina reduziria os possíveis danos da baixa temperatura nos sistemas citados, considerando que o pacu é uma espécie omnívora/herbívora, com menor ingestão de taurina.

2 Materiais e métodos

2.1 Protocolo experimental

Respeitando os princípios seguidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo 1777/2023 da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

O experimento foi conduzido no Biotério de Peixes, Anfíbios e Répteis do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP Campus Jaboticabal-SP. Em um delineamento inteiramente ao acaso, um total de 84 juvenis de pacu ($122,23 \pm 41,17\text{g}$ e $23,01 \pm 17,95\text{cm}$, média $\pm$ DP), foi distribuído em doze caixas de polietileno (100 L^{-1}), em sistema de recirculação de água acoplado de filtro mecânico-biológico (perlön – mídia biológica), a 28°C , com fotoperíodo 12L:12E e aeração suplementar, com 7 peixes/caixa. Os peixes foram aclimatados e alimentados com uma ração comercial (Nutripiscis® engorda: 13% umidade; 36% PB; extrato etéreo (mín.) 17,08%; fibra bruta (máx.) 0,5%; matéria mineral (máx.) 1,4%; cálcio (mín.) 0,1%; cálcio (máx.) 0,25%; fósforo (mín.) 0,17% e vitamina C (mín.) 3,5% kg^{-1}), duas vezes ao dia (9:00 e 16:00h) até saciedade aparente, por quatro dias.

Após período de aclimação, teve início a fase experimental com duração de cinquenta dias. A manutenção da temperatura de 28°C foi feita usando aquecedores termostatos. Os peixes foram alimentados com uma dieta controle e mais três tratamentos com suplementação de taurina [Alimentação Controle (ração sem adição de taurina); 1% TAU (ração + 1% taurina); 2% TAU (ração + 2% taurina) e 4% TAU (ração + 4% taurina)]. Cada tratamento teve três repetições. As dietas experimentais foram preparadas utilizando-se a ração comercial citada, que foi previamente moída, para inclusão de 1, 2 e 4 % de TAU. Essa mistura foi umedecida com 40% de água, peletizada em processador de alimentos e seca em temperatura ambiente. A dieta controle seguiu o mesmo procedimento sem a inclusão de TAU.

Após 43 dias recebendo as rações experimentais, os peixes foram expostos à temperatura de 16°C por 7 (sete) dias.

Antes da exposição a 16°C , foi realizada uma amostragem basal (Figura 1). A exposição a 16°C foi realizada com o auxílio de um equipamento de refrigeração (Chiller, Gelaqua® Split) acoplado ao sistema, reduzindo gradativamente (2°C/h) a temperatura até atingir 16°C (Faria *et al.*, 2023), sendo mantido por sete dias. Após 24 horas a 16°C , foi realizada uma nova amostragem, que se repetiu seis dias depois.

Durante a exposição à baixa temperatura, os peixes foram alimentados com as respectivas dietas a 2% do peso vivo, calculado a partir da quantidade consumida.

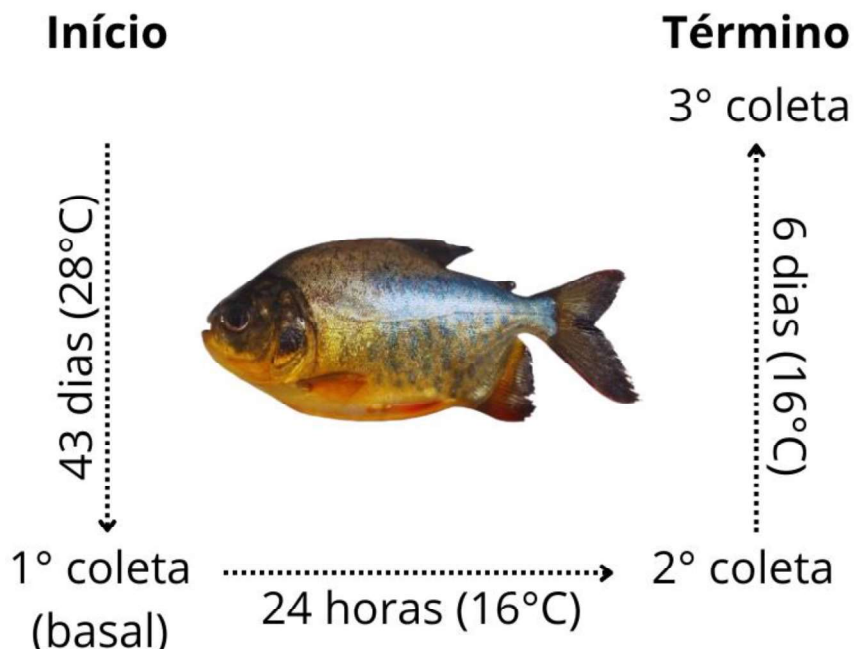


Figura I. Esquema demonstrativo do período dos peixes em diferentes temperaturas e momento de cada amostragem. Em cada amostragem, dois peixes de cada caixa eram coletados (n=6 por tratamento / por amostragem).

2.1.1 Qualidade da água

Os parâmetros da água foram monitorados durante todo o período experimental, sendo realizado, todos os dias, a medição da temperatura e oxigênio dissolvido com auxílio do equipamento multiparâmetro portátil HANNA (ref. HI9829). Uma vez por semana era realizado a coleta de 15 ml de água por caixa (6 caixas) do sistema de recirculação experimental e enviado para laboratório especializado para avaliação de amônia total. O pH foi avaliado (kit colorimétrico - Ymiko) uma vez por semana. Os resultados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Qualidade da água do sistema de recirculação de pacus alimentados com diferentes porcentagens de taurina na ração.

Parâmetros físico-químicos da água				
	T (°C)	O ₂ (mg L ⁻¹)	NH ₃ (ppm)	pH
	Condição de temperatura			
28 °C	28,3±0,103	5,61±0,105	0,32±0,021	7,29±0,084
16 °C	16,2±0,053	6,5±0,183	0,37±0,030	7,4±0,080

Valores são médias±erro padrão da média. Temperatura (T), Oxigênio Dissolvido (O₂), Amônia Total (NH₃) e pH da água. Estão representados os valores da qualidade da água do grupo controle (28°C), seguidos do grupo do teste de temperatura por 7 dias (16°C) constituídas por caixas (100L⁻¹) / sete peixes cada.

Durante o período estudado, os parâmetros médios de qualidade da água mensurados, com exceção da temperatura de 16 °C, estiveram dentro dos valores adequados para a espécie (Nunes *et al.*, 2018; Urbinati & Takahashi, 2020).

3 Análises laboratoriais

Em cada amostragem, os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 mg/L) e o sangue retirado por punção dos vasos caudais, separado em microtubos que continham ou não anticoagulante.

Amostras de sangue contendo anticoagulante (Glistab – Labtest®, ref. 29-400, Minas gerais, Brasil) foram colocadas em microtubos e centrifugado a 3.000 g por 10 minutos para separação do plasma e determinação da concentração de glicose e cortisol.

Uma alíquota de sangue total com heparina foi utilizada para determinação da atividade respiratória de leucócitos.

Do sangue armazenado sem anticoagulante foi separado soro para determinação de concentração de lisozima, atividade hemolítica do sistema complemento e colesterol. Uma alíquota do plasma do sangue foi utilizada para determinar a concentração de triglicerídeos e proteínas totais.

Após a retirada do sangue, os peixes foram eutanasiados em solução mais concentrada de benzocaína, foram medidos e pesados para avaliação dos parâmetros zootécnicos seguido de secção medular para retirada do fígado, uma fração do músculo branco e gordura visceral.

O fígado foi pesado, congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C para posterior análise dos indicadores de estresse oxidativo e biomarcadores teciduais. Uma porção de cada amostra de fígado foi homogeneizada numa proporção de 1:4 (peso g: volume ml) em tampão fosfato de potássio pH 7 e tampão fosfato de sódio pH 7,6, em seguida foram centrifugadas à

5000 rpm por 30 min, a 4° C e o sobrenadante resultante foi separado em alíquotas para a análise da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) e, concentração da glutathione reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO). Foram avaliados a concentração de lipídeo hepático, concentração hepática de glicogênio e proteína total do fígado, respectivamente.

O músculo branco foi utilizado para determinar os teores de lipídeo e a gordura visceral foi separado e seu peso, utilizado para cálculo do índice gorduro-víscero-somático (IGVS).

3.1 Biomarcadores de estresse

A análise de cortisol foi realizada por ensaio imunoenzimático com o “kit” DRG® (Cortisol Elisa – Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ref. EIA 1887, Springfield, Estados Unidos), através de ligações competitiva, onde anticorpos monoclonais presentes na microplaca se ligam a um sítio antigênico na molécula de cortisol e seu resultado é expresso em nanograma por decilitro (ng dl^{-1}).

Para determinar a concentração de glicose presente no plasma, utilizou-se o “kit” comercial (Labtest® - Glicose Liquiform, ref. 133-2/500, Minas Gerais, Brasil), com base na catálise da oxidação da glicose pela glicose oxidase, formando peróxido de hidrogênio, por uma reação oxidativa de acoplamento, resultando em uma coloração avermelhada. Seu resultado é expresso em miligrama por decilitro (mg dl^{-1}).

3.2 Biomarcadores de imunidade inata

Foi determinada a atividade respiratória dos leucócitos (ARL) seguindo protocolo de Anderson e Siwicki (1995) modificado para pacu (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). A técnica determina as espécies reativas de oxigênio – EROs produzidas pelo “burst” oxidativo das células, com base na redução de NBT (cloreto de tetrazólio nitroazul, Sigma Aldrich – ref. 6876) que produz precipitados de material de cor azul escuro insolúvel no interior do fagócito, denominados de grânulo de formazan (Klein, 1990). Em microtubos contendo 10 μL de heparina foi adicionado 50 μL de sangue, mais 50 μL de NBT (Sigma-Aldrich – ref. N6639 – 1G, ST Louis, MO, USA). A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Uma alíquota de 50 μL de amostra suspendida foi colocada em tubo de vidro com 1 mL de N-dimetilformamida – DMF (Sigma-Adrich, ref. 227056 – 2L, St Louis, MO, USA) e centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos. A densidade óptica da solução foi determinada em

espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV – Vis, em comprimento de onda de 540 nm.

A atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) foi determinada segundo metodologia proposta por Zanuzzo et al. (2017). O ensaio cinético consiste em determinar o tempo, em segundos, necessário para a proteína da amostra lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Amostras do sangue de dois coelhos foram colhidas por punção venosa com o auxílio de seringas contendo anticoagulante Alséver (pH 6,1), posteriormente a coleta foi acrescentado 10 mL de trietanolamina – TEA, gelatina 0,1% e ácido etileno diamino tetracético (EDTA – 0,1M pH 7,4). A reação foi incubada por 15 minutos em banho-maria a 37°C e centrifugada por 10 minutos a 2.000 rpm, o processo de giro se repetiu por três vezes. O sobrenadante foi descartado e as hemácias ressuspensas em TEA – Mg^{2+} . Amostras da suspensão foram diluídas em tampão (TEA – EGTA – Mg^{2+} - gelatina 0,1%). Foram pipetados 75 μ L de amostra de soro, 125 μ L de tampão e 400 μ L da suspensão de hemácias em cubeta de 1 mL. As leituras foram realizadas a cada vinte segundos, durante vinte minutos em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV – Vis a 700 nm. A atividade hemolítica do sistema complemento foi calculada como $AHC = 1 / \text{tempo para lisar 50\% de uma suspensão de eritrócitos de coelho}$.

A concentração sérica de lisozima foi determinada de acordo com Demers e Bayne (1997) com modificações para o pacu (Zanuzzo et al., 2015). A técnica baseia-se na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, ref. M3770 – 25G, St Louis, MO, USA), usando lisozima de clara de ovo de galinha como padrão (Sigma-Aldrich, ref. 62970 – 1G). Do sangue armazenado sem anticoagulante, o soro foi separado e 25 μ L (em duplicata) foram colocados em microplacas de acrílico estéril de 96 poços, posteriormente a adição de 75 μ L de tampão fosfato de sódio e 100 μ L de suspensão de *M. lysodeikticus*. A redução da densidade óptica da solução foi medida a cada cinco minutos durante dez minutos (0, 5 e 10 min.) utilizando um leitor de microplacas (Thermo Plate Reader MN) em comprimento de onda de 450 nm.

3.3 Avaliações hematológicas

Uma gota do sangue de cada peixe amostrado, sem anticoagulante, destinou-se à determinação da contagem de eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos. Para isso, extensões sanguíneas foram confeccionadas, secas por 24 horas à temperatura ambiente e coradas de acordo com Rosenfeld (1947). A identificação total de hemácias foi realizada em

câmara de Neubauer, utilizando sangue total diluído em tampão citrato de formaldeído 1:2000. O cálculo do número de leucócitos foi baseado no número de leucócitos encontrados a cada 2.000 eritrócitos contados. Para a diferenciação leucocitária, foram contados 200 leucócitos e a quantidade de cada tipo de célula foi expressa em (n° célula 10^4).

3.4 Biomarcadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

3.4.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD foi determinada de acordo com McCord e Fridovich (1969), a partir da inibição da taxa de redução do citocromo C (Sigma – Aldrich, ref. C2037, St. Louis, MO, USA) pelo radical superóxido via sistema xantina/xantina oxidase. Uma unidade de SOD corresponde a quantidade de enzima que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader a 550 nm. A atividade é expressa em unidade por miligrama de proteína ($U\ mg\ prot^{-1}$).

3.4.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada segundo Aebi (1984), em metodologia que consiste na utilização de uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato em uma solução tampão fosfato (50 mM pH 7,0). A absorbância da solução foi lida em 240 nm em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader durante 15 segundos por 5 minutos. A velocidade da reação (mudança da absorbância em função do tempo / $\Delta Abs / min$) foi calculada por regressão linear simples e o resultado expresso em milimol de peróxido de hidrogênio por minuto por miligrama de proteína ($mmol\ H_2O_2\ min^{-1}\ mg\ prot^{-1}$).

3.4.3 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada de acordo com Hopkins e Tudhope (1973) e estimada indiretamente através da oxidação do NADPH na presença da glutathiona redutase e do substrato glutathiona oxidada produzida pela ação da GPx. A leitura da reação foi feita em absorbância 340 nm em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader e seu resultado expresso em milimol de NADPH por minuto por miligrama de proteína ($mmol\ NADPH\ min^{-1}\ mg\ prot^{-1}$).

3.4.4 Atividade da enzima glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada segundo Keen et al. (1976). O substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reduz a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione-2,4-nitrobenzeno. A leitura da GST foi feita em 340 nm, em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader e a atividade da enzima expressa em milimol de CNDNB por minuto por miligrama de proteína ($\text{mmol CNDNB min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$).

3.4.5 Concentração hepática da glutathione reduzida (GSH)

A concentração da GSH foi determinada de acordo com Beutler et al. (1963), utilizando ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB 2,5 mM – Reagente de Ellman (Sigma-Aldrich, Ref. D21820-5G, St Louis, MO, USA). A reação da GSH com DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB) de cor amarela. A leitura da absorbância foi realizada em 405 nm, em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader e seu resultado é expresso em milimol por miligrama de proteína (mmol mg prot^{-1}).

3.4.6 Peroxidação lipídica hepática (LPO)

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada segundo Camejo et al. (1998) pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As concentrações de TBARS foram expressas em nanomol de MDA por miligrama de proteína ($\text{nmol MDA mg prot}^{-1}$).

3.5 Biomarcadores metabólicos sanguíneos

3.5.1 Concentração plasmática de triglicerídeos

Uma alíquota do plasma do sangue de pacu foi utilizada para a análise da concentração de triglicerídeos por método enzimático (Labtest, ref. 76), no qual a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos, liberando glicerol, que é convertida pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. O mesmo é oxidado em dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Posteriormente ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, aminoantipirina e clorofenol, catalisada pela peroxidase. Quando

presente na amostra, ocorre a intensidade de coloração avermelhada. A leitura foi realizada em leitora de microplaca (ThermoPlate Reader MN) em 492 nm e seu resultado expresso em miligrama por decilitro (mg dl^{-1}).

3.5.2 Concentração sérica de colesterol

A concentração de colesterol foi determinada por método enzimático (Labtest, ref. 87), onde os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado e na presença de peroxidase, peróxido de hidrogênio, fenol e 4-aminoantipirina, são oxidados formando a antipirilquinonimina. Quando há presença de colesterol contido na amostra, forma uma reação de cor vermelha. A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN) em 492nm, o resultado que foi expresso em miligrama por decilitro (mg dl^{-1}).

3.5.3 Concentração plasmática de proteína total

Uma alíquota do plasma foi utilizada para a análise da concentração de proteínas totais por método enzimático (Labtest, ref. 99), no qual os íons de cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino do reagente de Biureto (hidróxido de sódio 600 mmol/L, sulfato de cobre 12 mmol/L, estabilizador e antioxidante) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura. A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas ThermoPlate Reader MN em 550nm, e o resultado que foi expresso em grama por decilitro (g dl^{-1}).

3.6 Biomarcadores teciduais

3.6.1 Perfil lipídico tecidual (fígado e músculo)

Foram determinados os teores de lipídeo presente no fígado e no músculo branco seguindo a técnica de Frings et al. (1972). Os tecidos foram homogeneizados em 3 mL de solução clorofórmio-metanol-água (2:1:0,5). O homogenato foi centrifugado a 180 rpm por 5 minutos, o processo se repetiu por três vezes, separando a amostra de lipídeo em um novo tubo e acrescentando 1 mL de clorofórmio para uma nova centrifugação. Os tubos foram mantidos em estufa a 60°C até secagem do solvente (2 a 6 horas). O resíduo de lipídeo seco extraído dos tecidos foi ressuspensos com 1 mL de clorofórmio. Uma alíquota de 100 μL da mistura foi

solubilizada em 200 μ L de ácido sulfúrico concentrado e mantido em banho-maria por 10 minutos a 100°C. Após as amostras estarem frias, adicionou-se 5 mL do reagente fosfovanilina (vanilina 0,6% - ácido sulfúrico – água deionizada, na proporção 7:12:1), mantendo a reação em banho-maria a 37°C por 15 minutos. As absorbâncias foram lidas em leitora de microplaca ThermoPlate Reader MN em 550 nm. A concentração foi calculada a partir da curva padrão de ésteres metílicos de óleo de fígado de bacalhau (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO) e expressa em miligrama por grama (mg/g).

3.6.2 Concentração hepática de proteínas totais

A concentração de proteína total do tecido hepático foi determinada segundo Bradford (1976), cuja técnica consiste na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G – 250 (Sigma – Aldrich, ref. 27815, St. Louis, MO, USA) à proteína, empregando como padrão albumina de soro bovino (Sigma – Aldrich, ref. 4919 – 5G, St. Louis, MO, USA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Biotek Epoch 2 Microplate Reader em 595 nm e sua concentração expressa em miligrama por mililitro (mg/mL).

3.6.3 Concentração hepática de glicogênio

As amostras de tecido hepático armazenadas a -80°C foram descongeladas, homogeneizadas e desproteinizada em ácido perclórico 6%, seguido da adição de carbonato de potássio (3M) para neutralização e quantificação do glicogênio hepático. O homogenato foi centrifugado a 2885 rpm por 15 minutos a 10°C e o sobrenadante separado, foi hidrolisado com amiloglicosidase e incubado em temperatura ambiente por uma hora. Após a adição de ácido perclórico 6% e neutralização com carbonato de potássio (2,25M) repetiu-se a centrifugação a 2885 rpm por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi separado e a leitura foi determinada pelo reagente do “kit” de glicose (LabTest, ref. 1522) em espectrofotômetro Shimadzu UVmini – 1240 em 505nm. As concentrações de glicogênio presentes no fígado foram calculadas a partir da curva padrão de glicogênio, extraído de fígado bovino (Ref. G – 0885, Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO) e expressa em porcentagem.

3.7 Indicadores do desempenho zootécnico (percentual de ganho de peso; taxa de crescimento específico e conversão alimentar)

3.7.1 Percentual de Ganho de Peso (PGP)

Os pesos dos peixes obtidos na biometria inicial e ao final de quarenta e três dias de alimentação, foram usados para calcular o percentual de ganho de peso, obtidos ao longo do período experimental. Seu cálculo foi realizado pela seguinte fórmula:

$$X = \frac{PMF * 100\%}{PMI}$$

3.7.2 Taxa de crescimento específico (TCE)

A taxa de crescimento específico leva em consideração os dados de peso médio final (PF) e peso médio inicial (PI) dos peixes, pelo tempo decorrido do experimento (T). A fórmula para seu cálculo é:

$$TCE = 100 * \frac{(\ln PF - \ln PI)}{T}$$

O resultado é expresso em % por dia, em que $\ln PF$ = logaritmo do peso médio final e $\ln PI$ = logaritmo do peso médio inicial.

3.7.3 Conversão alimentar (CA)

A conversão alimentar é calculada pelo consumo total de ração dividido pelo ganho de peso médio dos peixes. A fórmula para seu cálculo é:

$$CA = \frac{\text{consumo total de ração}}{\text{ganho de peso}}$$

3.8 Índices morfométricos

Com o peso da gordura visceral e o fígado, foram calculados o índice gorduro-víscero-somático (IGVS) e o índice hepato-somático (IHS), pelas formulas a baixo e os resultados são expressos em porcentagem (%).

$$\text{IGVS} = \frac{\text{Peso gordura visceral}}{\text{Peso corporal}} * 100$$

$$\text{IHS} = \frac{\text{Peso tecido hepático}}{\text{Peso corporal}} * 100$$

4 Análise estatística

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), constituídos de quatro dietas experimentais (controle; 1% TAU; 2% TAU e 4% TAU), duas condições de exposição à temperatura (28 e 16 °C) e três fatores longitudinais (tempos de coleta: basal, 24 horas e 7 dias). Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade (Cramer-von Mises), homocedasticidade (Brown-Forsythe) e análise de variância ANOVA one-way e quando as diferenças eram significativas ($p \leq 0,05$), foi aplicado o teste Duncan's para comparação das médias, utilizando o software SAS (versão 9.3). Os valores são apresentados em média $\pm$ erro padrão.

5 Resultados

5.1 Biomarcadores de estresse (concentrações plasmáticas de cortisol e glicose)

Os peixes alimentados com a dieta suplementadas de 2% TAU apresentaram maiores concentrações de cortisol (Figura II A) em relação aos demais tratamentos ($p = 0,0364$), após exposição prolongada, de sete dias, a 16°C.

Em relação a glicose plasmática, houve aumento das concentrações em peixes de todos os tratamentos após exposição de sete dias ao frio [controle ($p = 0,0195$); 1% TAU ($p = 0,0048$); 2% TAU ($p = 0,0004$) e 4% TAU ($p = 0,0007$)] (Figura II B).

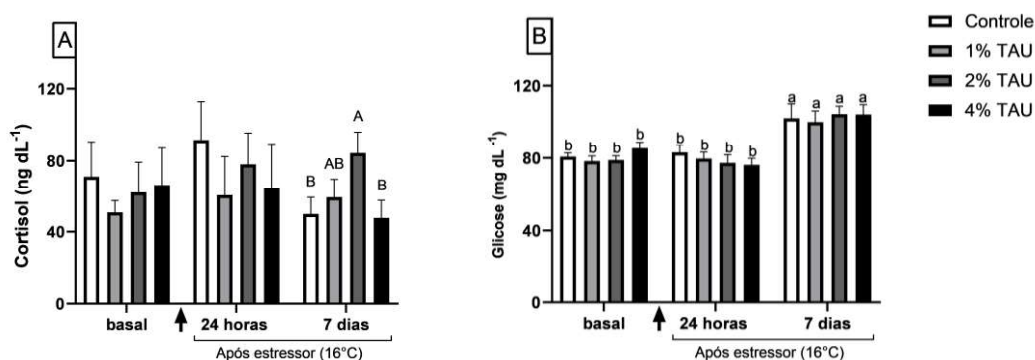


Figura II. Concentração de cortisol (A) e glicose (B) do plasma no sangue de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostragens: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragens e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.2 Biomarcadores de imunidade inata

5.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

Os peixes alimentados com suplementação de 1% TAU ($p = 0,0452$) e 2% TAU ($p = 0,0106$) apresentaram diminuição da ARL (Figura III A) quando expostos agudamente a 16°C (24 horas), no entanto, apenas os peixes que receberam dietas suplementadas de 2% TAU mantiveram os valores reduzidos após exposição crônica (sete dias) ao teste de temperatura.

5.2.2 Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC)

Analisando a AHC em cada amostragem, as flutuações entre tratamentos não permitem definir um padrão claro. As diferenças ocorrem, na coleta basal, (Figura III B) entre os peixes que receberam a dieta suplementada de 2% TAU (AHC mais elevada, $p = 0,0192$). Diferença aparece também após exposição crônica a 16°C, com os valores mais altos nos peixes alimentados com suplementação de 1% TAU ($p = 0,0023$). Analisando ao longo das amostragens, a AHC diminuiu nos peixes alimentados com as dietas controle ($p = 0,0039$) e suplementação dietética de 2% TAU ($p = 0,0007$), após exposição crônica a 16°C, quando comparado aos níveis basais. Apenas os peixes que receberam a dieta suplementada de 4% TAU ($p = 0,0179$) responderam à exposição aguda, com aumento da AHC, que volta aos níveis basais com a cronicidade da exposição.

5.2.3 Concentração sérica de lisozima

Após 43 dias de alimentação, a suplementação dietética com 2% de taurina aumentou a concentração de lisozima sérica (Figura III C) comparada aos peixes da dieta controle ($p = 0,0112$), enquanto as concentrações nos outros dois tratamentos com suplementação de TAU (1 e 4 %) tiveram valores intermediários. Após exposição à baixa temperatura, ocorre uma oscilação nas concentrações de lisozima nos peixes alimentados com suplementação de 2% TAU, com tendência à redução às 24 horas e recuperação aos sete dias, mas a diferença só é significativa quando se compara este tratamento às 24 horas e sete dias ($p = 0,0439$).

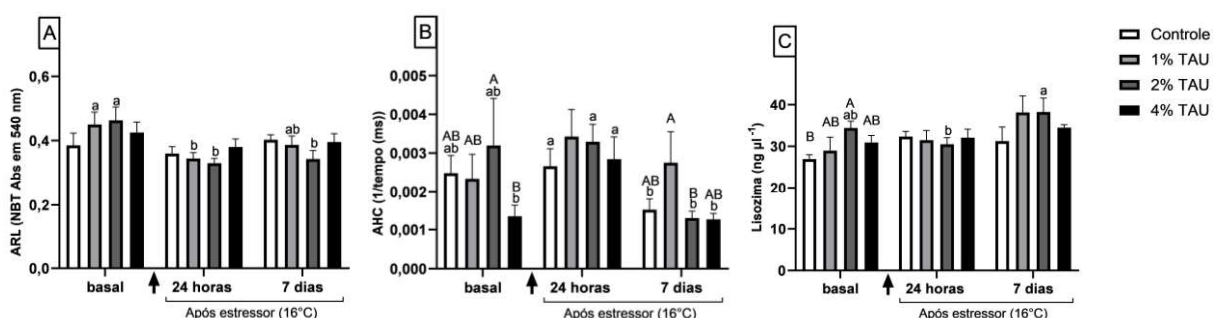


Figura III. Atividade Respiratória dos Leucócitos (ARL) (A) do sangue com heparina, Atividade Hemolítica do sistema Complemento (AHC) (B) do soro do sangue e concentração sérica de lisozima (C) do soro do sangue sem anticoagulante de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostragens: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragens e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.3 Contagem de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e monócitos circulante

Nos peixes alimentados com a dietas controle, o número de neutrófilos (Figura IV A) e eosinófilos (Figura IV B) diminuíram ($p = 0,0159$; $p = 0,0412$, respectivamente) após exposição à baixa temperatura, de forma aguda e de forma crônica. Já nos peixes que receberam a dieta suplementada de 4% TAU, observa-se comportamento inverso, com aumento do número de neutrófilos ($p = 0,0100$) com a exposição à baixa temperatura.

Em relação ao número de linfócitos (Figura IV D), houve um aumento do número nos peixes alimentados com a dieta controle ($p = 0,0325$) frente à exposição a 16°C, aguda e cronicamente. Uma diminuição do número dessas células é encontrada nos peixes alimentados com suplementação de 4% TAU ($p = 0,0127$) medida que se prolonga a exposição a 16°C, após sete dias.

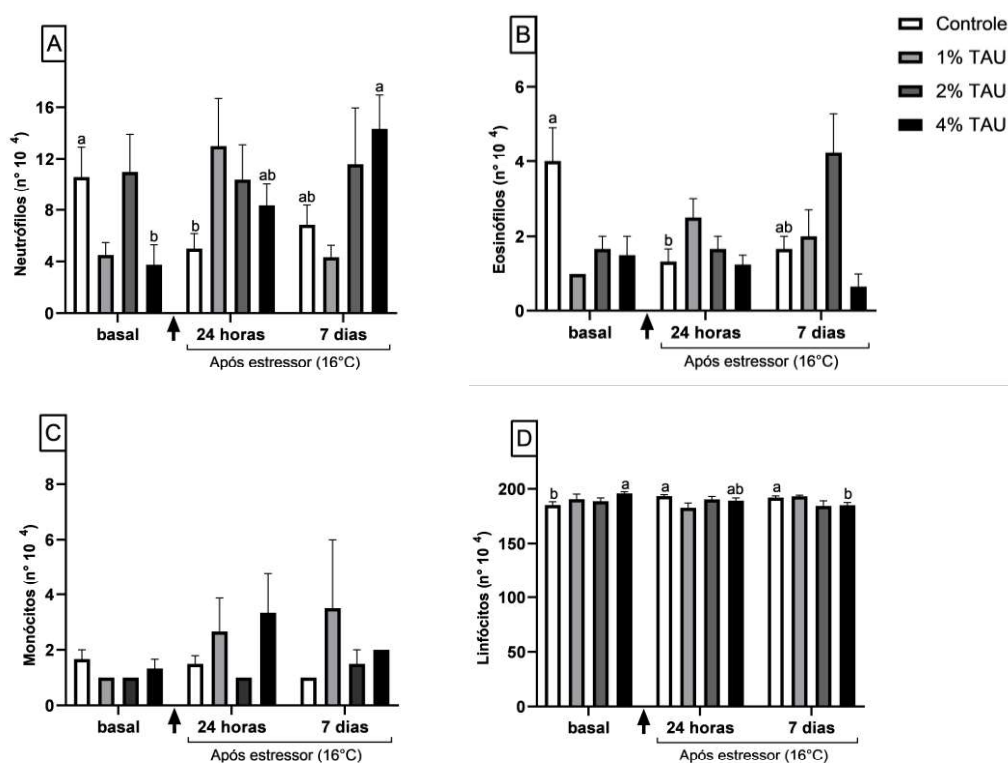


Figura IV. Número de Neutrófilos (A), Eosinófilos (B), Monócitos (C) e Linfócitos (D) circulantes no sangue em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostragens: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragens e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.4 Biomarcadores do sistema antioxidante

5.4.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD aumentou gradativamente à medida que o tempo de exposição a 16°C se estendeu (Figura V A) nos peixes alimentados com a dieta suplementada de 2% TAU ($p = 0,0456$).

5.4.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT não mostrou diferença significativa entre tratamentos ou períodos de amostragem (Controle - $p = 0,4453$; 1% TAU - $p = 0,2574$; 2% TAU - $p = 0,9158$ e 4% TAU - $p = 0,7964$) (Figura V B).

5.4.3 Atividade da enzima glutationala peroxidase (GPx)

A atividade da GPx aumentou após exposição crônica a 16°C nos peixes alimentados com a dieta suplementada de 1% TAU ($p = 0,0329$) (Figura V C)

5.4.4 Atividade da enzima glutationala-S-transferase (GST)

A atividade da GST aumentou após exposição por sete dias nos peixes alimentados com a dieta controle ($p = 0,0336$) e, suplementação de 2% TAU ($p = 0,0126$) e 4% TAU ($p = 0,0220$) (Figura V D).

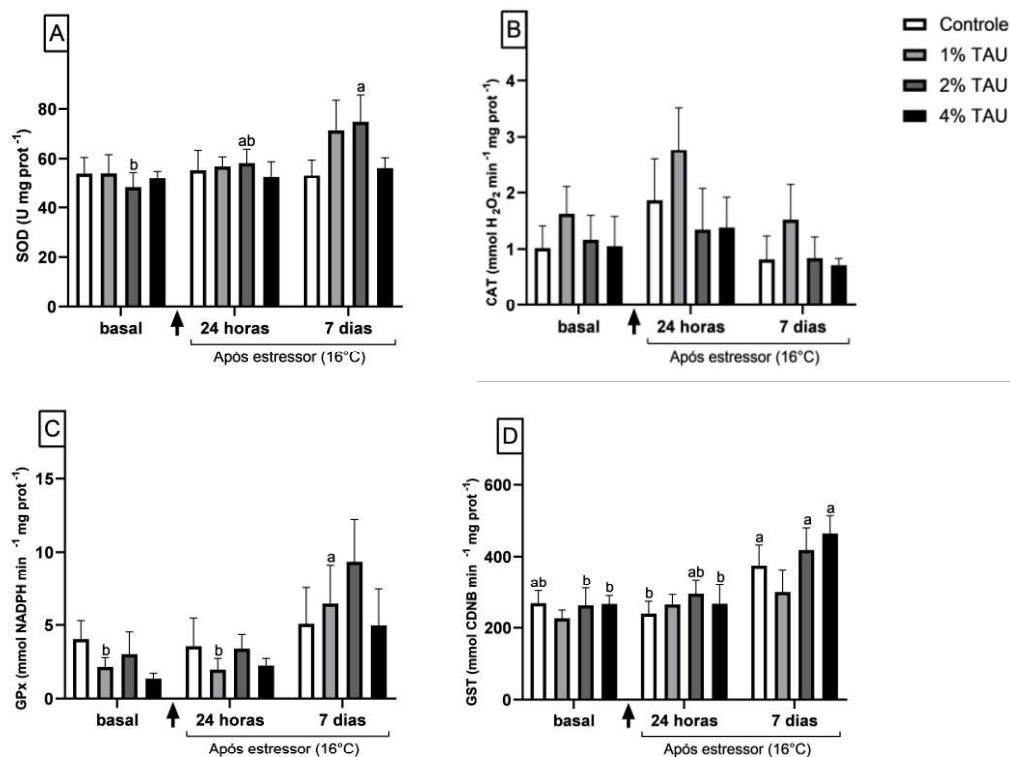


Figura V. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), glutatona peroxidase (GPx) (C) e glutatona-S-transferase (GST) (D) no fígado de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostras: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragem e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.4.5 Concentração da glutatona reduzida (GSH)

As concentrações hepáticas da GSH aumentaram após sete dias de exposição ao frio nos peixes alimentados com suplementação de 2% TAU ($p = 0,0391$) (Figura VI A), enquanto, nos peixes alimentados com a dieta suplementada de 4% TAU, os valores da GSH diminuem agudamente e voltam aos níveis basais na amostragem aos 7 dias ($p = 0,0401$).

5.4.6 Determinação da peroxidação lipídica (LPO)

A LPO no fígado não mostrou diferença significativa nos peixes submetidos a diferentes tratamentos ou entre os períodos de amostragem (Controle - $p = 0,4278$; 1% TAU - $p = 0,9475$; 2% TAU - $p = 0,6270$ e 4% TAU - $p = 0,7610$) (Figura VI B).

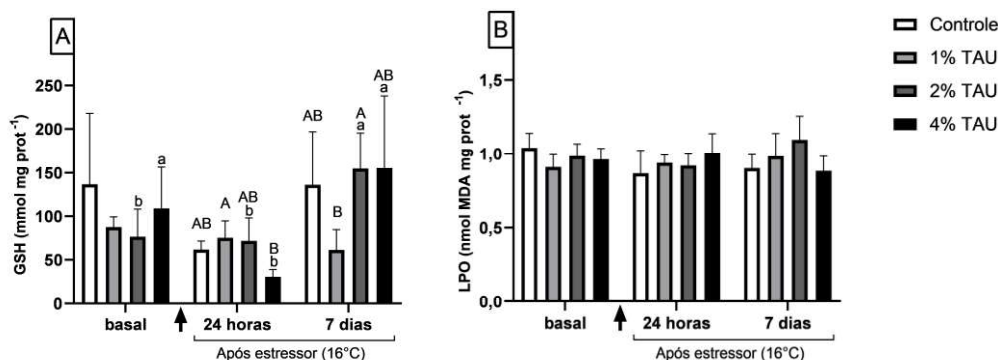


Figura VI. Concentração da glutatona reduzida (GSH) (A) e determinação da peroxidação lipídica (LPO) (B) no fígado de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostras: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragem e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.5 Biomarcadores metabólicos sanguíneos

5.5.1 Concentração plasmática de triglicerídeos

As concentrações de triglicerídeos plasmáticos (Figura VII A) nos peixes alimentados com suplementação de 1% TAU ($p = 0,0457$), 2% TAU ($p = 0,0164$) e 4% TAU ($p = 0,0227$) diminuíram após exposição aguda a 16°C e, aos sete dias de exposição as concentrações permaneceram nos mesmo níveis nos peixes da dieta suplementada de 2% TAU, enquanto houve recuperação aos valores basais nos peixes que receberam suplementação de 4% TAU e valores intermediários nos que receberam suplementação de 1% TAU na exposição crônica ao frio.

5.5.2 Concentração sérica de colesterol

Em relação às concentrações de colesterol sérico (Figura VII B), após exposição aguda a 16°C ocorre redução dos valores nos peixes alimentados com a dieta suplementada de 2% TAU ($p = 0,0239$), os quais não se recuperam após sete dias expostos ao frio. Após exposição crônica, uma redução é observada nos peixes da dieta controle ($p = 0,0398$) e alimentados com suplementação de 1% TAU ($p = 0,0065$).

5.5.3 Concentração plasmática de proteína total

Após 43 dias de alimentação ($p = 0,0450$), os peixes alimentados com suplementação de 2% TAU apresentaram menor concentração de proteína no plasma (Figura VII C) em relação aos peixes da dieta controle e, esse mesmo padrão é observado na amostragem de 7 dias ($p = 0,0387$).

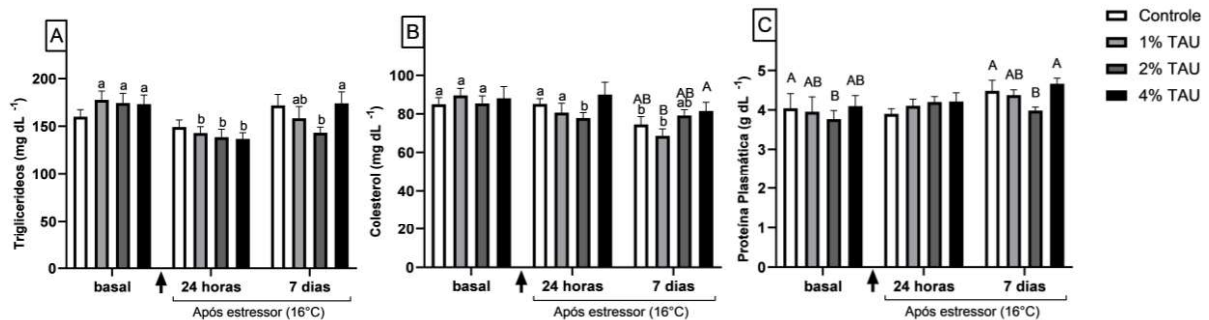


Figura VII. Concentração de triglicerídeos no plasma (A), concentração de colesterol no soro (B) e proteína plasmática (C) de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostragens: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragens e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.6 Biomarcadores teciduais

5.6.1 Concentração de lipídeo hepático e muscular

Na coleta basal, após 43 dias de alimentação, a concentração de lipídeo hepático foi maior nos peixes alimentados com a dieta suplementada de 1% TAU ($p = 0,0187$) (Figura VIII A), mas não observamos outras diferenças significativas por efeito das dietas ou da temperatura.

Em relação ao lipídeo muscular (Figura VIII B), apenas após sete dias de exposição a 16°C, observa-se diferença entre os tratamentos, sendo os valores maiores nos peixes alimentados com suplementação de 4% TAU comparado aos peixes da dieta controle ($p = 0,0382$).

5.6.2 Concentração de proteína total hepática

A concentração hepática de proteína total (Figura VIII C) diminui gradativamente à medida que a exposição ao frio se estende, sendo menor nos peixes alimentados com suplementação de 2% TAU ($p = 0,0434$) aos sete dias.

5.6.3 Concentração de glicogênio hepático

Nos peixes que receberam a dieta suplementada de 2% TAU, as concentrações de glicogênio (Figura VIII D) apresentaram um perfil de queda na amostragem de 24 horas, recuperando os valores basais na amostragem de 7 dias ($p = 0,0207$). Nesta amostragem, as concentrações de glicogênio flutuaram entre os tratamentos, sendo diferentes apenas entre os peixes das dietas suplementadas de 1% TAU e 2% TAU, com valores mais elevados nos peixes da dieta suplementada de 2% TAU ($p = 0,0375$).

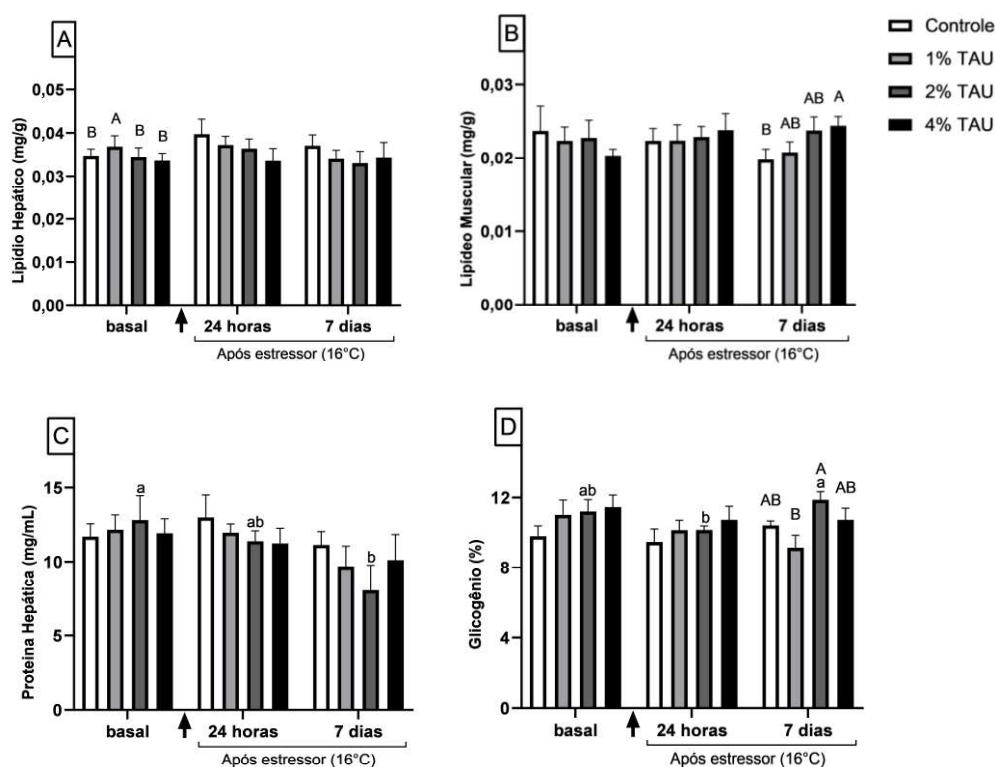


Figura VIII. Concentração de lipídeo hepático (A), muscular (B), concentração de proteína total hepática (C) e concentração de glicogênio hepático (D) de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (1% TAU - T2), 2% taurina (2% TAU - T3) e 4% taurina (4% TAU - T4). Amostras: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início da exposição a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragens e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

5.7 Indicadores de desempenho (Peso médio final, percentual de ganho de peso, taxa de crescimento específica, conversão alimentar)

Após quarenta e três dias de oferta das diferentes dietas, os peixes alimentados com a dieta suplementada de 1% TAU apresentaram maior peso médio final ($p = 0,0327$), bem como

melhor taxa de crescimento específico ($p < 0,0001$) quando comparado aos peixes dos demais tratamentos e a dieta controle. A porcentagem de ganho em peso foi maior nos peixes alimentados com a dieta suplementada de 4% TAU, quando comparada aos peixes da dieta controle. Os peixes alimentados com suplementação de 1% TAU ainda apresentaram uma melhor conversão alimentar ($p = 0,0041$), mas não diferiu estatisticamente dos peixes alimentados com a dieta controle (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho produtivo do *P. mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas de taurina por 43 dias.

¹ Desempenho Produtivo					
	PMI (g)	PMF (g)	PGP	TCE (%)	CA
F	6,32	5,36	2,96	25,35	8,21
P	0,0034	<0,0001	0,0373	<0,0001	0,0009
² Dietas					
Controle	142,52 ± 15,64 ^a	193,0 ± 19,2 ^b	35,41 ± 5,84 ^b	0,87 ± 0,04 ^b	1,65 ± 0,004 ^a
1% TAU	146,32 ± 7,52 ^a	198,6 ± 9,76 ^a	35,72 ± 5,52 ^b	0,89 ± 0,02 ^a	1,59 ± 0,004 ^a
2% TAU	104,79 ± 6,43 ^b	151,12 ± 7,16 ^b	44,21 ± 5,28 ^{ab}	0,77 ± 0,05 ^c	1,72 ± 0,03 ^b
4% TAU	95,30 ± 6,19 ^c	139,62 ± 7,23 ^b	46,51 ± 5,14 ^a	0,71 ± 0,04 ^d	1,72 ± 0,004 ^b

Letras sobrescritas indicam diferença pelo teste de Duncan's ($P \leq 0,05$).

¹Valores são médias ± erro padrão da média. Peso Médio Inicial (PMI); Peso Médio Final (PMF); Percentual de Ganho de Peso (PGP); Taxa de Crescimento Específico (TCE) e Conversão Alimentar (CA).

²Ração comercial (controle - T1); ração + 1% (1% TAU - T2), ração + 2% (2% TAU - T3) e ração + 4% (4% TAU - T4).

5.8 Indicadores morfométricos. Índice hepatossomático (IHS) e gordura víscero-somático (IGVS)

Os peixes alimentados com as dietas controle ($p = 0,0172$) e, suplementação de 2% TAU ($p = 0,0068$) e 4% TAU ($p = 0,429$) responderam à exposição aguda a 16°C, apresentando diminuição do IHS (Figura IX A). Nos peixes alimentados com suplementação de 2% TAU os valores se mantiveram após sete dias a 16°C, enquanto nos peixes alimentados com dietas suplementadas de 4% TAU os valores voltaram aos níveis basais. Nos peixes controle ocorreu uma flutuação no IHS, mas sem padrão definido.

Em relação ao índice gordura víscero-somático (IGVS) (Figura IX B), nos peixes da dieta controle ($p = 0,0446$) e alimentados com suplementação de 1% TAU ($p = 0,0433$) diminuíram após exposição aguda ao frio, voltando aos níveis basais na amostragem de sete dias. Os peixes alimentados com suplementação de 2 e 4% de TAU apresentaram menor IGVS entre os tratamentos ($p = 0,0012$) na amostragem de sete dias.

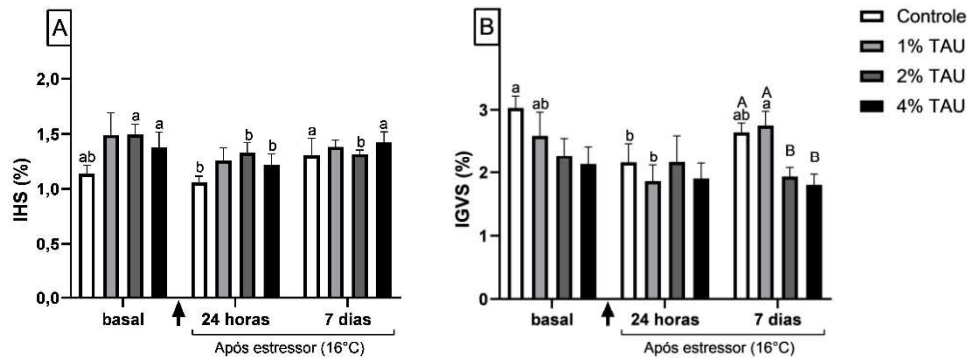


Figura IX. Índice Hepatosomático (IHS) (A) e Índice Gordura Viscero-somático (IGVS) (B) em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados por 43 dias, com dieta comercial (controle - T1) e, dieta com acréscimo de 1% taurina (TAU1% - T2), 2% taurina (TAU2% - T3) e 4% taurina (TAU4% - T4). Amostras: basal (28°C em todos os tratamentos); 24 horas e 7 dias de exposição contínua à água na temperatura de 16°C. Seta (↑) indica o início do teste de temperatura a 16°C. Letras minúsculas indicam diferenças do mesmo tratamento entre os tempos de amostragens e letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo amostral. Ausência de símbolos indica ausência de diferença estatística.

6 Discussão

A criação de peixes é uma atividade que exige práticas que podem ser estressoras para os animais. Os agentes estressores podem ser de natureza química e física, e neste grupo podemos incluir variação na temperatura da água (Barton *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2023). Este estressor ganha importância, visto que as mudanças climáticas têm sido responsáveis na oscilação da temperatura global e um desafio ambiental para inúmeras espécies de peixes e para a aquicultura (Xie, 2020; Mugwanya *et al.*, 2022). No caso do pacu, ele se distribui em regiões do país onde quedas de temperatura causadas por frentes frias, no outono e inverno são comuns (Sant’Anna Neto *et al.*, 2015), o que pode impactar sua produção e o torna um modelo para estudo na região subtropical. Por outro lado, buscar estratégias que minimizem possíveis impactos negativos de baixas temperaturas na produção de peixes é necessário, como o uso de nutracêuticos, como a taurina.

Quando os peixes detectam agentes estressores, mecanismos neuro-hormonais são acionados para a luta e sobrevivência do organismo e, com isso liberação de catecolaminas que estimulam a glicogenólise, resultando na liberação de glicose do fígado para o sangue e cortisol que mantém a elevação dos níveis de glicose (Wendeelar Bonga, 1997; Barton *et al.*, 2002).

Neste estudo, a exposição dos peixes a baixa temperatura não promoveu elevação significativa do cortisol como mostrado anteriormente na mesma espécie (Faria *et al.*, 2023) e em outras espécies (Islam *et al.* 2021), mas as variações de valores observadas podem ter sido um fator para mascarar essa resposta, independente de suplementação da dieta com taurina. Já, considerando a resposta de glicemia, outro indicador de resposta de estresse, é possível sugerir que a exposição crônica a 16°C foi estressante para os peixes, independente da taurina. Estudos anteriores, entretanto, mostram que a taurina atuou como atenuador de resposta de estresse em zebrafish (Mezzomo *et al.*, 2019), embora o protocolo experimental do referido estudo tenha sido exposição dos peixes à taurina na água, por tempo curto, diferente deste estudo que utilizou administração oral por tempo prolongado. Já em linguado, a injeção intraperitoneal de taurina resultou na diminuição do cortisol plasmático nos peixes quando submetidos ao estressor de forma aguda e crônica (Liu *et al.*, 2022).

Considerando apenas a administração da taurina pré-exposição ao frio, ela não modificou as concentrações de glicose, diferente do relatado em outros estudos. Em *Paralichthys olivaceus* alimentados com suplementação de 2% de taurina houve aumento de glicose plasmática (Han *et al.*, 2014), enquanto em *Pelteobagrus fulvidraco* alimentados com

dietas suplementadas com taurina, houve diminuição na glicose com o aumento nos níveis do aminoácido (Li *et al.*, 2016). Redução da glicose também foi descrito em *Diplodus sargus* (Magalhães *et al.*, 2019).

O metabolismo energético e a capacidade imunológica dos peixes são suscetíveis ao estresse de temperatura (Islam *et al.*, 2020). O estresse pode interromper o metabolismo energético e suprimir o sistema imunológico em peixes, aumentando sua suscetibilidade a doenças e até mesmo levando à mortalidade (Thompson *et al.*, 2015; Magouz *et al.*, 2020). Em particular, a imunidade específica pode ser negativamente afetada pela hipotermia (Magnadóttir, 2006; Kortet & Vainikka, 2008), embora muitos peixes, como um possível mecanismo de compensação, podem preservar parâmetros imunológicos celulares e humorais inatos mesmo em temperaturas inadequadas para a espécie (Van Muiswinkel & Vervoorn Van Der Wal, 2006; Velmurugan *et al.*, 2019).

A baixa temperatura a que o pacu foi exposto, promoveu alterações nos indicadores metabólicos analisados que não refletem um padrão claro, mas agudamente reduziu triglicerídeos nos peixes que receberam taurina e cronicamente as concentrações aumentaram apenas nos peixes 4% TAU. Redução do colesterol foi observada agudamente no grupo 2% TAU e cronicamente nos peixes controle e 1% TAU, enquanto proteína hepática reduziu cronicamente no grupo 2% TAU. Altos níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol, em geral, indicam um estado fisiológico alterado dos peixes (Eslamloo *et al.*, 2012). Segundo Li *et al.* (2016), em estudo com juvenis de *Pelteobagrus fulvidraco*, a proteína sérica, triglicerídeos, colesterol e alanina aminotransferase diminuíram com o aumento dos níveis de taurina na ração. Já no *Paralichthys olivaceus*, teores de taurina de 1,6 g/kg de ração diminuíram a concentração de glicose plasmática, a transaminase glutâmico-oxalacética, transaminase glutâmico-piruvica e triglicerídeos dos peixes (Han *et al.*, 2014).

Em relação aos indicadores do sistema imune, tanto a exposição aguda quanto a prolongada ao frio afetou a ARL dos peixes da dieta controle, mas reduziu as respostas nos peixes 1% TAU e 2% TAU. A exposição aguda ativou o sistema complemento nos peixes que receberam a dieta 4% TAU, mas a exposição crônica prejudicou a AHC de modo geral, incluindo os peixes da dieta controle. A concentração de lisozima não mostrou alterações significativas nem aguda ou cronicamente ou ainda por ação da taurina. Em estudo anterior com o mesmo peixe (Faria *et al.*, 2023), entretanto, a ARL e o sistema complemento foram ativados depois de 24 horas de exposição a 16°C e a lisozima 24 horas após retorno à temperatura de 28°C, estabelecida como controle. Outros estudos também descrevem prejuízos no sistema

imune como consequência da temperatura na produção de peixes (Ahmad *et al.*, 2011; Abram *et al.*, 2017; Abram *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Diferenças de resultados podem estar associadas aos diferentes protocolos experimentais.

Alterações das células leucocitárias como eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e monócitos, são usados como indicadores de estresse em peixes (Falcon *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2010, Araujo *et al.*, 2011). No presente estudo, a temperatura causou gradual neutropenia nos peixes controle, o que representa diminuição da capacidade de defesa do sistema imune (Havixbeck & Barreda, 2015), mas a taurina reverteu esse perfil nos peixes que receberam 4% TAU, nos quais observamos gradual neutrofilia. Eosinofilia foi observada nos eixes controle após redução da temperatura, mas não nos peixes suplementados com taurina. A temperatura aumentou a contagem de linfócitos nos peixes controle e reduziu cronicamente nos peixes que receberam 4% TAU. Os linfócitos podem variar devido aos efeitos do cortisol plasmático, como resultado a exposição a temperaturas subideais (Kortet & Vainikka, 2008; Barros *et al.*, 2014), além disso, a supressão na geração de linfócitos T e um aumento na apoptose de linfócitos B na circulação sanguínea também podem contribuir para essa diminuição (Press, 1998; Donaldson *et al.*, 2018). A redução aguda e crônica da temperatura não alterou o número de monócitos de peixes de nenhum grupo.

Sob condições normais, as defesas antioxidantes dos peixes impedem a geração descontrolada de EROs por meio das enzimas antioxidantes (Trenzado *et al.*, 2009). Flutuações repentinas de temperatura podem causar um acúmulo considerável de espécies reativas de oxigênio (ROS) em peixes, resultando em estresse oxidativo (Lushchak & Bagnyukova, 2006). Posteriormente, o sistema de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase, é ativado para eliminar o excesso de ROS (Kalmar & Greensmith, 2009).

As alterações nos indicadores do sistema antioxidantes, neste estudo, foram observadas na atividade da SOD, que aumentou na exposição crônica a 16°C e da GPx, com mesmo perfil. Estes aumentos aconteceram em peixes que receberam taurina (2% e 1%, respectivamente). Aumento também foi observado na atividade da GST, mas ocorreu independente da taurina. Comportamento de aumento na exposição crônica a 16°C também ocorreu nas concentrações de GSH, que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Flohé, 2013). As alterações citadas nos indicadores do sistema antioxidante podem ser responsáveis pela ausência de estresse oxidativo neste estudo, mostrando que foram efetivas no controle desse indicador. Os principais efeitos antioxidantes

aconteceram nos peixes que receberam taurina. Um dos benefícios da taurina está relacionada a sua ação antioxidante, vinculada às características citoprotetoras, modulando a produção de EROs. Sua atuação pode ser de forma indireta, melhorando a atividade das enzimas antioxidantes ou de forma direta (Aydogdu *et al.*, 2007). Em um trabalho realizado comparando diferentes porcentagens de taurina na ração para catfish, as atividades da SOD, CAT, GPx e determinação da LPO, apresentaram melhores resultados nos peixes com maiores concentrações de taurina dietética (Li *et al.*, 2016).

O desempenho zootécnico dos peixes após 43 dias de alimentação com níveis crescentes de taurina na dieta. Os peixes alimentados com 1% de taurina apresentaram maior peso médio final, bem como maior taxa de crescimento específico e melhor conversão alimentar. Nos peixes que receberam as dietas com concentrações mais elevadas (2% e 4%) de taurina, apresentaram as piores CA, entretanto, demonstraram os melhores percentuais de ganho de peso. A suplementação de taurina (0,99%) melhorou as taxas de crescimento, digestibilidade da ração e a eficiência alimentar de carpas (Liu *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2005), bem como 1% de taurina em alevinos de tilápia (Gonçalves *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstraram que quando é fornecida em concentrações acima do exigido para a espécie, a taurina pode ser secretada para que se mantenha a concentração ideal para o corpo. Para a espécie marinha *Paralichthys olivaceus*, níveis mais elevado de taurina diminuiu o ganho de peso dos peixes (Han *et al.*, 2014). Segundo Al-Feky *et al.* (2016) testando diferentes porcentagens de taurina (0,5; 1 e 1,5 % kg⁻¹) na alimentação de alevinos de tilápia, os autores demonstram que acima de 1% os peixes tiveram seu desempenho reduzido. Esse processo pode exigir aumento no consumo de energia, consequentemente pode reduzir ou nivelar o desempenho de crescimento (Pinto *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2013). Divergindo dos resultados do presente estudo, onde as suplementações mais elevadas de taurina demonstraram maiores percentuais de ganho de peso para juvenis de pacu.

Deve-se destacar que a suplementação das dietas do pacu com taurina é uma estratégia importante, que deve ser explorada, visto que a espécie tem o hábito alimentar onívoro, com grande aceitação por fontes proteicas de origem vegetal (Paula *et al.*, 1988; Abimorad & Carneiro, 2004; Fabregat *et al.*, 2011), fonte esta com, praticamente, inexistência de taurina. A taurina é encontrada em grandes quantidades nos tecidos animais (músculo, vísceras e cérebro), mas é raramente encontrada em plantas (Jacobsen & Smith, 1968; Larsen *et al.*, 2011). Como resultado, dietas baseadas em proteína vegetal e indivíduos alimentados por via parentérica não suplementados de taurina apresentam baixos níveis plasmáticos desse aminoácido e podem

necessitar de sua suplementação (Bouckenooghe *et al.*, 2016; Gormley *et al.*, 2007; Salze & Davis, 2015).

7 Conclusão

A exposição crônica do pacu a 16°C se mostrou um fator de estresse, considerando o perfil das concentrações sanguíneas de glicose; causou neutropenia, eosinopenia e linfocitose, sugerindo prejuízo da resposta imune inata.

A suplementação da dieta com taurina ativou agudamente o sistema complemento. O sistema antioxidante foi ativado nos peixes alimentados com suplementação de taurina.

Os peixes alimentados com suplementação de taurina apresentaram o melhor desempenho de crescimento, aproveitamento do alimento e ganho de peso.

8 Referências

- ABRAM, Q.; DIXON, B.; KATZENBACK, B. Impacts of low temperature on the teleost immune system. **Biological**. v. 6, n. 4, p. 39, 2017. <https://doi.org/10.3390/biology6040039>
- ABRAM, Q. H., RODRIGUEZ-RAMOS, T., BOLS, N. C., KATZENBACK, B. A., DIXON, B. Effect of suboptimal temperature on the regulation of endogenous antigen presentation in a rainbow trout hypodermal fibroblast cell line. **Developmental & Comparative Immunology**. v, 100, p. 103–423, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103423>
- AEBI H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMAD, S. M., SHAH, F. A., BHAT, F. A., BHAT, J. I. A., BALKHI, M. H. Thermal adaptability and disease association in common carp (*Cyprinus carpio communis*) acclimated to different (four) temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 36, p. 492–497, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.08.007>
- ALZAID, A.; HORI, T. S.; HALL, J. R.; RISE, M. L.; GAMPERL, A. K. Low-induced changes in stress hormone and steroidogenic transcript levels in cunner (*Tautoglabrus adspersus*), a fish capable of metabolic depression. **Gen Comp Endocrinol**. v. 224, p. 126–135, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.07.007>
- ANDERSON D.P., SIWICKI A.K. Hematologia básica e sorologia para programas de saúde de peixes. In: Shariff M, Arthur JR, Subasinghe RP (eds) Doenças na Aquicultura Asiática II. Manila: Seção de Saúde dos Peixes, Sociedade de Peixes Asiáticos, p. 185–202, 1995.
- ARAUJO, D. D. M., PEZZATO, A. C., BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., NAKAGOME, F. K. Hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 294-302, 2011.
- ASSEFA, A.; ABUNNA, F. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. **Veterinary Medicine International**. v. 2018, n. 1, p. 5432497, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>

AYDOGDU, N.; ERBAS, H.; KAYMAK, K. The antioxidant effects of taurine, melatonin and N-Acetylcysteine in cadmium-induced lung injury. **Trakya Univ. Tip Fak. Derg.** v. 24, p. 43–48, 2007.

BARROS, M. M.; FALCON, D. R.; DE OLIVEIRA ORSI, R.; PEZZATO, L. E.; FERNANDES JR, A. C.; GUIMARÃES, I. G.; SARTORI, M. M. P. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish & shellfish immunology**, v. 39 n. 2, p. 188-195, 2014.

BARTON, B. A.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. M. Physiological and Condition-Related Indicators of Environmental Stress in Fish. **American Fisheries Society**, Bethesda, p. 111–148, 2002.

BEUTLER E, DURAN O, KELLY B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 284, p. 861-882, 1963.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.2, p.425-429, 2013.

DEMERS N. E., BAYNE C. J. **The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout.** *Dev Comp Immunol* 21:363–373, 1997.

CAMEJO, G., WALLIN, B., ENOJÄRVI, M. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. **Free radical and antioxidant protocols**, p. 377-387, 1998.

DONALDSON, M. R.; COOKE, S. J.; PATTERSON, D. A.; MACDONALD, J. S. Cold shock and fish. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 7, p. 1491-1530, 2018.

ESLAMLOO, K.; FALAHATKAR, B.; YOKOYAMA, S. Effects of dietary bovine lactoferrin on growth, physiological performance, iron metabolism and non-specific immune responses of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 32, p. 976–985, 2012.

FABREGAT, T. E. H. P., RODRIGUES, L. A., NASCIMENTO, T. M., URBINATI, E. C., SAKOMURA, N. K., FERNANDES, J. B. K. Fontes de fibra na alimentação do pacu: desempenho, composição corporal e morfometria intestinal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1533-1540, 2011.

FALCON, D. R., BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., SAMPAIO, F. G., HISANO, H. Physiological responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed vitamin C-and lipid-supplemented diets and submitted to low-temperature stress. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 287-295, 2007.

FARIA, C. F. P., PIEDADE, A. E., URBINATI, E. C. Effect of low water temperature on the stress, innate immune, and antioxidant responses of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, a sub-tropical fish. **Aquaculture International**, v. 31, p. 3297–3310, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01125-4>

FERNANDES, J. A. C., PEZZATO, L. E., GUIMARÃES, I. G., TEIXEIRA, C. P., KOCH, J. F. A., BARROS, M. M. Resposta hemática de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidos a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1619-1625, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000800001>

FLOHÉ, L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3139-3142, 2013.

FRINGS, C. S., FENDLEY, T. W., DUNN, R. T., QUEEN, C. A. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin reaction. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 7, p. 673–674, 1972.

GONÇALVES, G. S.; RIBEIRO, M. J. P.; VIDOTTI, R. M; SUSSEL, F. R. Taurine supplementation in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **World Aquaculture**, p. 6-10, 2011.

HAN, Y.; KOSHIO, S.; JIANG, Z.; REN, T.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; GAO, J. Interactive effects of dietary taurine and glutamine on growth performance, blood parameters and oxidative status of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 434, p. 348-354, 2014.

HAVIXBECK, J. J., BARREDA, D. R. Neutrophil Development, Migration, and Function in Teleost Fish. **Biology**, v. 4, p. 715-734, 2015. doi:10.3390/biology4040715

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G. R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **British Journal of Haematology**, v. 25, n. 5, p. 563-575, 1973.

ISLAM, M. J.; KUNZMANN, A.; SLATER, M. J. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: a review. **Journal World Aquaculture Soc.** v. 53, n. 2, p. 314–366, 2021. <https://doi.org/10.1111/jwas.12853>

ISLAM, M. J., SLATER, M. J., B'OGNER, M., ZEYTIN, S., KUNZMANN, A. Extreme ambient temperature effects in European seabass, *Dicentrarchus labrax*: Growth performance and hemato-biochemical parameters. **Aquaculture**, v. 522, p. 735093, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735093>

JIA S, LI X, HE W, WU G. Protein-Sourced Feedstuffs for Aquatic Animals in Nutrition Research and Aquaculture. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 1354: pp. 237-261, 2022. doi: 10.1007/978-3-030-85686-1_12. PMID: 34807445.

KALMAR, B., GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 4, p. 310–318, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.003>

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**. v. 173, p. 111-133, 2012.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. p. 311334, 1990.

KORTET, R.; VAINIKKA, A. Seasonality of Innate Immunity; Evolutionary Aspects and Latest Updates. In: DURAND, M.; MOREL, C. V (Ed.). **New Research on Innate Immunity**. p. 13–45. 2008.

KEEN J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Mechanism of the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biology Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1976.

LI, M.; LAI, H.; LI, Q.; GONG, S.; WANG, R. Effects of dietary taurine on growth, immunity and hyperammonemia in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* fed all-plant protein diets. **Aquaculture**, v. 450, p. 349-355, 2016.

LI X, ZHENG S, WU G. Nutrition and Functions of Amino Acids in Fish. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, pp. 133-168, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-54462-1_8. PMID: 33770406.

LIU, H.; LI, H.W.; XU, Y.J.; SHI, X.G.; ZHU, Z.C. Effects of taurine on growth and nutritional value of carps. **Food Sci. Technology**, v. 8, p. 97, 2006.

LIU, B.; WANG, M. Y.; XIE, J.; XU, P.; GE, X. P.; HE, Y. J.; MIU, L. H.; PAN, L. S. Effects of acute low stress on serum biochemical and immune parameters and liver Hsp70 gene expression in gift strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Ecologica Sinica**. v. 31, p. 4866–4873, 2011.

LIU, C.; ZHANG, W.; JIANG, P.; YV, L.; LU, W. The anti-stress effect of taurine in fish: Assessments based on repeat acute stress and animal individuality. **Aquaculture**, v. 561, p. 738685, 2022.

LIMA, S.G.C., MELO, G.P.H., SANTOS, D.G., NETO, S.G., DUARTE, A.M.C. Modelagem na nutrição de não ruminantes: aspectos gerais, dinâmica de nutrientes, limitações e sistemas de serviços. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 114-132, 2020.

LUSHCHAK, V. I., BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 30–35, 2006. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2005.11.017>

MAGALHÃES, R.; MARTINS, N.; MARTINS, S.; LOPES, T.; DIÁZ-ROSALES, P.; POUSÃO-FERREIRA, P.; PERES, H. Is dietary taurine required for white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles? **Aquaculture**, v. 502, p. 296-302, 2019.

MAGOUZ, F. I.; DAWOOD, M. A.; SALEM, M. F.; EL-GHANDOUR, M.; VAN DOAN, H.; MOHAMED, A. A. The role of a digestive enhancer in improving the growth performance, digestive enzymes activity, and health condition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 526, n. March, p. 735388, 2020.

MEZZOMO, N. J.; FONTANA, B. D.; MÜLLER, T. E.; DUARTE, T.; QUADROS, V. A.; CANZIAN, J.; BARCELLOS, L. J. Taurine modulates the stress response in zebrafish. **Hormones and Behavior**, v. 109, p. 44-52, 2019.

MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v.244, p. 6049-6055, 1969.

MILSTEIN, A.; ZORAN, M.; PERETZ, Y.; JOSEPH, D. Low temperature tolerance of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Environ Biol Fishes**. v. 58, n. 4, p. 455–460, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1007672401544>

VAN MUISWINKEL, W. B.; VERVOORN-VAN DER WAL, B. The Immune System of Fish. In: WOO, P. T. K. (Ed.). *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. 2nd. ed. Wallingford: CABI, 2006. p. 678–701.

NUNES, L.T., SALMITO-VANDERLEY, C.S.B., REIS, F.Y.T., NERES, R.W.P., DA SILVA, S.Q. Reprodução de peixes reofílicos nativos do Brasil: fertilização artificial e qualidade da água. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 42, n. 1, p. 15-21, 2018.

PAULA, J. E. D., MORAIS FILHO, M. B. D., BERNARDINO, G., MELO, J. S. C. D., FERRARI, V. A. Estudo da vegetação relacionada com a alimentação do "pacu" (*Colossoma mitrei*-Berg (1895) no Pantanal mato-grossense. **Acta Botanica Brasilica**, v. 2, p. 73-96, 1988.

PASCHKE, K., AGÜERO, J., GEBAUER, P., DIAZ, F., MASCARÓ, M., LÓPEZ-RIPOLL, E., RE, D., CAAMAL-MONSREAL, C., TREMBLAY, N., PÖRTNER, H. O., ROSAS, C. Comparison of aerobic scope for metabolic activity 14 in aquatic ectotherms with temperature related metabolic stimulation: a novel approach for aerobic power budget. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1438, 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.01438

PINTO, W.; FIGUEIRA, L.; SANTOS, A.; BARR, Y.; HELLAND, S.; DINIS, M. T.; ARAGÃO, C. Is dietary taurine supplementation beneficial for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae? **Aquaculture**, v. 384, p. 1-5, 2013.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: **Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 739-761, 2002. doi:10.1016/S1095-6433(02)00045-4

PRESS, C. M. Immunology of Fishes. In: PASTORET, P. P. et al. (Ed.). **Handbook of Vertebrate Immunology**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 3–62.

ROMBENSO, A.; ARAUJO, B.; LI, E. Recent Advances in Fish Nutrition: Insights on the Nutritional Implications of Modern Formulations. **Animals**. v. 12, p. 1705, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12131705>

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Effects of temperature. In: *Animal physiology: adaptation and environment*. 5th Ed. **Cambridge University Press**. p. 217-239, 2002.

THOMPSON, M.; LOCHMANN, R.; PHILLIPS, H.; SINK, T. D. A dietary dairy/yeast prebiotic and flaxseed oil enhance growth, hematological and immunological parameters in channel catfish at a suboptimal temperature (15 C). **Animal**, v. 9, n. 7, p. 1113-1119, 2015.

TRENZADO, C.E.; MORALES, A.E.; PALMA, J.M.; HIGUER, M. Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. **Comp. Biochem. Physiology**, v. 149, p. 440–447, 2009.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora da UFMS, v. 2, p. 205-244, 2005.

URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; BILLER, J. D. Stress and immune system in fish, In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Baldisserotto, B., Urbinati, E.C., Cyrino, J.E.P. (Eds). Chap. 5. Elsevier, Academic Press, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00005-1>

VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. Reviews in **Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

VELMURUGAN, B. K.; CHAN, C. R.; WENG, C. F. Innate-immune responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposure to acute cold stress. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n. 9, p. 16125–16135, 2019.

WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*. Springer, 45: 407–411, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1500-6> 15

WU, G. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *Journal of animal science and biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2021.

YUE, Y.R.; LIU, Y.J.; TIAN, L.X.; GAN, L.; YANG, H.J.; LIANG, J.Y.; HE, J.Y. The effect of dietary taurine supplementation on growth performance, feed utilization and taurine contents in tissues of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) fed with low-fishmeal diets. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 1317–1325, 2013.

ZANUZZO F. S., ZAIDEN S. F., SENHORINI J. Á., MARZOCCHI-MACHADO C. M., URBINATI E. C. *Aloe vera* bath improved physical and humoral protection in breeding stock of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after induced spawning. **Fish Shellfish Immunol**, v. 45, p. 132–140, 2015.

ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; MONTROYA, L. N.; FAVERO, G. URBINATI, E. C. *Aloe vera* enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 65, p. 198-205, 2017.

ZHOU, T.; GUI, L.; LIU, M.; LI, W.; HU, P.; DUARTE, D. F. C.; NIU, H.; CHEN, L. Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol**. v. 84, p. 1145–1156, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.023>