

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INFLUÊNCIA DA FARINHA DE MICROALGA
(*Schizochytrium sp.*) NO PERFIL METABÓLICO,
IMUNOLÓGICO E DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
TAMBAQUIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Allana Feitoza da Silva
Eng. de Pesca

Jaboticabal - São Paulo
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**INFLUÊNCIA DA FARINHA DE MICROALGA
(*Schizochytrium sp.*) NO PERFIL METABÓLICO,
IMUNOLÓGICO E DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
TAMBAQUIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Allana Feitoza da Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Yukihiro Gimbo

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

Jaboticabal - São Paulo

2023

S586i Silva, Allana Feitoza da
Influência da farinha de microalga (*Schizochytrium* sp.) no perfil metabólico, imunológico e do sistema antioxidante de tabaquis em diferentes temperaturas. / Allana Feitoza da Silva. -- Jaboticabal, 2023
59 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Coorientadora: Rodrigo Yukihiro Gimbo

1. Resposta ao choque térmico. 2. Ácidos graxos. 3. Imunidade. 4. Estresse oxidativo. 5. Metabolismo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DA FARINHA DE MICROALGA (*Schizochytrium sp.*) NO PERFIL METABÓLICO, IMUNOLÓGICO E DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE TAMBAQUIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

AUTORA: ALLANA FEITOZA DA SILVA

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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

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

Prof. Dr. EDUARDO PAHOR FILHO (Participação Virtual)
. / Universidade Federal de São João del Rei-MG (UFSJ), São João del Rei-MG



Documento assinado digitalmente
EDUARDO PAHOR FILHO
Data: 27/08/2023 16:41:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. THIAGO FERNANDES ALVES SILVA (Participação Virtual)
. / Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba-PI



Documento assinado digitalmente
THIAGO FERNANDES ALVES SILVA
Data: 01/09/2023 11:56:49-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. INÁCIO MATEUS ASSANE (Participação Virtual)
. / Centro de Aquicultura da Unesp, Caunesp, Jaboticabal-SP

Prof. Dr. MARCIO AQUIO HOSHIBA (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia e Extensão / Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá-MT



Documento assinado digitalmente
MARCIO AQUIO HOSHIBA
Data: 01/09/2023 18:27:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 25 de agosto de 2023

À minha mãe, professora de matemática e a todos os
professores que por meio da educação e do conhecimento
transformam vidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter permitido chegar a essa etapa em minha vida, sem sua presença nada seria possível.

Agradeço a minha querida mãe, Maria Olinda, por ser minha referência como pessoa e ter proporcionado caminhos ao aprendizado, a educação, eu não seria a mesma sem sua presença, quanta saudade!

À minha orientadora, Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, por toda orientação, aprendizado, compreensão, confiança, carinho e amparo nestes últimos anos, além de toda calma transmitida sempre, obrigada, me sinto honrada e imensamente grata ao ter trabalhado com a senhora!

À Dra. Ligia Uribe Gonçalves, obrigada pela parceria em nosso experimento, pelos tambaquis, elaboração das dietas e amizade, és uma profissional, amiga e pessoa que tenho total admiração sempre!

À toda equipe de alunos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), em especial ao Francisco Dantas, Driely Monteiro, Thiago Macedo, Ana Beatriz e Claudia Epifânio, por toda disposição e amparo sempre, amo vocês!

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Metabolismo de Peixes (Lab. 158) da Universidade Nilton Lins, Angelo Carlo, Adria Gomes, Mavi Lobo, Shamila Magalhães, Larissa Salgado, Larissa Fonseca, Walleska Freitas, Priscila Miller e Deborah Jacob, e aos demais alunos que passaram pelo laboratório, ou ajudaram na coleta e me fizeram aprender um pouco mais. Agradeço pela amizade, momentos de descontração e de muito trabalho, com vocês tudo foi possível!

Ao meu coorientador por ter aceitado, apoiado essa parceria Dr. Rodrigo Gimbo.

A técnica, Damares Perecim e aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIP) – UNESP, Aurea Veras, Raissa Ribeiro, Adriane Bido, Thaís Lucato, Mariana Maluli, Camila Faria, Julyana Cristyna, Eduardo Pahor, Fábio Gonzalez e Weliton Vilhalba com toda certeza o convívio e aprendizado com vocês foi importante, mesmo que em menor tempo com alguns. Muito obrigada por todo amparo e auxílio, ajuda nas análises, tornaram esse momento possível!

Aos amigos Aline Brilhante, Ivan Tribuzy, Giulia Lopes, Aldessandro Amaral, Katrine Gomes, Yamilly Lopes, Fernanda Cunha, Larissa Lira, Karen Alves, Sunique Poá, Larissa França e Thyssia Bomfim são anos e muito carinho até aqui, vocês continuam me apoiando em momentos decisivos, obrigada pelo incentivo a realização de sonhos!

Aos amigos que fiz em Jaboticabal, Andressa Tellechea (Andressita), Thiago Fernandes (Thi), Marla Frasson (Vizinha), Laíza Silva, Mareliza Menezes e Mariana Roza, e as minhas manas (Thá, Dri, Rah e Aurita), vocês todos me fizeram sentir em casa morando em Jaboticabal e agora tenho amigos em todas as regiões desse Brasil!

Ao Hansley Melo, por seu amparo, carinho e amor. Com toda certeza nunca me senti tão incentivada, motivada, é fundamental.

Aos colegas de trabalho do Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas – IDAM, obrigada por todo incentivo mesmo diante de tantas atribuições a serem realizadas, foi desafiador.

A minha Madrinha Jucineide Feitoza, ao meu irmão Domingos Alves e familiares, incluindo os de coração, por todo incentivo! Aos meus irmãos paternos que apesar do pouco contato sei que torcem e me enviam as melhores energias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade. A todos os professores e

funcionários do CAUNESP. Ao David, Assistente Administrativo da pós-graduação – CAUNESP, por ser sempre tão solícito em seus atendimentos.

Aos Drs. Eduardo Pahor Filho, Thiago Fernandes Alves Silva, Marcio Aquio Hoshiba, Inácio Mateus Assane e a Dra. Silvia Umeda Gallani, pelas contribuições e questionamentos durante o exame geral de qualificação e defesa do doutorado. E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo nº 88882.433866/2019-01.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	1
CAPÍTULO 1	3
1. Aquicultura.....	4
2. Tabaqui.....	5
3. Temperatura como agente estressor.....	6
4. Respostas ao estresse x Sistema Imune x Sistema Antioxidante	8
5. Farinha de microalga como fonte de ácidos graxos	12
6. Referências.....	14
CAPÍTULO 2	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT	24
1. Introdução.....	25
2. Material e Métodos	27
2.1. Animais e Local	27
2.2. Dietas Experimentais.....	27
2.3. Delineamento e condições experimentais	27
2.4. Análises laboratoriais	29
2.4.1. Indicadores metabólicos (Glicose no plasma, Proteína total no fígado, Glicogênio hepático e Número de eritrócitos).....	29
2.4.2. Indicadores imunológicos (Atividade respiratória de leucócitos, Atividade do sistema complemento – via alternativa e Concentração sérica de lisozima)	30
2.4.3. Indicadores do sistema antioxidante no fígado (SOD, CAT, GPx, GST, 'GSH, LPO)	31
2.4.4. Análise estatística	32
3. Resultados.....	33
3.1. Indicadores metabólicos.....	33
3.1.1. Concentração plasmática de glicose.....	33
3.1.2. Concentração de proteína total no fígado	34
3.1.3. Concentração de glicogênio hepático no fígado	35
3.1.4. Número de eritrócitos (RBC)	36
3.2. Indicadores de resposta inata.....	37
3.2.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL)	37
3.2.2. Atividade hemolítica do sistema complemento no soro (AHC ₅₀)	38

3.2.3. Concentração sérica de lisozima	39
3.3. Indicadores do sistema antioxidante no fígado	40
3.3.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	40
3.3.2. Atividade da catalase (CAT).....	41
3.3.3. Atividade da glutaciona peroxidase (GPx)	42
3.3.4. Atividade da glutaciona-S-transferase (GST).....	43
3.3.5. Concentração da glutaciona reduzida (GSH).....	44
3.3.6. Peroxidação lipídica (LPO).....	45
4. Discussão	46
5. Conclusão.....	52
6. Referências.....	53

RESUMO

O tambaqui é a principal espécie nativa produzida na aquicultura Brasileira e da América Latina. Fato que fortalece a necessidade de estudá-lo em diferentes temperaturas, considerando à grande amplitude térmica das regiões de sua produção. Aditivos ricos em ácidos graxos insaturados provenientes da microalga (*Schizochytrium sp.*) para dietas de peixes, podem ser uma alternativa afim de melhorar a capacidade fisiológica desses organismos ao combate de danos durante a exposição de temperaturas mais baixas que as de seu conforto térmico. Neste contexto, esta tese está dividida em dois capítulos: 1- Introdução Geral, revisando os principais aspectos abordados no estudo e capítulo 2 – No qual foi realizado um experimento com objetivo de avaliar a influência dos ácidos graxos insaturados da farinha de microalga no perfil metabólico, imunológico e do sistema antioxidante de tambaquis em temperaturas de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ e $29,65\pm 0,47^{\circ}\text{C}$. Foram testados dois grupos: controle - alimentados com dietas comerciais (6 caixas) (T1 e T2 - C) e o grupo alimentado com farinha de microalga (6 caixas) (T3 e T4 - FM). Após 15 dias de alimentação, 3 caixas de cada grupo foram expostas a temperatura ($19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$) e outros 3 permaneceram em temperatura ambiente ($29,65\pm 0,47^{\circ}\text{C}$). Após 1, 3 e 6 horas expostos a temperatura reduzida ($19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$) e ambiente $29,65\pm 0,47^{\circ}\text{C}$, os peixes foram amostrados para avaliação de indicadores fisiológicos: metabólicos (glicose, proteína e glicogênio hepáticos, eritrócitos), imunológicos (atividade respiratória de leucócitos/ARL, concentração sérica de lisozima e atividade sérica do sistema complemento/AHC₅₀) e do sistema antioxidante (atividade das enzimas superóxido dismutase/SOD, catalase/CAT, glutathione peroxidase/GPx, glutathione-S-transferase/GST, concentração de glutathione reduzida/GSH, lipoperoxidação lipídica/LPO) (n=12, 4 peixes/caixa). A exposição a temperaturas ($19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$) e a dieta com farinha de microalga aumentaram as concentrações de glicose e número de eritrócitos. A farinha de microalga aumentou a disponibilidade do glicogênio. Temperaturas ($19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$) aumentaram a ARL e a farinha de microalga diminuiu a ARL, AHC₅₀ e a concentração sérica de lisozima. A atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, GPx e GST e a concentração de GSH foram aumentadas em função da farinha de microalga. Nossos resultados demonstraram que a farinha de microalga influenciou no perfil metabólico, imunidade inata e sistema antioxidante de tambaquis expostos a temperaturas de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$, reforçando um possível papel protetor dos ácidos graxos insaturados contidos na farinha de microalga.

PALAVRAS-CHAVE:

Resposta ao choque térmico, ácidos graxos, imunidade, estresse oxidativo, metabolismo, *Colossoma macropomum*

ABSTRACT

Tambaqui is the main native species produced in Brazil and Latin American aquaculture. This makes it necessary to study it at different temperatures, given the wide temperature range in the regions where it is produced. Additives rich in unsaturated fatty acids from microalgae (*Schizochytrium* sp.) for fish diets could be an alternative in order to improve the physiological capacity of these organisms to combat damage during exposure to temperatures lower than those of their thermal comfort. In this context, this thesis is divided into two chapters: 1- General Introduction, reviewing the main aspects covered in the study and Chapter 2 - In which an experiment was carried out with the aim of assessing the influence of unsaturated fatty acids from microalgae meal on the metabolic, immune and antioxidant system profile of tambaquis at temperatures of 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^{\circ}\text{C}$ and $29.65\pm 0.47^{\circ}\text{C}$. Two groups were tested: control - fed commercial diets (6 tanks) (T1 and T2 - C) and the group fed microalgae meal (6 tanks) (T3 and T4 - FM). After 15 days of feeding, 3 tanks from each group were exposed to temperature (19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^{\circ}\text{C}$) and the other 3 remained at room temperature ($29.65\pm 0.47^{\circ}\text{C}$). After 1, 3 and 6 hours exposed to reduced temperature (19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^{\circ}\text{C}$) and ambient temperature of $29.65\pm 0.47^{\circ}\text{C}$, the fish were sampled to assess physiological indicators: metabolic (hepatic glucose, protein and glycogen, erythrocytes), immunological (respiratory activity of leukocytes/ARL, serum lysozyme concentration and serum activity of the complement system/AHC50) and antioxidant system (activity of the enzymes superoxide dismutase/SOD, catalase/CAT, glutathione peroxidase/GPx, glutathione-S-transferase/GST, reduced glutathione concentration/GSH, lipid peroxidation/LPO) (n=12, 4 fish/tanks). Exposure to temperatures (19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^{\circ}\text{C}$) and the diet with microalgae flour increased glucose concentrations and erythrocyte numbers. Microalgae meal increased glycogen availability. Temperatures (19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^{\circ}\text{C}$) increased ARL and microalgae meal decreased ARL, AHC50 and serum lysozyme concentration. The activity of the antioxidant system enzymes SOD, CAT, GPx and GST and the concentration of GSH were increased as a function of microalgae flour. Our results showed that microalgae meal influenced the metabolic profile, innate immunity and antioxidant system of tambaqui exposed to temperatures ranging from 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^{\circ}\text{C}$, reinforcing a possible protective role of the unsaturated fatty acids contained in microalgae meal.

KEYWORDS:

Heat-shock response, fatty acids, immunity, oxidative stress, metabolism,
Colossoma macropomum

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Aquicultura

A aquicultura é uma atividade agropecuária que tem como objetivo a produção de organismos aquáticos para a nutrição humana em condições controladas. Atualmente, 811 milhões de pessoas sofrem de fome e 3 bilhões não podem pagar por dietas saudáveis (FAO, 2022). Tal situação intensifica a urgência para transformar os atuais sistemas agroalimentares para serem mais seguros, acessíveis e sustentáveis (Fialho et al., 2021).

A aquicultura destaca-se como potencial atividade sustentável uma vez que permite o desenvolvimento de novas técnicas de produção para o setor, além de proporcionar o maior controle do ambiente aquático (Golovacheva et al., 2022), com benefícios ambientais relevantes, transformando estas características em ganhos de produtividade e qualidade no cultivo/criação de diferentes plantas e animais aquáticos (Siqueira, 2017).

O último recorde histórico referente à aquicultura ocorreu em 2020, resultando em 122,6 milhões de toneladas de pescado, equivalente a 281,5 bilhões de dólares. Neste mesmo ano, o consumo de alimentos aquáticos foi de 20,2 kg per capita, incremento que dobrou a taxa de consumo dos últimos 50 anos. A nível mundial, a Ásia aparece como principal continente produtor (70% do total), seguido das Américas, Europa, África e Oceania. A China, manteve-se como o principal país produtor (35 % do total) (FAO, 2022). O Brasil, neste cenário mundial, ocupa a 21ª posição, com maior expressividade para a piscicultura (FAO, 2022; IBGE, 2022). Segundo o perfil econômico da atividade aquícola brasileira de 2021, a produção de peixes foi de 558,9 mil toneladas, avaliada a 4,7 bilhões de reais (IBGE, 2022).

Entre as espécies mais produzidas em 2021, estão a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), com 94,5 mil toneladas despescadas (IBGE, 2022). Apesar do tambaqui ser a espécie nativa mais produzida no Brasil e ter grande potencial interno de desenvolvimento e de exportação, países como a China tem se destacado na produção de espécies nativas brasileiras como tambaqui, pirapitinga e peixes ornamentais amazônicos. Em 2022, o país produziu 59,4 mil toneladas de pirapitinga superando a produção brasileira desta espécie (BBC, 2023).

Neste cenário, são necessários estudos para desenvolver tecnologias que explorem o potencial produtivo nacional de tambaqui visto que, apesar da espécie apresentar produção em todos os estados brasileiros, a maior produção ainda se encontra centralizada ao Norte do país nos estados Rondônia, Roraima, Amazonas e Tocantins e a um estado Nordeste, sendo o Maranhão (IBGE, 2022).

2. Tambaqui

O *C. macropomum*, conhecido popularmente como tambaqui, pertence a superclasse Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae, sendo o maior Characiforme da Bacia Amazônica (Goulding, 1980). A espécie é natural das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco (Gomes et al., 2020). Seu ambiente natural é caracterizado por águas ricas em nutrientes com temperatura média entre 25 e 34°C, sendo capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio na água (Val e Almeida-Val, 1995; Gomes et al., 2020).

Apresenta hábito alimentar onívoro com comportamento frugívoro (Goulding, 1980; Araújo-Lima e Goulding, 1997; Baldisseroto, 2013). Enquanto larva, é filtrador e sua alimentação natural consiste em zooplâncton, no qual encontra maior oferta de proteína de alta qualidade para os primeiros anos de vida (Araújo-Lima e Gomes, 2005; Gomes et al., 2020). Quando adulto, seu consumo de frutos e sementes acontece principalmente na época da enchente e cheia, quando ocorre o período de floresta inundada (Goulding, 1980), enquanto na vazante e seca, o consumo é direcionado ao zooplâncton (Oliveira et al., 2006). Além disso, apresenta plasticidade trófica, com maior aproveitamento de itens alimentares e ainda plasticidade de enzimas digestivas para melhor aproveitamento de nutrientes (Corrêa et al., 2007). É uma espécie que se adapta a diferentes sistemas de produção e aceita rações industrializadas (Gomes e Silva, 2009; Cortegano et al., 2019). Sua produção em ambientes controlados/viveiros escavados no estado do Amazonas pode chegar a 7200 kg/ha, com crescimento acelerado que resulta na produção de 1,80 kg de peso médio de pescado para venda em um ciclo de produção de oito meses, considerando a fase de engorda (Izel e Melo, 2004).

No entanto, a temperatura é um dos desafios enfrentados para a disseminação da espécie em todo país, uma vez que em temperaturas abaixo

de 20°C seu crescimento e bem-estar são limitados (Zaniboni Filho e Meurer, 1997). Assim, é importante compreender quais fatores limitam a produção dessa espécie nas demais regiões do país.

3. Temperatura como agente estressor

Na aquicultura em sistemas de criação intensivos, os peixes são expostos a uma série de condições desafiadoras (Oba et al., 2013; Islam et al., 2021) como variações nas concentrações de oxigênio, osmolaridade da água, variações no pH e na temperatura (Urbinati et al., 2014).

A temperatura é o principal fator abiótico que controla e limita o desenvolvimento e a fisiologia dos peixes (Islam et al., 2022). Tal variável está intimamente relacionada com a velocidade das reações químicas, influencia a bioquímica celular e, por conseguinte, a fisiologia dos ectotérmicos (Van Den Burg et al. 2005). Assim, os impactos devido a temperaturas extremas em peixes variam conforme a espécie, magnitude do estresse, genética, idade, estágios de desenvolvimento, da aptidão fisiológica e dos históricos anteriores de exposição térmica (Ashaf-Ud-Doulah et al., 2019; Islam et al., 2022).

Os animais apresentam duas respostas primárias à flutuação da temperatura ambiental: pecilotermia e endotermia. Para os peixes pecilotérmicos, a temperatura corporal é determinada pela troca de calor entre a água do ambiente e o sangue nas brânquias (Van Den Burg et al., 2005), no entanto, para os animais endotérmicos a temperatura corporal não é influenciada por fontes externas. Os peixes, de modo geral, são pecilotérmicos e ectotérmicos, e possuem uma faixa de conforto térmico que favorece o desempenho de suas funções biológicas, crescimento e bem-estar animal (Beitinger et al., 2000). Mudanças no ponto de equilíbrio dos peixes alteram a estabilidade de membranas plasmáticas, o que provoca variações no funcionamento de vários órgãos e conseqüentemente uma série de mudanças fisiológicas.

O aumento da temperatura eleva a energia cinética dos átomos e moléculas, facilita as reações químicas, desestabilizando ligações iônicas e modificando o ponto de equilíbrio de reações de interação entre proteínas, como a afinidade existente entre enzima-substrato, hormônio-receptor (Baldisseroto, 2018).

Nos peixes, a resposta típica para a diminuição da temperatura ambiental é a redução de ácidos graxos saturados com conseqüente aumento na proporção de ácidos graxos insaturados. Isso ocorre pelo fato da inclusão de uma dupla ligação na cadeia de carbonos ter impacto tanto no formato da molécula quanto nas propriedades físicas dos fosfolipídios (Garcia et al., 2013).

Em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) exposto a temperatura superior a 8°C, os ácidos graxos poli-insaturados aumentavam, enquanto os ácidos graxos saturados diminuían. A imunidade dos peixes foi afetada a partir de 16°C (Liu et al., 2020). Estudos testando temperaturas mais baixas também relataram alterações fisiológicas que podem interferir no processo de defesa dos peixes (Falcon, 2007; Junior et al., 2010; Panase et al., 2018). Um estudo com robalo (*Dicentrarchus labrax*) exposto a um estresse térmico extremo demonstrou que os mecanismos de defesa desse peixe não são suficientes para sua aclimação (Islam et al., 2020). Baiacus (*Takifugu obscurus*) expostos a temperaturas baixas (21, 17 e 13°C) tiveram seus parâmetros bioquímicos alterados, danos no DNA e ainda ativação de genes relacionados com atividade protetora do sistema antioxidante (Cheng et al., 2017).

Outro estudo, que buscava mitigar questões relacionadas a possível introdução de uma espécie brasileira em um país com temperaturas mais baixas, avaliou a tolerância do pirarucu a temperaturas reduzidas a fim de diversificar a produção aquícola e compreender os fatores limitantes da produção da espécie, o estudo verificou que a espécie não suportaria temperaturas abaixo de 16°C (Lawson et al., 2015).

Neste contexto, entende-se que para o bom desenvolvimento da atividade aquícola, é necessário o conhecimento da biologia das espécies criadas, da fisiologia, do funcionamento dos sistemas orgânicos, suas interações e respostas obtidas nas diferentes alterações ambientais e aos métodos de criação que permitem melhores condições de criação as espécies (Da Silveira et al., 2009). Além disso, a variação térmica age como uma pressão ambiental capaz de promover estresse. Este pode ser superado, através da capacidade adaptativa do organismo ao promover ajustes comportamentais e fisiológicos (Bilyk e Devries, 2011).

4. Respostas ao estresse x Sistema Imune x Sistema Antioxidante

O estresse pode ser definido como um fenômeno/estímulo no qual se desencadeia um conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais, frente a condições inesperadas de ameaça levando a quebra da homeostase (Barton, 2002; Tort, 2011; Urbinati et al., 2014). Seyle (1950) conceituou o estresse como Síndrome Geral de Adaptação (SAG), na qual sequencialmente são apresentadas respostas de acordo com seu nível de organização (Barton et al., 1991). Essas respostas ao estresse atuam em três linhas. Respostas primárias, também conhecida como reação de alarme, a nível neuroendócrino. Segundos após a presença de um estressor, ocorre a ativação dos eixos hipotálamo – sistema nervoso simpático – células cromafins (HSC) e hipotálamo – hipófise – interrenal (HHI) resultando na liberação dos produtos: catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) e o cortisol (glicorticoides), respectivamente (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997, Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati et al., 2014). Após a secreção desses hormônios, ocorrem alterações fisiológicas, metabólicas e osmorregulatórias como resposta secundária, reponsáveis por uma fase de resistência e tentativa de adaptação. Segundo Pickering (1993), essa fase inclui uma série de eventos tais como alteração das taxas de circulação e outros hormônios (da pituitária e tireoide), das taxas de conversão de neurotransmissores cerebrais, aumento da taxa cardiorrespiratória e mobilização de energia (a partir de reservas de carboidratos, lipídios e proteínas). Segundo Wendelaar Bonga (1997), a resposta terciária ao estresse ocorre numa fase de exaustão do organismo. Quando a condição estressante perdura por um período longo, ou seja, a exposição se torna crônica, as respostas secundárias do estresse mudam suas características e as respostas terciárias se instalam implicando diretamente em um redirecionamento de energia para órgãos e funções prioritárias, relacionadas com a sobrevivência como respiração, natação, osmorregulação e reparo tecidual, diminuindo o aporte para atividades anabólicas de investimento a longo prazo comprometendo estoques energéticos, diminuindo crescimento de peixes, prejudicando a resistência às doenças e ocasionando a depressão do sistema imune (Tort, 2011; Urbinati et al., 2014).

O sistema imune dos peixes é dividido em inato (não específico) e adaptativo (específico ou de memória) (Ellis, 1999). Ambos apresentam mecanismos de defesa mediados por células e fatores humorais. O sistema inato é considerado a primeira barreira contra agentes invasores. Entre os componentes desse sistema, estão o tegumento (pele e muco), os componentes celulares capazes de fagocitar e destruir agentes infecciosos (granulócitos, monócitos e células *natural killer* – NK) (Kantari et al., 2008) e os componentes humorais (sistema complemento, sistema de enzimas antimicrobianos e mediadores não específicos: interferon e as interleucinas) (Ellis, 1999). Por outro lado, o sistema adaptativo é ativado somente na presença do antígeno, o qual desencadeia uma cascata de reações responsáveis pelo aumento dos anticorpos circulantes específicos e a promoção de memória imune (Bernstein et al., 1998; Urbinati 2014), composta por linfócitos T e B, neste caso células imunocompetentes, responsáveis pelo reconhecimento e destruição de microrganismos invasores (bactérias, fungos, vírus e parasitos). As células T apresentam a capacidade de reconhecer o antígeno na presença de receptores glicoproteicos. Durante o processo de reconhecimento, as células T secretam citocinas que ativam as células B, responsáveis pela produção dos anticorpos (linfócitos citotóxicos, macrófagos e outras células que irão destruir microrganismos invasores (Abbas e Lichtman, 2005; Urbinati et al., 2014). Os anticorpos, ao conectarem-se aos microrganismos, iniciam a fagocitose e realizam a neutralização e opsonização do agente, ou seja, a ativação do complemento e citotoxicidade mediados por células dependentes de anticorpos (Ellis, 2001; Holland e Lambris, 2002; Urbinati et al., 2014). Este processo, fagocitose, interliga esses dois sistemas (inato e adaptativo), assim uma vez que o processo de neutralização dos agentes patogênicos é iniciado ocorre aumento do consumo de oxigênio devido a redução do oxigênio em ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Durante este processo, há produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, a produção de radicais livres (Biller e Takahashi, 2018). O excesso de radicais livres produzidos em processos metabólicos promove danos oxidativos, que ativam mecanismos de defesa antioxidante (Barbosa et al., 2010). Este sistema desempenha um papel fundamental em várias vias metabólicas. O organismo naturalmente produz várias EROs, as quais se mantêm em equilíbrio ou são neutralizadas devido a ação eficiente do sistema antioxidante (Biller e Takahashi,

2018), neste caso evitando ou atrasando a oxidação de componentes celulares (Halliwell e Gutteridge, 1989). O estresse oxidativo se instala a partir de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas ou desequilíbrio homeostático (Barbosa et al., 2010). Os processos de geração de EROs ocorrem normalmente nas mitocôndrias, quando a célula sintetiza ATP por meio da redução completa de O_2 na crista mitocondrial, formando água (Sies e Murphy, 1991; Storey, 1996). O oxigênio quando não reduzido de forma completa produz as EROs, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), classificados como radicais livres pois possuem elétrons não pareados e ainda peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie intermediária que apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo (Barreiros e David, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2000; Barbosa et al., 2010).

Para lidar com esses potenciais danos oxidativos, as células vivas desenvolveram numerosos mecanismos de defesa, afim de neutralizar os efeitos nocivos dos radicais livres, como atuação do sistema de defesa antioxidante. Esse sistema de defesa é composto por dois grupos, o enzimático e o não enzimático. O sistema antioxidante enzimático, inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST) (Zhang et al., 2004; Barbosa et al., 2010). O sistema antioxidante não enzimático inclui a glutathione reduzida (GSH) e compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Barbosa et al., 2010; Halliwell e Gutteridge, 2015).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das primeiras enzimas a serem requisitadas pelo sistema antioxidante. Além disso, pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, sendo dependente de cobre (Cu) e zinco (Zn) e na mitocôndria, necessitando do manganês (Mn) como cofator (Green et al., 2004; Barbosa et al., 2010). A SOD por meio da reação de dismutação catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a partir do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Halliwell e Gutteridge, 2015). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido, então

pode ser eliminado pela catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) ou ainda liberado para o citoplasma das células (Biller e Takahashi, 2018). As enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), funcionam em conjunto para impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser um radical livre, por meio das reações de *Fenton* e *HaberWeiss*, possibilita a produção do radical hidroxila ($OH\cdot$), contra o qual não há defesa enzimática (Barbosa et al., 2010).

A catalase (CAT) enzima encontrada principalmente em peroxissomas e nas mitocôndrias, possui função essencial para manter o equilíbrio entre a formação e a eliminação de EROs, catalisando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2015; Biller e Takahashi, 2018). A enzima glutathiona peroxidase (GPx), também catalisa o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O), no entanto, utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como cofator, a qual é transformada em glutathiona oxidada (GSSG), sendo esta que promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura (Halliwell e Gutteridge, 2007; Barbosa et al., 2010). Desempenhando papel importante na prevenção da peroxidação lipídica (Biller e Takahashi, 2018).

A glutathiona-S-transferase (GST) hepática, é uma enzima conhecida por seu importante papel na defesa do organismo contra danos oxidativos. Atua nas células no processo desintoxicação e de biotransformação, constituindo a segunda linha de defesa contra a toxicidade causada pelos oxidantes (Santana et al., 2021). A mesma realiza a conjugação de uma molécula de glutathiona reduzida (GSH) com compostos contendo um centro eletrofílico, formando derivados menos tóxicos e mais solúveis (Hayes et al., 2005).

A glutathiona reduzida (GSH), tem papel fundamental na defesa contra o estresse oxidativo, uma vez que à sua alta concentração intracelular, lhe torna o principal tampão que atua na oxirredução celular. Esse processo ocorre através da redução da glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) novamente, pela atuação da glutathiona redutase (GR) que catalisa a transferência de dois elétrons de uma molécula de NADPH para glutathiona oxidada (GSSG), formando um ciclo redox (Lu et al., 2009).

Quando a atuação das enzimas antioxidantes não ocorre de maneira coordenada para garantir a neutralização dos radicais livres, há o excesso de EROs. Estas então, reagem com as biomoléculas levando a uma desregulação celular relacionando-se com uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento (Lima e Abdalla, 2001). Essa relação se dá pela propriedade das EROs sobre as duplas ligações entre carbonos dos lipídeos das membranas celulares, tornando os ácidos graxos poli-insaturados de membrana um dos seus principais alvos e iniciando assim a peroxidação lipídica (LPO).

A peroxidação lipídica (LPO), pode ser avaliada e utilizada como indicador do estresse oxidativo, uma vez que é responsável por danos nas proteínas, carboidratos, lipídeos, alterações nas membranas que levam a perda da permeabilidade, alterando o fluxo iônico de entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas, alterações do DNA, além causar danos as células que podem levar a apoptose induzida (Lima e Abdalla, 2001; Biller e Takahashi, 2018).

5. Farinha de microalga como fonte de ácidos graxos

Os ácidos carboxílicos contêm um grupo hidrofílico unido a uma cadeia hidrocarbonada (CH) e possuem normalmente entre 4 a 36 carbonos de comprimento (Lehninger et al., 1993). Diferente do que se pensava anos atrás que os ácidos graxos seriam apenas substratos energéticos e componentes estruturais de membranas, os lipídeos são componentes importantes nas dietas de peixes, uma vez que possuem funções que regulam o metabolismo e a funcionalidade das células. Possuem papel fundamental na fisiologia dos peixes. Entre as funções dessas moléculas, em relação ao crescimento de peixes, pode-se mencionar algumas como: energéticas, no metabolismo de lipídeos, de carboidratos e produção de enzimas digestivas; estruturais, hormonais, no sistema imune, na modulação e produção de bioquímicos e em outras reações fisiológicas (Araújo et al., 2013).

As proteínas e os lipídeos são considerados os principais constituintes orgânicos dos tecidos corporais. As proteínas possuem o seu metabolismo

controlado pela genética, enquanto o metabolismo dos lipídeos é influenciado pela dieta (Garcia et al., 2013).

Diversos estudos testam ingredientes e aditivos como fontes de ácidos graxos, buscando alternativas sustentáveis que favorecem a saúde do consumidor (Mourente et al., 2005; Li et al., 2009; Lin e Luo, 2011; Cortegano et al., 2019). No entanto, estudos que avaliam a função dos ácidos graxos em relação a aspectos imunológicos e de resistência ao estresse nos peixes são escassos e necessários. Em um estudo desta natureza, Montero et al. (2003), verificou que douradas (*Sparus aurata*) alimentadas com dietas contendo óleos vegetais apresentaram diferentes padrões de resposta ao estresse, aumento no número de eritrócitos e que a mistura desses óleos vegetais proporcionou melhores resultados em termos de saúde e resistência aos peixes.

A farinha de microalga derivada da *Schizochytrium* sp. é uma importante fonte de ácidos graxos (Q. Wang et al. 2021). Essa microalga pertence ao Reino Chromista, Sub-reino Harosa, Filo Stramenopiles, Classe Labyrinthulomycetes, Ordem Thraustochytriales, Família Thraustochytriaceae (C. Morabito, et al. 2019).

Dispõem alta capacidade de sintetizar DHA, por meio de um complexo enzimático utilizando como substrato o malonil-CoA e acetil-CoA (Metz et al., 2001). Além disso, possuem rápida, contínua e sustentável produção uma vez que são organismos heterotróficos e possuem hábito alimentar detritívoro, bacterívoro (Lewis et al., 1999). Assim, conhecer os efeitos fisiológicos, oferecidos pela inclusão de ácidos graxos nas dietas de peixes em situações de exposição a temperaturas reduzidas é determinante para obtenção de sucesso em possíveis novos manejos.

Assim, o presente trabalho investigou o uso da inclusão de farinha de microalga do gênero *Schizochytrium*, por seu conteúdo de ácidos graxos insaturados, na dieta de tambaquis expostos à redução da temperatura da água do ambiente de criação. Verificando se esse suplemento poderia apresentar efeito protetor e alterar as respostas metabólicas, imune inatas e do sistema antioxidante nos peixes quando desafiados a condições diferentes do conforto térmico para a espécie.

6. Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5ª edição. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005.

ARAÚJO, J. D. C. *et al.* Influência dos ácidos graxos na expressão gênica de peixes. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 14, n. 3, p. 1-29, 2013.

ARAÚJO-DAIRIKI, T. B.; CHAVES, F. C. M.; DAIRIKI, J. K. Seeds of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*, *Euphorbiaceae*) as a feed ingredient for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characidae). **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 32-37, 2018.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Criação de tambaqui. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: **UFSM**, p. 175-202, 2005.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. So fruitful a fish: Ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui. **Columbia University Press**, 1997.

ARENDS, R. J. *et al.* Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L). **Journal of Endocrinology**, v. 159, p.85-91, 1998.

ASHAF-UD-DOULAH, M. *et al.* Thermal stress causes nuclear and cellular abnormalities of peripheral erythrocytes in Indian major carp, rohu *Labeo rohita*. **Journal of Thermal Biology**, v. 86, 1 dez. 2019.

BALDISSEROTTO, B. Espécies nativas para piscicultura no Brasil: 3ª ed. revista, atualizada e ampliada. **Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência - Editora UFSM**, 2020.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

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

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.

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.

BEITINGER, T. L.; BENNETT, W. A.; MCCAULEY, R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental biology of fishes**, v. 58, n. 3, p. 237-275, 2000.

BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. (Ed.). **The physiology of fishes**. Boca Raton: CRC Press, 2ª ed., p.215-242, 1998.

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, 1 out. 2018.

BILYK, K. T.; DEVRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 158, n. 4, p. 382–390, 2011.

CHENG, C. H. *et al.* Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 137–145, 1 maio 2017.

BIERNATH, André. Como a China superou Brasil e virou grande produtora de peixes amazônicos. **BBC NEWS BRASIL**, Londres, 22 jan. 2023. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-64178820>. Acesso em: 19, fev. 2023.

CORRÊA, C. F. *et al.* Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 147, n. 4, p. 857–862, 2007.

CORTEGANO, C. A. A. *et al.* Finishing plant diet supplemented with microalgae meal increases the docosahexaenoic acid content in *Colossoma macropomum* flesh. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 4, p. 1291–1299, 1 abr. 2019.

DA SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. Fatores estressantes de peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p. 1001-1017, 2009.

DIETZ, T.J; SOMERO, G. N. The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (*Genus Gillichthys*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 3389-3393, 1992.

ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 291-308, 1999.

ELLIS, A.E. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p.827-839, 2001.

FALCON, D. R. b-glucano e vitamina C no desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos da tilápia-do nilo: nível de suplementação e tempo de administração. **Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). Towards Blue Transformation. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, SOFIA. 2022.

FIALHO, N. S. *et al.* Environmental sustainability of Nile tilapia net-cage culture in a neotropical region. **Ecological Indicators**, v. 129, 1 out. 2021.

GARCIA, A. S. *et al.* Lípidios. *In*: Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira. FRACALLOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. **Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, 2013, p.79-100.

GOLOVACHEVA, N. A. *et al.* The experience of using a mineral chelate additive for growing juveniles of the African sharptooth catfish (*Clarias Gariepinus*) in a recirculating aquaculture system. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024.

GOMES, L. C.; SILVA, C. R. Impact of pond management on tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier), production during growth-out phase. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 7, p. 825-832, 2009.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L.N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) *In*: BALDISSEROTTO, B. (3ªed.) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 3ª ed. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência – Editora UFMS, 2020, p.147-152.

GOULDING, Michael. The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history. **University of California Press**, 1980 Halliwell e Gutteridge, 1989.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl_1, p. S110-S118, 2004.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3^a ed. UK: **Oxford University Press**, 936 p., 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M. Free Radicals in Biology and medicine. 3^a ed. **Oxford University Press**, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M. Free radicals in biology and medicine. 50 ed. **Oxford university press**, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 4, 2007.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HOLLAND, M. C. H.; LAMBRIS, J. D. The complement system in teleosts. **Fish & shellfish immunology**, v. 12, n. 5, p. 399-420, 2002.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2022). Produção da pecuária municipal. **Brasil**.

ISLAM, M. J. *et al.* Effects of extreme ambient temperature in European seabass, *Dicentrarchus labrax* acclimated at different salinities: Growth performance, metabolic and molecular stress responses. **Science of the Total Environment**, v. 735, p. 139371, 2020.

ISLAM, M. J. *et al.* Influence of extreme ambient cold stress on growth, hematological, antioxidants, and immune responses in European seabass, *Dicentrarchus labrax* acclimatized at different salinities. **Ecological Indicators**, v. 122, p. 107280, 2021.

ISLAM, M. J.; KUNZMANN, A.; SLATER, M. J. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 53, n. 2, p. 314-366, 2022.

IZEL, A.C.U.; MELO, L.A.S. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas. **Boletim Técnico Embrapa Amazônia Ocidental**, Manaus, AM, Brasil. 24p.2004.

JUNIOR A.C.F. *et al.* Resposta hemática de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1619-1625, 2010.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Trends in Innate Immunity**, v. 15, p. 118-146, 2008.

KONDO, H. *et al.* Characterization of goldfish heat shock protein-30 induced upon severe heat shock in cultured cells. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 4, p. 350, 2004.

LAWSON, L. L. *et al.* Lower lethal temperature for *Arapaima Arapaima gigas*: potential implications for culture and establishment in Florida. **North American Journal of Aquaculture**, v. 77, n. 4, p. 497–502, 1 jan. 2015.

LE MORVAN-ROCHER, C.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 19, n. 1, p. 87-95, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; HARRIS, D. A. Principles of Biochemistry (2ed.). **Trends in Biochemical Sciences-Library Compendium**, v. 18, p. 354-354, 1993.

LEIPE, D.O. *et al.* The *stramenopiles* from a molecular perspective: 16Slike rRNA sequences from *Labyrinthuloides minuta* and *Cafeteria roenbergensis*. **Phycologia**, v.33, n.5, p.369-377, 1994.

LEWIS, T. E.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. The biotechnological potential of thraustochytrids. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 580-587, 1999.

LI, M. H. *et al.* Effects of dried algae *Schizochytrium* sp., a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of

channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 292, n. 3-4, p. 232-236, 2009.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIN, S.; LUO, L. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n. 1–2, p. 80–87, 27 ago. 2011.

LIU, C. *et al.* Effects of decreasing temperature on phospholipid fatty acid composition of different tissues and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 515, p. 1-8, 15 jan. 2020.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v 30, p. 42-59, 2009.

METZ, J. G. *et al.* Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 290-293, 2001.

MONTERO, D. *et al.* Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. **Aquaculture**, v. 225, n. 1-4, p. 353-370, 2003.

MOURENTE, G. *et al.* Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-14C] 18: 3n– 3 (LNA) and [1-14C] 20: 5n– 3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 173-186, 2005.

OLIVEIRA, S.R.K.S.; BEZERRA, M.V.P.; BELO, M.A.A. Estudo da endofauna parasitária do tambaqui (*Colossoma macropomum*) em pisciculturas do Vale do Jamari-RO. Enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer**, v.11, p.1026-1041, 2015.

PANASE, P.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K. Biochemical and physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. **Aquaculture Reports**, v. 11, p. 17-23, 2018.

PEREZ, J.C. *et al.* The stress and metabolic responses of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 4, p. 899-916, 2008.

PICKERING, A.D. Growth and stress in fish production. In: Genetics in aquaculture. **Elsevier**, 1993. p. 51-63.

PICKERING, A.D. Introduction: the concept of biological stress. In: PICKERING, A.D. (Ed.) Stress and fish. London: **Academic Press**, 1981. p.1-9.

PRADO-LIMA, M.; VAL, A. L. Transcriptomic characterization of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) exposed to three climate change scenarios. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p.1-21, 2016.

SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SANTANA, T.; SANTOS, M.; WINKALER, E. U. Atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante de tilápias (*Oreochromis niloticus*) como modelo de exposição à nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. 1-10, 2021.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v. 4667, p. 1383-1392, 1950.

SIES, H.; MURPHY, M. E. Role of Tocopherols in the Protection of Biological Against Oxidative Damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 8, p. 211-224, 1991.

SIQUEIRA, T.V.D. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim Regional, Urbano e Ambiental**.p.5360,2017.Disponível:<https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/8142>.Acesso em: 19, fev. 2023.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p.1715-1733, 1996.

SUN, J. L. *et al.* Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis. **Fish & shellfish immunology**, v. 98, p. 923-936, 2020.

TIMME-LARAGY, A. R. *et al.* Antioxidant responses and NRF2 in synergistic developmental toxicity of PAHs in zebrafish. **Toxicological sciences**, v. 109, n. 2, p. 217-227, 2009.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366–1375, dez. 2011.

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**, 2014, p.87-105.

VAL, A. L. Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 1119-1127, 1995.

VAN DEN BURG, E. H. *et al.* Brain responses to ambient temperature fluctuations in fish: Reduction of blood volume and initiation of a whole-body stress response. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 5, p. 2849–2855, 2005.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormone Response to Stress. In: FARREL, A.P.; CECH, J.J.; RICHARDS, J.G.; STEVENS, E.D. (Ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment*. **Elsevier Academic Press Inc**, UK, p.1515-1523, 2011.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p. 59-625, 1997.

YANG, S. *et al.* Acute hypoxic stress: effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1alpha and GLUT-1 genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Fish & shellfish immunology**, v. 67, p. 449-458, 2017.

ZANIBONE FILHO, E.; MEURER, S. Limitações e potencialidades do cultivo de tambaqui (*Colossoma macropomum* cuvier, 1818) na região subtropical brasileira. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p. 169-172, 1997.

ZHANG, J. *et al.* Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 167-174, 2004.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS DA FARINHA DE MICROALGAS NO PERFIL METABÓLICO, IMUNOLÓGICO E DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE TAMBAQUIS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

RESUMO

A temperatura pode ser considerada um estressor físico, principalmente para espécies com baixa tolerância a mudanças bruscas na água. Desta forma, espécies nativas como tambaqui, quando expostos a temperaturas reduzidas, apresentam impactos negativos em vários sistemas biológicos, seguido de crescimento reduzido e até mortalidade. Neste contexto, nosso estudo avaliou os efeitos dos ácidos graxos provenientes da farinha de microalga do gênero *Schizochytrium*, sobre a modulação de respostas metabólicas, função imunitária e sistema antioxidante em tambaquis expostos a temperaturas de $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$ e $29,65 \pm 0,47^\circ\text{C}$. Foram testados dois grupos: controle - alimentados com dietas comerciais (6 caixas) (T1 e T2 - C) e o grupo alimentado com fonte de ácidos graxos (6 caixas) (T3 e T4 - FM). Após 15 dias de alimentação, 3 caixas de cada grupo foram expostas a temperatura ($19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$) e outros 3 permaneceram em temperatura ambiente ($29,65 \pm 0,47^\circ\text{C}$). Após 1, 3 e 6 horas expostos a temperatura $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$ e $29,65 \pm 0,47^\circ\text{C}$, os peixes foram amostrados para avaliação de indicadores fisiológicos: metabólicos (glicose, proteína e glicogênio hepáticos e eritrócitos), imunológicos (atividade respiratória de leucócitos/ARL, concentração sérica de lisozima e atividade sérica do sistema complemento/AHC₅₀) e do sistema antioxidante (atividade das enzimas superóxido dismutase/SOD, catalase/CAT, glutathione peroxidase/GPx, glutathione-S-transferase/GST, concentração de glutathione reduzida/GSH e peroxidação lipídica /LPO) (n=12, 4 peixes/caixa). A exposição a temperatura de $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$ e as dietas com farinha de microalga aumentaram as concentrações de glicose e número de eritrócitos. A farinha de microalga aumentou a disponibilidade do glicogênio. A temperatura de $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$ aumentou a ARL e a farinha de microalga diminuiu a atividade da ARL, AHC₅₀ e a concentração sérica de Lisozima. A atividade das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, GPx e GST e a concentração de GSH foram aumentadas em função da farinha de microalga. Nossos resultados sugerem que a farinha de microalga influenciou no perfil metabólico, imunidade inata e sistema antioxidante de tambaquis expostos a temperatura de $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$, reforçando um possível papel protetor dos ácidos graxos insaturados contidos no aditivo.

PALAVRAS-CHAVE:

Colossoma macropomum, temperatura, metabolismo, imunidade, respiração celular.

ABSTRACT

Temperature can be considered a physical stressor, especially for species with low tolerance to sudden changes in water. Native species such as tambaqui, when exposed to reduced temperatures, show negative impacts on various biological systems, followed by reduced growth and even mortality. In this context, our study evaluated the effects of fatty acids from *Schizochytrium* microalgae about the modulation of metabolic responses, immune function and the antioxidant system in tambaqui exposed to temperatures of 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^\circ\text{C}$ and $29.65\pm 0.47^\circ\text{C}$. Two groups were tested: control - fed commercial diets (6 tanks) (T1 and T2 - C) and the group fed a fatty acid source (6 tanks) (T3 and T4 - FM). After 15 days of feeding, 3 tanks from each group were exposed to temperature (19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^\circ\text{C}$) and the other 3 remained at room temperature ($29.65\pm 0.47^\circ\text{C}$). After 1, 3 and 6 hours exposed to 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^\circ\text{C}$ and $29.65\pm 0.47^\circ\text{C}$, the fish were sampled to assess physiological indicators: metabolic (hepatic glucose, protein and glycogen, erythrocytes), immunological (respiratory activity of leukocytes/ARL, serum lysozyme concentration and serum activity of the complement system/AHC50) and antioxidant system (activity of the enzymes superoxide dismutase/SOD, catalase/CAT, glutathione peroxidase/GPx, glutathione-S-transferase/GST, reduced glutathione concentration/GSH and lipid peroxidation/LPO) (n=12, 4 fish/tanks). Exposure to temperatures ranging from 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^\circ\text{C}$ and diets containing microalgae meal increased glucose concentrations and the number of erythrocytes. Microalgae meal increased glycogen availability. The temperature from 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^\circ\text{C}$ increased ARL and microalgae meal decreased ARL activity, AHC50 and serum lysozyme concentration. The activity of the antioxidant system enzymes SOD, CAT, GPx and GST and the concentration of GSH were increased as a function of microalgae meal. Our results suggest that microalgae meal influenced the metabolic profile, innate immunity and antioxidant system of tambaquis exposed to temperatures ranging from 19.91 ± 0.30 to $23.74\pm 0.25^\circ\text{C}$, reinforcing a possible protective role of the unsaturated fatty acids contained in the additive.

KEYWORDS:

Colossoma macropomum, temperature, metabolism, immunity, cellular respiration.

1. Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie onívora (Araújo-Lima e Goulding, 1997), ajusta-se fisiologicamente aos diferentes tipos de águas da Amazônia (Aride et al., 2007), apresenta carne de alta qualidade e sabor, e ainda bom potencial de crescimento e rusticidade (Gomes et al., 2020; Araújo-Dairiki et al., 2018). É a espécie nativa mais produzida no Brasil e sua introdução nas pisciculturas do Sul do país iniciou-se a partir da década de 70 (Zaniboni e Meurer, 1997; Ranzani-Paiva et al., 1999). Ainda assim, sua criação nesta região é limitada em função da temperatura, uma vez que possui problemas de aclimação durante o inverno, e, além disso, a taxa de crescimento é reduzida por efeito da limitação da alimentação (Zaniboni e Meurer, 1997; Gomes et al., 2020).

Os peixes são ectotérmicos, logo a temperatura da água influencia diretamente a temperatura corporal dos mesmos (Islam et al., 2022; Beitinger et al., 2000). Assim, quando sujeitos a mudanças bruscas de temperatura, como as que podem ocorrer durante o ano, induzem respostas de estresse que resultam no aumento do cortisol sanguíneo e que podem gerar consequências negativas no sistema imune (Islam et al., 2021; Tromp et al., 2018; Pérez-Casanova et al., 2008; Tanck et al., 2000; Arends et al., 1998; Le Morvan-Rocher et al., 1995). Essas consequências fisiológicas podem afetar o desempenho zootécnico do animal (Gamperl et al., 2020; Phuc, Mather e Hurwood., 2017; Wendelaar Bonga, 1997).

O estresse pode ser definido como o conjunto de respostas adaptativas afim de se manter o equilíbrio fisiológico do peixe (Barton, 2002). Entretanto, em situações prolongadas de estresse, os animais podem chegar a exaustão e a um estado patológico (Wendelaar Bonga, 1997). De acordo com Urbinati et al. (2020), existem diferenças entre as respostas imunes inatas em peixes diante do enfrentamento de condições estressantes agudas e crônicas. Exposições de curto prazo (agudas) aprimoram a resposta do sistema, por mediação das catecolaminas, enquanto a resposta imune pode ser prejudicada em situações de estresse prolongado (crônico), com envolvimento do cortisol (Kim et al., 2019; Panase et al., 2018).

É conhecido que o estresse afeta a homeostasia dos peixes, levando-os a um quadro de imunossupressão e suscetibilidade a infecções bacterianas (Urbinati et al., 2014). Por conseguinte, aumentam os riscos de mortalidade (Ferreira et al., 2019) que interferem diretamente nos custos de produção (Oliveira e Cyrino, 1998). Os danos causados no processo de estresse térmico resultam na reestruturação de membranas biológicas e em várias mudanças metabólicas, as quais podem afetar a suscetibilidade da membrana a peroxidação lipídica, potencialmente prejudicial (Crockett, 2008).

Os ácidos graxos desempenham numerosos papéis, tais como, componentes estruturais das células, fonte de energia e também reguladores de expressão gênica de respostas imunes e inflamatórias (Yaqoob e Calder, 2007). Para os peixes e animais marinhos, principalmente aqueles de regiões frias, os ácidos graxos desempenham funções específicas no metabolismo (Visentainer et al., 2000). Em ectotérmicos, dois dos padrões mais proeminentes de reestruturação lipídica em membranas envolvem conteúdos de ácidos graxos poli-insaturados (Crockett, 2008).

Neste cenário, estudos que ajudem a compreensão dos mecanismos que modulam sistemas fisiológicos em condições de desafio térmico, com foco na melhoria da produção da espécie em todo país são necessários. Por outro lado, uma demanda bastante atual é o estabelecimento de boas práticas na produção animal e, neste sentido, produtos alternativos oriundos da aquicultura, não convencionais como aditivos de microalga do gênero *Schizochytrium* sp., ricas em ácidos graxos (Cortegano et al., 2019) são altamente recomendáveis.

A microalga do gênero *Schizochytrium* sp. tem sido amplamente utilizada em manejos da aquicultura. Este microrganismo tornou-se ideal para produção industrial do ácido graxo poli-insaturado docosahexaenoico (DHA), necessário para saúde humana. Isso se dá devido as suas vantagens, como facilidades para cultivo, taxa de crescimento acelerada, composição simples de ácidos graxos e teor elevado de DHA (Wang et al., 2021). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos ácidos graxos insaturados provenientes de farinha de microalga no perfil metabólico, imunológico e do sistema antioxidante de tambaquis em diferentes temperaturas.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e Local

Um total de 144 juvenis de tambaquis (peso e comprimento iniciais: $68,20 \pm 6,19$ g e $12,75 \pm 0,47$ cm; peso e comprimentos finais: $100,49 \pm 11,20$ g e $14,54 \pm 0,57$ cm) fornecidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) foram distribuídos em 12 caixas de polietileno de 300L (12 peixes/caixa). Todos os procedimentos experimentais no estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2. Dietas Experimentais

Foram utilizadas duas dietas: uma dieta controle (comercial, NUTRIPICS, 28% de proteína bruta) e outra que era a ração comercial suplementada com 5% de farinha de microalga, como fonte de ácidos graxos (All-G Rich™ product/Alltech®) de acordo com Cortegano et al. (2019). Para a elaboração das dietas, a ração comercial foi reprocessada, sendo moída e peneirada em 1mm. As misturas então foram homogeneizadas com 30% de água, extrusadas a frio (25°C) e secas em estufa a 55°C. As dietas prontas foram armazenadas a -20°C, em sacos pretos de polietileno para evitar fotoxidação.

2.3. Delineamento e condições experimentais

Doze caixas foram dispostas em sistema de recirculação e sistema de aeração individualizado. Os tambaquis (12 peixes/caixa) foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 16 horas), com 2,5% da biomassa durante 15 dias.

Após 15 dias de alimentação, seis dessas caixas foram submetidas ao sistema de resfriamento (19 a 23 °C). Sendo, três caixas para o grupo alimentado com dieta controle, denominado T2 e três caixas, para o grupo alimentado com farinha de microalga denominado T4.

As outras seis caixas permaneceram em temperatura ambiente (29 a 30 °C). Sendo, três caixas para o grupo alimentado com dieta controle, denominado T1 e três caixas, para o grupo alimentado com farinha de microalga, denominado T3. Ambos com aeração constante.

Para ativação do sistema de resfriamento, a recirculação foi interrompida e a temperatura foi constantemente monitorada com medidor multiparâmetro modelo AK88.

A temperatura da água foi gradualmente reduzida de $29,65 \pm 0,47$ a $19,91 \pm 0,30$ °C em 1 hora, por meio das placas de resfriamento que foram colocadas nas caixas dos grupos T2 e T4. Após 1 hora de exposição, a temperatura aumentou gradualmente de $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25$ °C, da primeira até a terceira coleta (6 horas) (Tabela 1).

Tabela 1. Monitoramento da temperatura das caixas d'água nos diferentes momentos de coleta.

Coletas	Horário	Grupos	Temperatura °C
		Controle	$29,65 \pm 0,47$
1 hora	08:10	Exposição ao frio	$19,91 \pm 0,30$
		Controle	$29,65 \pm 0,47$
3 horas	12:36	Exposição ao frio	$21,3 \pm 0,20$
		Controle	$29,65 \pm 0,47$
6 horas	15:43	Exposição ao frio	$23,74 \pm 0,25$

Após 1, 3 e 6 horas de exposição à temperatura $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25$ °C, os peixes foram amostrados para análise dos indicadores fisiológicos: metabólicos e dos sistemas imune inato e sistema antioxidante (n=12, 4 peixes/caixa). Os peixes foram capturados e anestesiados em solução de benzocaína (100 mg/L de água) para amostragem sanguínea. O sangue foi retirado por punção caudal e dispensado em microtubos contendo anticoagulante (heparina e EDTA fluoretado) e em microtubos sem anticoagulante para extração de soro. Em seguida, os peixes foram eutanasiados por secção medular, para coleta do fígado que foi armazenado a -80°C até realização das análises.

Durante o período experimental e para manter as condições de qualidade de água ideais ao tambaqui, as variáveis limnológicas foram mensuradas com o medidor multiparâmetro modelo AK88 – Akso (concentração do oxigênio dissolvido na água das caixas - $4,21 \pm 0,58$ mg/L, temperatura $29,80 \pm 0,30$ °C, pH $7,07 \pm 0,96$ e condutividade - $114,53 \pm 12,86$ μ S/cm). O fotoperíodo foi de 12 horas claro e 12 horas escuro.

2.4. Análises laboratoriais

2.4.1. Indicadores metabólicos (Glicose no plasma, Proteína total no fígado, Glicogênio hepático e Número de eritrócitos)

Após centrifugação do sangue com EDTA fluoretado (Glistab – Labtest) e separação do plasma, a concentração da glicose foi analisada por kit comercial (Labtest, São Paulo, Ref.133).

A determinação da proteína total hepática foi realizada pelo método de Bradford (1976), que 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 595 nm, em espectrofotômetro (Biotek Epoch 2 Microplate Reader) e a concentração expressa em mg/mL.

A concentração de glicogênio hepático foi determinada segundo a metodologia proposta por Perry et al. (1988). As amostras de tecido armazenadas a -80°C foram descongeladas, homogeneizadas e desproteinizadas em ácido perclórico gelado, à 6%, e, à solução, foi adicionado carbonato de potássio (3M) para neutralização. Após centrifugação, a 2885 rpm, por 15 min, à 10°C , o sobrenadante foi hidrolisado com amiloglicosidase e incubado em temperatura ambiente, por uma hora. Em seguida, adicionou-se ácido perclórico 6%, seguido de neutralização com carbonato de potássio (2,25 M). Após centrifugação a 2885 rpm por 10 min, a 10°C , a leitura foi determinada pelo reagente de cor do kit de glicose, em espectrofotômetro em 505 nm. As concentrações de glicogênio presentes no fígado foram calculadas a partir da curva padrão de glicogênio e expressas em porcentagem.

A contagem dos eritrócitos (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer e medida em 10⁶ células/ mm³, após diluição do sangue em solução de citrato de formol (1:200).

2.4.2. Indicadores imunológicos (Atividade respiratória de leucócitos, Atividade do sistema complemento – via alternativa e Concentração sérica de lisozima)

Uma alíquota de sangue total com heparina foi utilizada para determinação da atividade respiratória de leucócitos, de acordo com o protocolo de Siwicki (1995), adaptada por (Biller-Takahashi et al., 2013). O método consiste na determinação colorimétrica das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “Burst” oxidativo, baseado na redução do corante NBT (*Nitroblue tetrazolium chloride* - Sigma Aldrich® N6876-100G), que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Genesys 10S) em comprimento de onda de 540 nm.

A atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento (AHC50) foi determinada de acordo com Ferriani et al. (1990) e Polhill et al., (1978), adaptada por Zanuzzo et al. (2015) para soro de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Uma amostra de sangue foi misturada à solução de Alsever para lavar e separar as células vermelhas do sangue de coelho. As amostras de soro foram diluídas em TEA-EGTA-Mg e misturadas à suspensão de células vermelhas. Por meio de ensaio cinético foi determinado o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão dos eritrócitos de coelho, com leituras a cada 30 segundos, durante 20 minutos, em comprimento de onda de 700nm.

A concentração sérica de lisozima foi determinada de acordo com Smolelis e Hartsell (1949), com base na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*, medida pela redução da absorbância da solução à 450nm a cada cinco minutos, durante dez minutos, utilizando um aparelho ELISA.

2.4.3. Indicadores do sistema antioxidante no fígado (SOD, CAT, GPx, GST, GSH, LPO)

As amostras de fígado, após pesagem, foram homogeneizadas em tampão PBS 0,1 M, pH 7,0 e centrifugadas a 4 °C por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para as análises dos biomarcadores do sistema antioxidante. A concentração de proteína total do homogenado foi determinado de acordo com Bradford (1976) (Item 3.4.1) foi utilizada para cálculo da atividade das enzimas. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com McCord et al. (1969), baseado no princípio de que a SOD presente na amostra inibe a redução do citocromo c provida pelo ânion superóxido, a 550 nm, 25°C. A atividade da SOD é expressa em mg proteína⁻¹.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com Beutler (1975). O princípio do método consiste em catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em moléculas menos reativas de O₂ e H₂O pela CAT, observado pelo decaimento da absorbância ao longo do tempo, a 240 nm, a 25° C. A atividade da CAT é expressa em nmol mg proteína⁻¹ min⁻¹.

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi estimada de acordo com Hopkins e Tudhope (1973), baseada na oxidação do NADPH em presença de glutathione reductase (GR) e o substrato glutathione oxidada, produzida pela ação da GPx. A redução da absorbância foi lida a cada 15 segundos por 5 minutos, a 340 nm. A atividade da GPx é expressa em mmol mg proteína⁻¹ min⁻¹.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com Keen et al. (1976), seguindo-se a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB), em 340 nm e é expressa em nmol mg proteína⁻¹. A glutathione reduzida (GSH) foi determinada de acordo com a técnica de Beutler (1963), e o princípio da técnica se baseia na reação da glutathione com o DNTB, formando um tiolato (TNB) de cor amarelada. Quanto maior a presença de GSH, mais

acentuada a cor. A leitura foi realizada em 405 nm e expressa em $\text{mmol mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), realizado de acordo com Camejo et al. (1998). As concentrações de TBARS são expressas em $\text{nmol MDA mg proteína}^{-1}$.

2.4.4. Análise estatística

Os dados foram submetidos a testes de normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade (Brown-Forsythe). Quando necessário, os dados foram transformados para atender as premissas, e então submetidos à análise de variância (ONE e TWO WAY ANOVA). Para comparação das médias foi utilizado o teste Duncan, com significância de 5% pelo software SAS (versão 9.0). Os resultados foram apresentados como média e erro padrão.

3. Resultados

3.1. Indicadores metabólicos

3.1.1. Concentração plasmática de glicose

Uma hora após a exposição a temperatura de $19,91 \pm 0,30^\circ\text{C}$, a concentração plasmática da glicose aumentou para os grupos T2 em relação T1 ($p=0,0150$) e para o T4 em relação ao T3 ($p=0,0418$), os grupos T1 e T3 permaneceram em temperatura ambiente $29,65 \pm 0,47^\circ\text{C}$. Após 3 horas, observou-se aumento em todos os grupos ($p < 0,0001$) e, comparando os tratamentos, o grupo T4 apresentou concentração mais baixa que o grupo T3 ($p=0,0335$). Após 6 horas, os valores da glicose plasmática reduziram, de modo geral, exceto no grupo T4, embora não tenham alcançado os valores iniciais ($p=0,0125$). Comparando os grupos, o T4 apresentou valores mais altos que os grupos T3 ($p=0,0095$) e T2 ($p=0,0133$) (Figura 1).

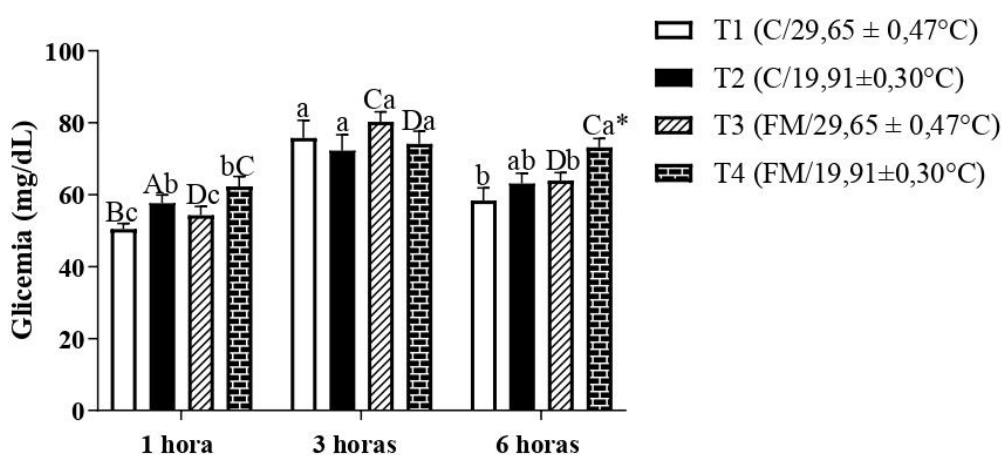


Figura 1. Concentração plasmática de glicose de tabaquís alimentados durante 15 dias com dietas Controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperaturas: letras A e B – (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C); e C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)).

Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias \pm erro padrão. $p < 0,05$.

3.1.2. Concentração de proteína total no fígado

A única diferença observada na concentração de proteína total foi uma redução na amostragem de 1 hora nos peixes que receberam dieta suplementada com farinha de alga (T3), em relação aos peixes que receberam a dieta controle (T1), expostos a temperatura ambiente $29.65 \pm 0.47^\circ\text{C}$. ($p = 0,0242$) (Figura 2).

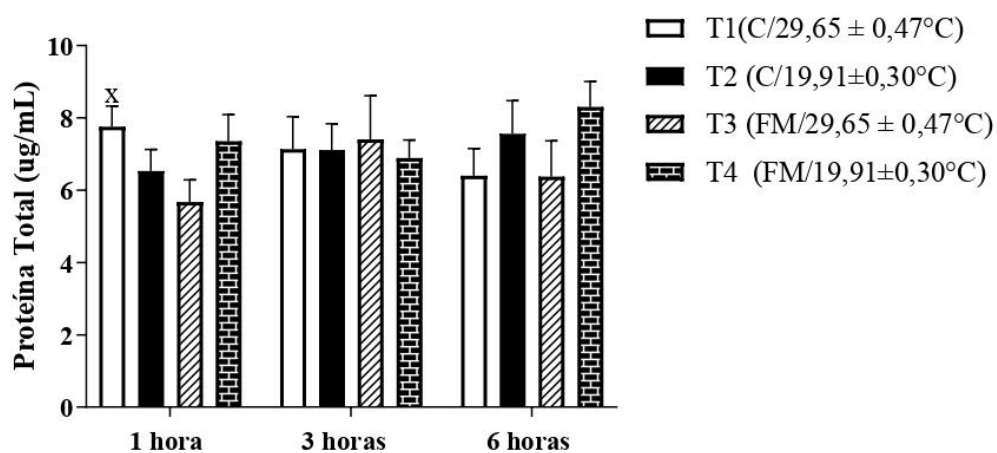


Figura 2. Proteína hepática total de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas Controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letra X indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T1 (C/ $29.65 \pm 0.47^\circ\text{C}$) e T3 (FM/ $29.65 \pm 0.47^\circ\text{C}$)) ($p < 0,05$). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias \pm erro padrão. $p < 0,05$.

3.1.3. Concentração de glicogênio hepático no fígado

As alterações nas quantidades (%) do glicogênio hepático foram pontuais, sem um padrão estabelecido. Observou-se aumento no grupo T2 ($p=0,0141$) em relação ao T1, peixes que receberam dieta controle e foram expostos a temperaturas diferentes e no T3 ($p=0,0078$) em relação ao T1, às 3 h ($p=0,0078$) em relação a inclusão da farinha de microalga na dieta (Figura 3). Às 6 horas, a concentração do glicogênio diminuiu no grupo T4 em relação ao T3 ($p=0,0057$), em relação a temperatura. Ao longo do tempo, observou-se redução gradual nas concentrações do grupo T4 após 3 horas ($p=0,0086$) e 6 horas ($p=0,0125$), exposto a temperaturas de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^\circ\text{C}$.

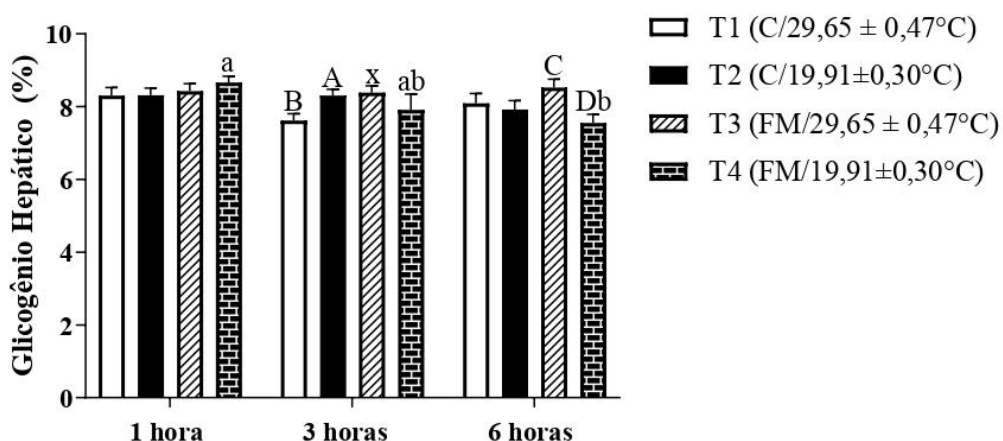


Figura 3. Concentrações de glicogênio de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperaturas: letras A e B – (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C); e C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Letra X indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T3 (FM/29,65±0,47 °C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.1.4. Número de eritrócitos (RBC)

Na amostragem de 1 hora, o RBC aumentou nos grupos T2 ($p=0,0136$) e T3 ($p=0,0255$) em relação ao grupo T1. Às 3 horas, o número do RBC aumentou no grupo T4 ($p=0,0166$) peixes alimentados com farinha de microalga, em relação ao grupo T2, peixes alimentados com dieta controle. Ao longo do tempo, houve redução no RBC nos grupos T2 e T3, com o menor valor, às 3 horas ($p=0,0023$) (Figura 4).

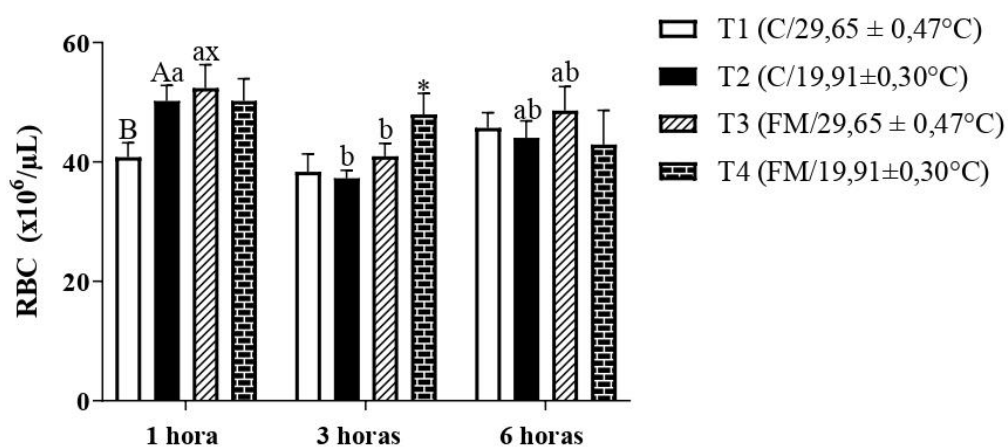


Figura 4. Número de eritrócitos (RBC) de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperaturas: letras A e B – (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letra X indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão de farinha de microalga (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T3 (FM/29,65±0,47 °C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.2. Indicadores de resposta inata

3.2.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

Na amostragem de 1 hora, a ARL aumentou no grupo T2 ($p=0,0093$) e no grupo T3 ($p=0,0288$) em relação ao grupo T1. Após 3 horas, a ARL era maior nos grupos T4 ($p=0,0056$) e T1 ($p=0,0347$), em relação ao grupo T3. Analisando ao longo do tempo, os grupos T1 ($p=0,0072$) e T4 ($p=0,0147$) apresentaram aumento na atividade na amostragem de 3 horas. Às 6 horas, a atividade retornou aos valores iniciais, exceto no grupo T2 cuja atividade reduziu e no grupo T3 em que a atividade apresentou um valor intermediário (Figura 5).

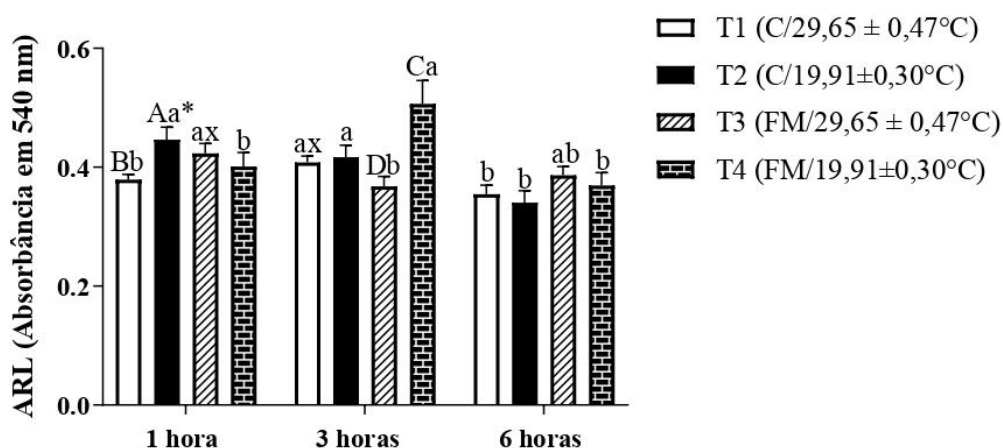


Figura 5. Atividade respiratória de leucócitos de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperaturas: letras A e B – (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C); e C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão de farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letra X indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T3 (FM/29,65±0,47 °C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.2.2. Atividade hemolítica do sistema complemento no soro (AHC₅₀)

Na amostragem de 1 hora, a AHC₅₀ foi maior no grupo T1 quando comparado ao grupo T2 ($p=0,0181$), em relação a temperatura. O grupo T2 também apresentou AHC₅₀ maior quando comparado ao grupo T4 ($p=0,0463$), em relação a inclusão da farinha de microalga. Às 6 horas, o grupo T2 apresentou maior AHC₅₀ em relação ao grupo T4 ($p=0,0080$), em relação da inclusão da farinha de microalga. Analisando ao longo do tempo, o grupo T2 ($p=0,0122$) e o grupo T3 ($p=0,0043$) apresentaram aumento na atividade do sistema complemento às 6 horas (Figura 6).

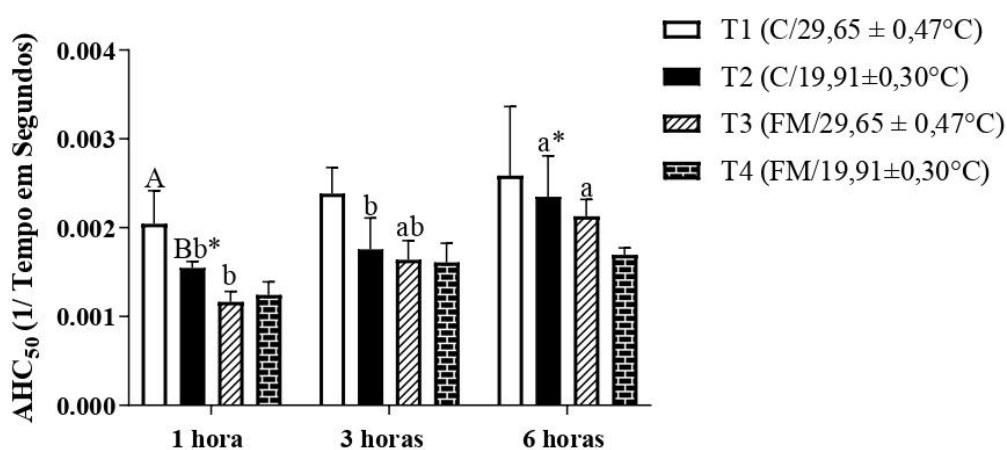


Figura 6. Atividade hemolítica sérica do sistema complemento (AHC₅₀) de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperaturas: letras A e B – (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.2.3. Concentração sérica de lisozima

Às 3 horas, a concentração sérica da lisozima aumentou no grupo T2 em relação ao grupo T4 ($p= 0,0213$), expostos a temperaturas de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ (Figura 7).

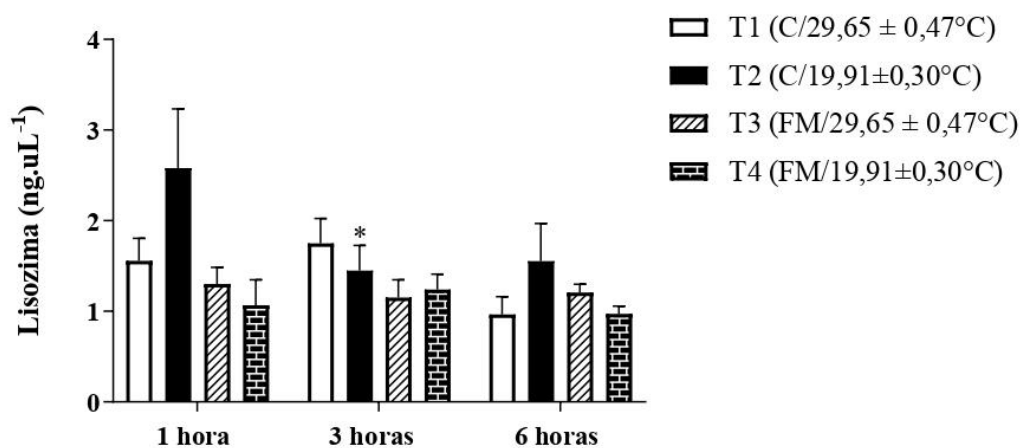


Figura 7. Concentração sérica de lisozima de tamboquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.3. Indicadores do sistema antioxidante no fígado

3.3.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na amostragem de 1 hora, a atividade da SOD aumentou no grupo T3, quando comparado aos grupos T4 ($p=0,0340$) em relação a temperatura e ao T1 ($p=0,0253$) em relação a inclusão da farinha de microalga. Após 3 horas, a atividade da SOD aumentou no grupo T4 quando comparado ao grupo T3 ($p=0,0253$) em relação a temperatura. Ao longo do tempo, o grupo T3 apresentou os menores valores de atividade da SOD às 3 horas ($p=0,0323$) (Figura 8).

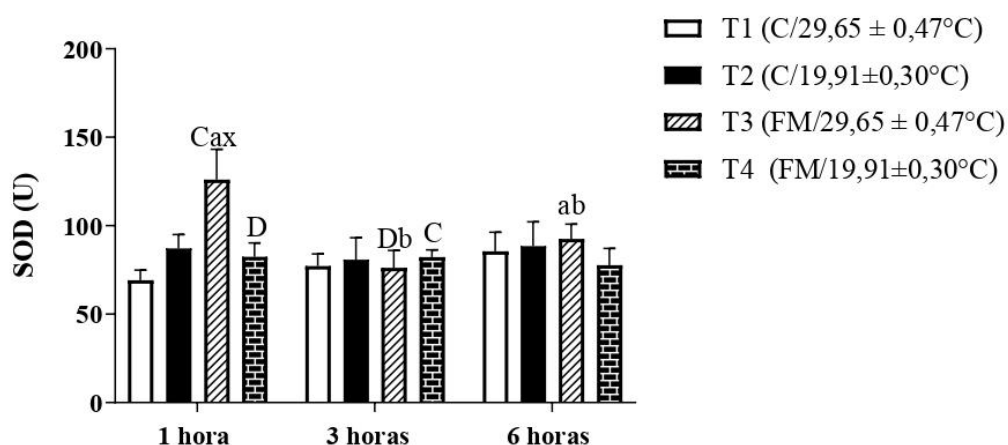


Figura 8. Atividade hepática da superóxido dismutase (SOD) de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperatura: letras C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Letra X indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T3 (FM/29,65±0,47 °C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.3.2. Atividade da catalase (CAT)

Às 3 horas, a atividade da CAT aumentou no grupo T4 quando comparado aos grupos T3 ($p=0,0365$) em relação a temperatura, e ao T2 ($p=0,0337$) em relação a inclusão da farinha de microalga (Figura 9).

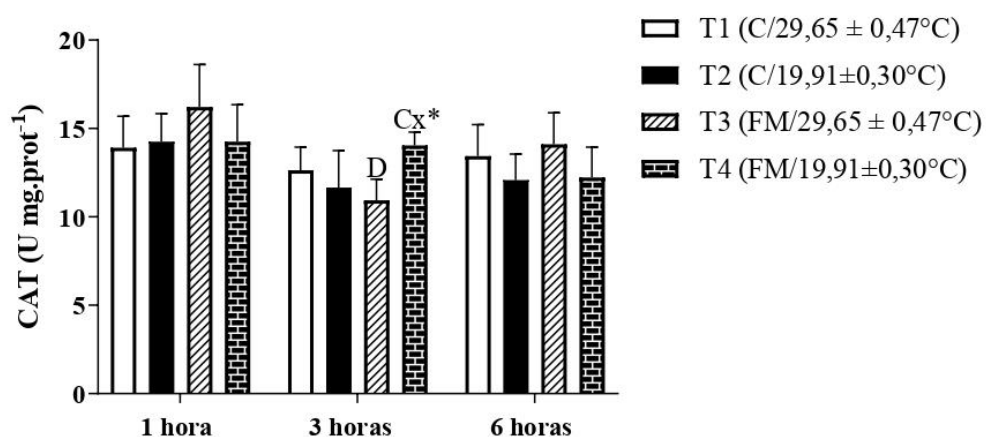


Figura 9. Atividade hepática da catalase (CAT) de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperatura: letras C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C). Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.3.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Às 6 horas, a atividade da GPx diminuiu no grupo T4 quando comparado ao grupo T3 ($p=0,0312$), em relação a temperatura. Analisando ao longo do tempo, o grupo T3 apresentou os menores valores de atividade da GPx às 3 horas e os maiores às 6 horas ($p=0,0985$) (Figura 10).

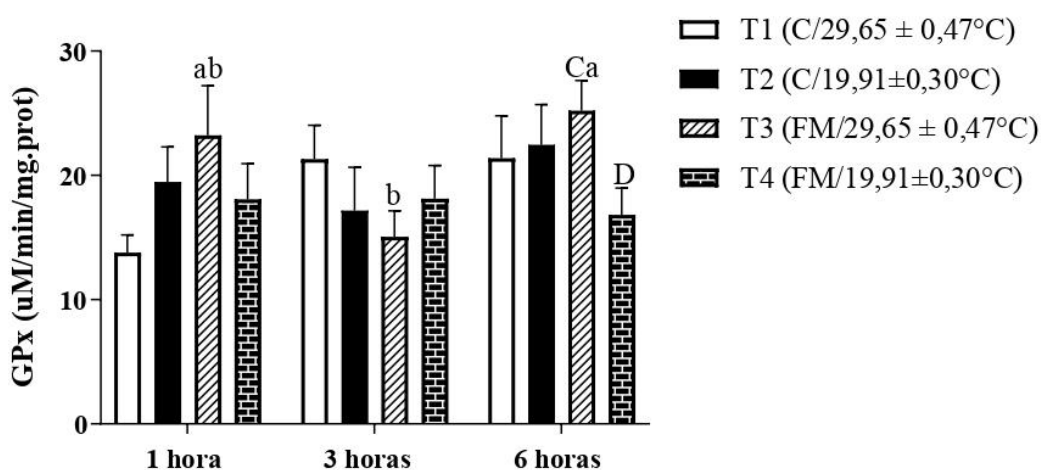


Figura 10. Atividade hepática da glutathiona peroxidase de tambaquis alimentados durante 15 dias com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperatura: letras C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.3.4. Atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

Na amostragem de 1 hora, a atividade da GST aumentou no grupo T3, quando comparado ao grupo T1 ($p=0,0305$) em relação a inclusão de farinha de microalga. Às 3 horas, a atividade foi maior no grupo T4 quando comparado ao grupo T3 ($p=0,0005$), em relação a temperatura. Analisando ao longo do tempo, o grupo T3 apresentou redução na atividade da GST após 3 horas, com recuperação parcial após 6 horas ($p=0,0094$) (Figura 11).

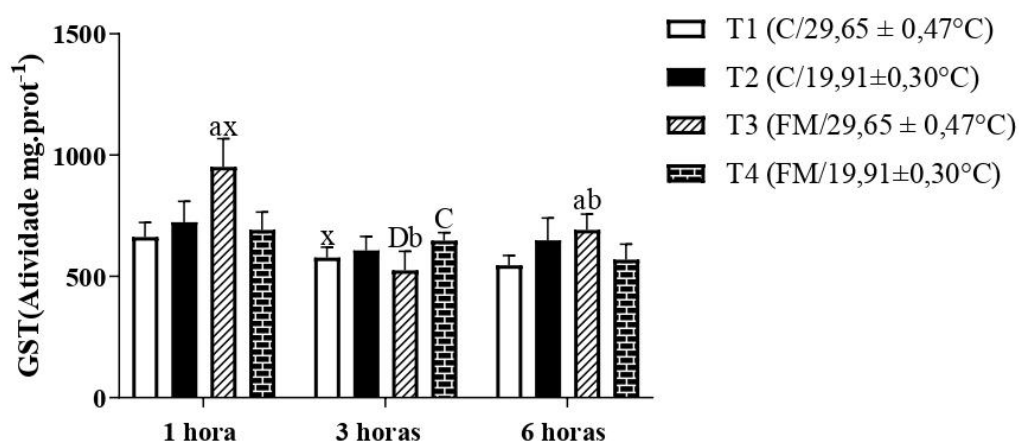


Figura 11. Atividade hepática da glutathiona S-transferase (GST) de tambaquis alimentados com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperatura: letras C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Letra X indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T3 (FM/29,65±0,47 °C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.3.5. Concentração da glutathiona reduzida (GSH)

Na amostragem de 1 hora, a concentração da GSH aumentou no grupo T2 ($p=0,0474$) em relação a temperatura e ao T3 ($p=0,0105$) em relação a inclusão da farinha de microalga, quando comparados ao grupo T1. Ao longo do tempo, o grupo T3 apresentou redução na concentração da GSH após 3 horas, com recuperação parcial após 6 horas ($p=0,0086$). No grupo T4, a concentração de GSH diminuiu após 6 horas ($p=0,0175$) (Figura 12).

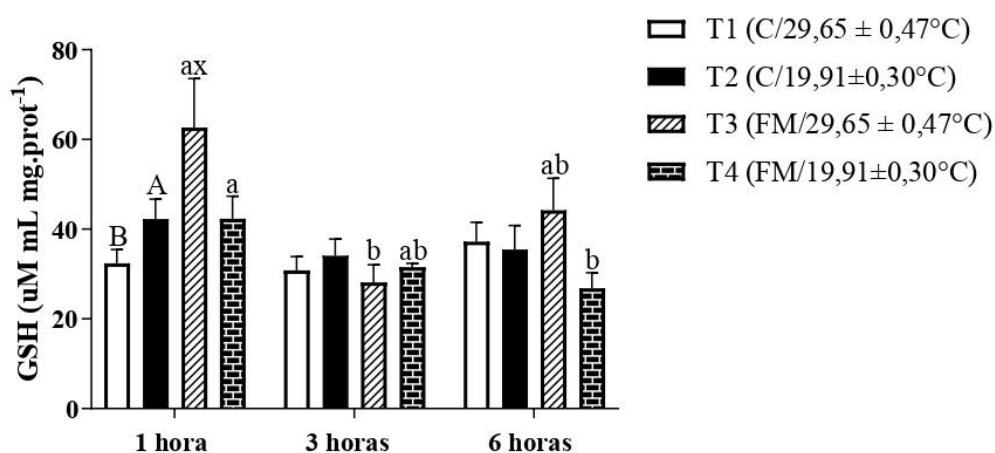


Figura 12. Concentração hepática da glutathiona reduzida (GSH) de tambaquis alimentados com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição ao frio: letras A e B – (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Letra X indica diferença entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T1 (C/29,65±0,47 °C) e T3 (FM/29,65±0,47 °C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p<0,05$.

3.3.6. Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica apresentou valores aumentados, mas as variações foram muito grandes, sem significância estatística, como observado na amostragem de 1 hora, que todos os grupos apresentaram maior concentração de TBARS em relação ao controle T1 sem exposição a temperatura reduzida. No grupo T4, alimentado com farinha de microalga e exposto a $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$, a peroxidação diminuiu ao longo do tempo ($p=0,0076$). Às 6 h, comparando os grupos, o que recebeu a suplementação de farinha e foi exposto a temperatura reduzida, T4 apresentou menor peroxidação lipídica que os grupos T3 ($p=0,0138$) e T2 ($p=0,0024$) (Figura 13).

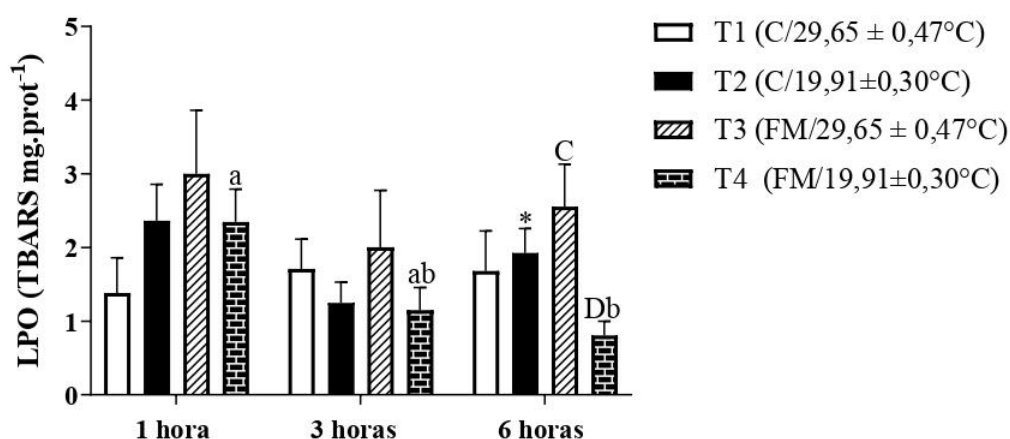


Figura 13. Peroxidação lipídica no fígado de tambaquis alimentados com dietas controle (T1 e T2) e dietas contendo farinha de microalga (T3 e T4) após 1, 3 e 6 horas. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos, no mesmo tempo, entre as diferentes condições de exposição a temperatura: letras C e D – T3 (FM/29,65±0,47 °C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C). Letras minúsculas indicam diferenças de amostragem em um mesmo tratamento entre os tempos. Asterisco indica diferenças entre tratamentos em relação à inclusão da farinha de microalga (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)). Os símbolos foram omitidos quando não houve diferença estatística. Os valores são médias ± erro padrão. $p < 0,05$.

4. Discussão

Os padrões de temperatura global estão mudando acentuadamente e mudanças mais intensas são esperadas, com efeitos diretos nos peixes (Campos et al., 2019; Sarà et al., 2018). Assim, compreender como os ambientes de criação alterados influenciam na fisiologia dos animais é relevante para implementar intervenções e práticas de manejo na piscicultura, uma vez que este conhecimento pode subsidiar estratégias para minimizar os efeitos do estresse causado por alterações térmicas (Cogliati et al., 2019).

Em nosso estudo, observamos que a exposição de tambaquis a temperaturas mais baixas que a temperatura de conforto, aumentou os níveis de glicose plasmática na primeira hora de exposição, nos dois grupos expostos (T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) e T4 (FM/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C)), embora a farinha de microalga não tenha interferido significativamente nessa resposta. Essa alteração sugere uma condição de estresse causada pela temperatura reduzida, quando o organismo ativa a produção e distribuição de energia aos tecidos para atender a nova demanda biológica do organismo frente à exposição a uma condição adversa (Urbinati et al., 2014). Nos peixes, a glicose no sangue desempenha um papel fundamental no metabolismo energético e pode ser usada como um preditor de estresse (Khieokhajokhet et al., 2022). Outros estudos avaliaram o perfil de glicose em condições de temperaturas extremas em peixes. Panase et al. (2018) observaram, em tilápias (*Oreochromis niloticus*), o aumento das concentrações deste metabólito após um choque térmico (25 a 13 °C). Islam et al. (2020) relataram que robalos (*Dicentrarchus labrax*), alimentados com diferentes suplementos, apresentaram aumento da concentração de glicose após exposição a uma temperatura extrema (8 a 32°C). Acompanhando o perfil da glicose, às 3 horas, observamos uma elevação geral, em todos os grupos, incluindo aqueles não expostos a temperaturas reduzidas, o que sugere que o aumento foi causado por um fator comum a todos os grupos, como a movimentação do ambiente durante o experimento. Já, às 6 horas, as concentrações de glicose estão reduzidas, exceto nos peixes T4 que receberam a farinha de microalgas e foram expostos a temperatura de 19,91±0,30 a 23,74±0,25°C. Nesse tempo, o resultado sugere que houve uma interação da

farinha com a temperatura, o que pode representar ação do suplemento na manutenção da resposta de alerta dos peixes. A farinha de microalga é composta por ácidos graxos insaturados e representa uma excelente fonte de energia para os peixes (Cortegano et al., 2019; Gonçalves e Cyrino, 2014). Os lipídeos constituem a principal fonte de energia dos peixes, seguidos pelas proteínas (Smith, 1989; NRC, 2011).

O glicogênio é uma das muitas formas de armazenamento e retenção de energia e serve como substrato para disponibilizar glicose na corrente sanguínea. Entretanto, não há uma correlação do perfil do glicogênio com o perfil da glicose, sugerindo que a elevação da glicose observada não mobilizou quantidade significativa do glicogênio hepático. Importante destacar, para corroborar esse fato, que a elevação não atingiu valores muito superiores aos valores considerados normais para a espécie (foi de 40 para 80 c), mesmo tendo elevações significativas. Em estudo de Gomes et al. (2003), em que tambaquis foram transportados em diferentes densidades, as concentrações da glicose nos peixes do grupo controle foram em torno de 50 mg dl⁻¹, enquanto o transporte em altas densidades elevou esses valores para cerca de 200 mg dl⁻¹. Essa correlação e a comparação com o trabalho de Gomes et al. (2003) nos sugere que a exposição a temperaturas reduzidas, da forma que foi feita, promoveu menor mobilização de energia que o transporte. Analisando a participação da farinha de microalga na resposta deste metabólito glicogênio, a alteração observada foi muito pontual, às 6 horas, nos peixes T4, que receberam a farinha e foram expostos a 19,91±0,30 a 23,74±0,25°C, nos quais ocorreu redução do metabólito em relação aos peixes T3, que receberam a farinha e não foram expostos a temperaturas reduzidas, resposta que se relaciona com alteração observada na glicose, ou seja, a glicose aumentou enquanto o glicogênio apresentou queda nos valores.

Os eritrócitos foram utilizados em nosso experimento como um indicador metabólico, visto que são as células mais abundantes na circulação, cuja principal função é transportar oxigênio e gás carbônico por meio da combinação da hemoglobina com O₂ (Ranzani-Paiva, 2007) e podem ser mobilizadas para atender as demandas metabólicas. O perfil destas células se correlacionou com o da glicose, 1 hora após os peixes T2 (C/19,91±0,30 a 23,74±0,25°C) serem

expostos a temperaturas reduzidas, observamos maior número de eritrócitos e maior disponibilidade de glicose para este grupo de peixes, sugerindo também maior disponibilidade de oxigênio, uma vez que a solubilidade do oxigênio aumenta em ambientes com menor temperatura (Cech e Brauner, 2011), tornando o oxigênio mais disponível para os animais. Além disso, a afinidade da hemoglobina com oxigênio aumenta em temperaturas baixas, temperatura observada nesse mesmo grupo (aproximadamente 19°C), favorecendo a captação de oxigênio. Em um estudo com tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a uma brusca redução de temperatura, inicialmente os valores do RBC reduziram e quando a exposição se prolongou o valor do RBC aumentou (Panase et al., 2018).

Na mesma amostragem de 1 hora, observamos que a inclusão de farinha de microalgas T3 (FM/29,65±0,47°C) aumentou o número de eritrócitos, independente da exposição a temperatura reduzida. Resposta semelhante, de efeito promotor do suplemento no número dos eritrócitos, é observada às 3 horas, nos peixes T4 (FM) em relação aos peixes T2 (C), em condição de exposição a temperatura de 19,91±0,30 a 23,74±0,25°C, sugerindo que os ácidos graxos insaturados tiveram ação positiva na formação dos eritrócitos. Os ácidos graxos insaturados são um componente dos fosfolipídios nas membranas celulares e ajudam a manter a fluidez da membrana (Pelley, 2022), mecanismo protetor da célula.

Quanto aos componentes do sistema imune inato, observamos que a atividade respiratória de leucócitos (ARL) aumentou nos peixes do grupo controle T2, após 1 hora de exposição a 19,91±0,30°C, em relação aos que permaneceram a temperatura de 29,65±0,47°C, seguindo o mesmo padrão de resposta das concentrações de glicose e do número de eritrócitos, sugerindo que a ativação dos leucócitos foi sustentada por substrato energético (mais glicose e oxigênio para o aumento da atividade respiratória destas células). A atividade de explosão respiratória é uma resposta antimicrobiana das células fagocíticas (Secombes, 1996), que são mobilizadas durante uma resposta aguda de estresse (Tort, 2011). Os leucócitos consomem oxigênio e geram espécies reativas de oxigênio, com atividade bactericida, em resposta a estímulos apropriados (Robinson, 2008). O aumento da ARL do grupo T2 (C), entretanto

foi maior que dos peixes também expostos a temperatura de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$, mas alimentados com a farinha de microalgas T4 (FM), ou seja, o suplemento atenuou a ARL. Em estudo anterior, Faria et al. (2023) também observaram aumento da ARL em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) expostos a 16°C por 24 horas. Segundo Tort (2011), uma exposição de curta duração pode potencializar respostas inatas. Em relação ao aumento da ARL em quanto à suplementação com farinha de microalga, Mourent et al. (2005) observaram que a ARL de robalos (*Dicentrarchus labrax*) foi afetada após alimentação com dietas com óleos vegetais (ricas em ácidos graxos) quando comparadas aos peixes que receberam dieta com óleo de peixe. Às 3 horas, observamos novamente a influência da temperatura reduzida ativando a ARL, desta vez nos peixes que receberam a farinha de microalga. Existem mecanismos biológicos através dos quais os ácidos graxos podem afetar a função imunitária dos peixes e a resistências a doenças, entre os quais a capacidade de influenciar a composição lipídica da membrana celular e suas propriedades físicas, visto que muitas respostas imunitárias se baseiam nas interações entre as membranas celulares dos leucócitos (ativação de citocinas) ou até mesmo interferências no sistema imune através da produção de eicosanoides (Mourent et al., 2005).

A atividade do sistema complemento (AHC_{50}) também mostrou uma redução em sua atividade para os grupos expostos a $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ e que receberam dietas com farinha de microalga. Nikoskelainen et al. (2004) também observaram menor AHC_{50} em truta- arco-íris exposta a temperaturas baixas (5 e 10°C). Já, em relação à concentração sérica da lisozima, a única alteração observada ocorreu após 3 horas de exposição a temperatura de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ sendo mais elevada nos peixes do grupo controle em relação ao grupo que recebeu farinha de microalga, sem um padrão definido.

O sistema antioxidante tem a função de neutralizar a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs). Em relação ao sistema antioxidante hepático dos tambaquis, em nosso estudo, observamos que, logo na primeira amostragem, a atividade da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do radical ânion superóxido (O_2^{\bullet}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aumentou no grupo que recebeu farinha de microalga sem exposição a temperatura reduzida T3 em relação ao grupo T4, que também recebeu o suplemento mas foi exposto a

19,91±0,30 a 23,74±0°C, sugerindo que não houve necessidade da ativação da enzima frente ao desafio térmico, provavelmente pois estes peixes já estavam modulando o sistema antioxidante. A resposta deste grupo T3 (FM) também foi maior que a dos peixes que não receberam suplemento T1 (C) e foram expostos a temperatura ambiente de 29,65±0,47°C. Nas amostragens seguintes, a atividade da SOD se manteve estável, com redução no grupo T3, que deixou os valores mais baixos que do grupo T4, ambos alimentados com o suplemento. Observamos que as respostas foram mais agudas, na primeira amostragem.

A catalase (CAT), outro indicador do sistema antioxidante, tem a função de catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio e água, ou seja, pode eliminar os produtos da SOD. Esta enzima mostrou um perfil semelhante ao da SOD, na primeira amostragem, mas as variações individuais interferiram na significância da diferença, mas, às 3 horas, podemos observar efeito protetor do suplemento na modulação desta enzima nos peixes do grupo T4 exposto a 19,91±0,30 a 23,74±0°C, sugerindo modulação à medida que o tempo se estendeu. Isso pode ser confirmado, pois a atividade também foi maior no grupo T2, exposto a 19,91±0,30 a 23,74±0°C, mas sem o suplemento. Essa enzima antioxidante é conhecida como essencial na defesa de primeira linha contra o excesso de Eros. Em nosso estudo, observamos sua atividade potencializada, tanto em função da temperatura reduzida como também pelo tratamento com dietas de microalga. Estudo anterior com baiacus (*Takifugu obscurus*) expostos a temperaturas reduzidas (13 a 17°C) observou ativação da expressão de genes relacionados a atividade da SOD e CAT, assim que as temperaturas foram reduzidas, indicando que a defesa antioxidante foi reforçada para proteger a célula (Cheng et al., 2017). Por outro lado, em outro estudo com robalo-liso (*Lateolabrax maculatus*), alimentado com dietas contendo adicional de ferro e expostos a temperaturas mais altas (33°C), a atividade das enzimas SOD e CAT foi aumentada (Wang et al., 2023).

A glutathiona peroxidase (GPx) é responsável pela redução de diversos tipos de peróxidos, incluindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Nimse e Pal, 2015). Atua também na proteção contra peroxidação lipídica e sua atividade é regulada pela extensão da peroxidação lipídica (Pereira de Faria et al., 2021). Em nosso estudo, na primeira e segunda amostragem,

observamos, na GPx o mesmo perfil de ativação da SOD e CAT, embora sem significância estatística. Às 6 horas, a atividade da GPx foi maior nos peixes T3 expostos a temperatura de $29,65 \pm 0,47^\circ\text{C}$, em relação aos peixes do grupo T4 expostos a $19,91 \pm 0,30$ a $23,74 \pm 0,25^\circ\text{C}$, reforçando a importância da farinha de microalga na modulação e estabilização do sistema antioxidante. Estudos em peixes expostos a temperaturas extremas evidenciaram esse mecanismo compensatório da atividade das enzimas antioxidantes em resposta a peroxidação lipídica (Almeida et al., 2015; Madeira et al., 2016; Wang et al., 2016; Almroth et al., 2019; Xu et al., 2022).

A glutathione S-transferase (GST) auxilia no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de uma variedade de metabólitos e produtos de lipoperoxidação com glutathione reduzida (GSH), transformando o composto tóxico a uma forma mais simples de ser excretada (Modesto & Martinez, 2010). Em nosso estudo, a ativação do sistema antioxidante no grupo T3 ($FM/29,65 \pm 0,47^\circ\text{C}$) observada em relação às enzimas já descritas (SOD, CAT, GPx) é semelhante, e observamos sua ativação em fase mais aguda do experimento (uma hora) e recuperação às 3 horas, como aconteceu com a SOD.

Complementando, a GSH atua como um cofator para ação das enzimas GST e GPx (Modesto & Martinez, 2010). Ao avaliarmos a concentração da GSH, observamos que o padrão de respostas das enzimas se repete, sugerindo que o sistema teve a disponibilidade de substrato para ação das enzimas. Segundo Zhang et al. (2004), as concentrações de GSH, durante um estresse oxidativo moderado, podem aumentar como uma resposta adaptativa por meio do aumento da síntese, no entanto em situações de estresse severo as concentrações podem diminuir devido a uma falha nos mecanismos adaptativos. Em nosso estudo, observamos o aumento da concentração de GSH em função da farinha de microalga, bem como o aumento da atividade da GST. É importante analisarmos a atuação dessas enzimas antioxidantes e substrato de forma relacionada, uma vez que desajustes nas atividades podem causar estresse oxidativo (Almroth et al., 2019).

Em relação à LPO, indicador que avalia a quantidade de TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, formadas como um subproduto da peroxidação lipídica. A LPO, nos tambaquis, apresentou o mesmo perfil geral

das enzimas e da GSH, na fase inicial do experimento (uma hora), também sem significância pelas altas variações observadas, o que não invalida a indicação biológica da resposta. Novamente observamos, a modulação das respostas a temperatura de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ nos peixes T4 pela farinha de microalga, uma vez que a peroxidação reduz ao longo do tempo às 6 horas. Esse efeito protetor fica evidente pela diferença observada entre os peixes T2 (C) e T4 (FM), expostos a $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$. Nesta comparação observamos, também, a colaboração da GPx, ativada neste momento, sugerindo um mecanismo ativado contra o estresse oxidativo.

O conjunto das respostas dos diferentes participantes do sistema antioxidante sugere a ativação destes mecanismos pela temperatura reduzida e o efeito protetor da farinha de microalga.

5. Conclusão

Os ácidos graxos insaturados provenientes da farinha de microalgas:

- 1) influenciaram o perfil metabólico de tambaquis, favorecendo a modulação e ajustes fisiológicos durante a exposição ao frio;
- 2) interferiram na resposta imunitária de tambaquis, sendo que a exposição a temperatura de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ potencializou respostas inatas;
- 3) apresentaram efeito protetor na modulação do sistema antioxidante, quando os peixes foram expostos a temperatura de $19,91\pm 0,30$ a $23,74\pm 0,25^{\circ}\text{C}$, reduzindo o estresse oxidativo.

Este estudo também auxilia na compreensão de mecanismos que modulam sistemas fisiológicos do tambaqui em desafio térmico, colaborando para criação desta espécie na aquicultura.

6. Referências

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) biomarker responses and behaviour: implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, p. 45-55, 2015.

ALMROTH, B. C. *et al.* Oxidative stress and biomarker responses in the Atlantic halibut after long term exposure to elevated CO₂ and a range of temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 238, p. 110321, 2019.

ARAUJO-DAIRIKI, T. B.; CHAVES, F. C. M.; DAIRIKI, J. K. Seeds of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*, *Euphorbiaceae*) as a feed ingrediente for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characidae). **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 32-37, 2018.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. So fruitful a fish: Ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui. **Columbia University Press**, 1997.

ARENDS, R. J. *et al.* Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Endocrinology**, v. 159, p.85-91, 1998.

ARIDE, P. H. R.; ROUBACH, R.; VAL, A. L. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 6, p. 588-594, 2007.

BARTON, B.A.; MORGAN, J.D.; VIJAYAN, M.M. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. **American Fisheries Society**, 1193 Bethesda, p.111-148. 2002.

BEITINGER, T. L.; BENNETT, W. A.; MCCAULEY, R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental biology of fishes**, v. 58, n. 3, p. 237-275, 2000.

CAMPOS, D. F. *et al.* Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**, v. 101, p. 533-540, 2019.

CECH, J. J.; BRAUNER, C. J. Techniques in whole animal respiratory physiology. **Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment**, v. 2, p. 846-853, 2011.

CHENG, C. H. *et al.* Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. **Fish & shellfish immunology**, v. 64, p. 137-145, 2017.

COGLIATI, K. M. *et al.* Reduced stress response in juvenile Chinook Salmon reared with structure. **Aquaculture**, v. 504, p. 96-101, 2019.

CORTEGANO, C. A. A. *et al.* Finishing plant diet supplemented with microalgae meal increases the docosahexaenoic acid content in *Colossoma macropomum* flesh. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 4, p. 1291-1299, 2019.

CROCKETT, E. L. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 178, n. 7, p. 795-809, 2008.

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**, p. 1-14, 2023.

FARIA, C. F. P. *et al.* Modulation of the innate immune response, antioxidant system and oxidative stress during acute and chronic stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 47, p. 895-905, 2021.

FERREIRA, M. W. *et al.* Mortality in Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) caused by *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas aeruginosa* in Excavated Tank. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, 2019.

GAMBOA-DELGADO, J.; MÁRQUEZ-REYES, J. M. Potential of microbial derived nutrients for aquaculture development. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 1, p. 224-246, 2018.

GAMPERL, A. K. *et al.* The impacts of increasing temperature and moderate hypoxia on the production characteristics, cardiac morphology and haematology of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 519, p. 734874, 2020.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L.N.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. *Tambaqui (Colossoma macropomum)* In: BALDISSEROTTO, B. (3^ªed.) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 3^ª ed. Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência – **Editora UFMS**, 2020, p.147-152.

GOMES, L.C. *et al.* Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture society**, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003.

GONÇALVES, L. U.; CYRINO, J. E. P. Digestibility of energy, lipids and fatty acids of vegetable oils and poultry fat by pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 567-573, 2014.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical society transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

ISLAM, M. J. *et al.* Metabolic and molecular stress responses of European seabass, *Dicentrarchus labrax* at low and high temperature extremes. **Ecological Indicators**, v. 112, p. 106118, 2020.

ISLAM, M. J.; KUNZMANN, A.; SLATER, M. J. Extreme winter cold-induced osmoregulatory, metabolic, and physiological responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) acclimatized at different salinities. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 145202, 2021.

ISLAM, M. J.; KUNZMANN, A.; SLATER, M. J. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 53, n. 2, p. 314-366, 2022.

KHIEOKHAJONKHET, A. *et al.* Effects of long-term exposure to high temperature on growth performance, chemical composition, hematological and histological changes, and physiological responses in hybrid catfish [σ *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) \times ♀ *C. macrocephalus* (Günther, 1864)]. **Journal of Thermal Biology**, v. 105, p. 103226, 2022.

KIM, J. H.; KIM, S.-K.; HUR, Y. B. Temperature-mediated changes in stress responses, acetylcholinesterase, and immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* in a bio-floc environment. **Aquaculture**, v. 506, p. 453-458, 2019.

LE MORVAN-ROCHER, C.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and non-specific cytotoxic activity. **Developmental and Comparative Immunology**, v.19, p. 87-95, 1995.

MADEIRA, D; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324-331, 2016.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294-299, 2010.

MOURENTE, G. *et al.* Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-14C] 18: 3n- 3 (LNA) and [1-14C] 20: 5n- 3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 173-186, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL *et al.* Nutrient requirements of fish and shrimp. **National academies press**, 2011.

NIKOSKELAINEN, S.; BYLUND, G.; LILIUS, E. M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 6, p. 581-592, 2004.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC advances**, v. 5, n. 35, p. 27986-28006, 2015.

OLIVEIRA, A.; CYRINO, J. E. P. Estresse dos peixes em piscicultura intensiva. 1998.

PANASE, P.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K. Biochemical and physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. **Aquaculture Reports**, v. 11, p. 17-23, 2018.

PELLEY, J. W. 10-Fatty Acid and Triglyceride Metabolism. **Elsevier's integrated review biochemistry**. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 81-88, 2012.

PÉREZ-CASANOVA, J. C. *et al.* The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. **Fish & shellfish immunology**, v. 24, n. 5, p. 600-609, 2008.

PHUC, N. T. H.; MATHER, P. B.; HURWOOD, D. A. Effects of sublethal salinity and temperature levels and their interaction on growth performance and hematological and hormonal levels in tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Aquaculture International**, v. 25, p. 1057-1071, 2017.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia como ferramenta para a avaliação da saúde de peixes. **Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes**, v. 2, n. 2007, p. 47-51, 2007.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. *et al.* Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, n. único, p. 77-83, 1999.

SARÀ, G. *et al.* Predicting shifting sustainability trade-offs in marine finfish aquaculture under climate change. **Global change biology**, v. 24, n. 8, p. 3654-3665, 2018.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: Iwama G, Nakanishi T (eds) The fish immune system: organism, pathogen and environment. **Academic Press**, San Diego, pp 63–103, 1996.

TANCK, M. W. T. *et al.* Cold shocks: a stressor for common carp. **Journal of Fish Biology**, v. 57, p. 881-894, 2000.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, p.1366–1375, 2011.

TROMP, J. J., JONES, P. L., BROWN, M. S., DONALD, J. A., BIRO, P. A., & AFONSO, L. O. Chronic exposure to increased water temperature reveals few impacts on stress physiology and growth responses in juvenile *Atlantic salmon*. **Aquaculture**, v. 495, p. 196-204, 2018.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER, J.D. Stress and immune system in fish, In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. In: BALDISSEROTTO, B., URBINATI, E.C., CYRINO, J.E.P. (Eds). **Elsevier**, Academic, 2020, p. 93-114.

VISENTAINER, J. V. *et al.* Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Food Science and Technology**, v. 20, p. 90-93, 2000.

WANG, Z. *et al.* Effects of dietary iron levels on growth performance, iron metabolism and antioxidant status in spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) reared at two temperatures. **Aquaculture**, v. 562, p. 738717, 2023.

WANG, Q. *et al.* Docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.: review and prospect. **Food Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 111-135, 2021.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p. 59-625, 1997.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. S1, p. S41-S45, 2007.

ZANIBONI FILHO, E.; MEURER, S. Limitações e potencialidades do cultivo de tambaqui (*Colossoma macropomum Cuvier, 1818*) na região subtropical do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24, p. 169-172, 1997.

ZHANG, J. *et al.* Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 167-174, 2004.