

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito da metionina e do triptofano nas
respostas de estresse, sistema imune inato e
antioxidante em juvenis de pacu (*Piaractus
mesopotamicus*) Holmberg, 1887**

Raíssa de Cassia Pinheiro Ribeiro

Jaboticabal, São Paulo

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeito da metionina e do triptofano nas
respostas de estresse, sistema imune inato e
antioxidante em juvenis de pacu (*Piaractus
mesopotamicus*) Holmberg, 1887**

Raíssa de Cassia Pinheiro Ribeiro

Orientadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

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 Doutorado.

Jaboticabal, São Paulo

2023

R347e Ribeiro, Raíssa de Cassia Pinheiro
Efeito da metionina e do triptofano nas respostas de estresse, sistema imune inato e antioxidante em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg, 1887 / Raíssa de Cassia Pinheiro Ribeiro – Jaboticabal, 2023 ix, 134 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2023

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Eduardo Pahor Filho, Marcio Aquio Hoshiba, Rafael Estevan Sabioni, Thiago Fernandes Alves Silva

Bibliografia

1. Aminoácido. 2. Imunidade. 3. Metabolismo. 4. Antioxidantes. 5. Pacu. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito da Metionina e do Triptofano nas respostas de estresse, sistema imune inato e antioxidante em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg, 1887

AUTORA: RAÍSSA DE CÁSSIA PINHEIRO RIBEIRO

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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

Elisabeth Urbinati

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

Prof. Dr. EDUARDO PAHOR FILHO (Participação Virtual)
/ Instituto Municipal de Ensino Superior de Bebedouro

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

Dr. RAFAEL ESTEVAN SABIONI (Participação Virtual)
Centre for Aquaculture and Seafood Development, Fisheries and Marine Institute / Memorial University of Newfoundland and Labrador, Canadá

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

 Prova realizada em 28 de julho de 2023
MARCIO AQUIO HOSHIBA
CNPJ 17.029.013-00007-00
Verifique em <https://portal.mec.gov.br>

Jaboticabal, 28 de julho de 2023

“Devemos plantar o mar e pastorear seus animais, usando o mar como fazendeiros em vez de caçadores. É disso que se trata a civilização - agricultura substituindo a caça”

Jacque-Yves Costeau

Ao meu pai Landim Pinheiro (in memoriam)

E aos precursores deste sonho, Ângela

Pinheiro, Ivanilda Carvalho e

Guilherme Carvalho, dedico

AGRADECIMENTOS

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”
(Isaac Newton)

Com esta frase início meus agradecimentos, que vão para além dos anos de realização deste trabalho.

À prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati por aceitar e orientar a realização deste trabalho, que me proporcionou uma fantástica experiência profissional, com muitas oportunidades de crescimento. Sou grata pela sua paciência, dedicação, ensinamentos e incentivos.

À minha mãe Ângela Pinheiro pela oportunidade, apoio, amor, dedicação, paciência, confiança e orações em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, Landim Pinheiro, pelo amor e por me ensinar a amar os recursos pesqueiros.

À minha segunda mãe, amiga e companheira, Ivanilda Carvalho, por me encorajar desde o início e acompanhamento nos primeiros passos da vida acadêmica.

Ao meu padrinho Guilherme Carvalho, pelo apoio, incentivo e pela torcida para que tudo desse certo.

À minha irmã, Daniela Carvalho, pela amizade, incentivo, conselhos e apoio em todos os momentos.

Ao amigo e irmão que a vida me deu, Edivaldo Serrão, pela amizade, apoio, incentivo e conselhos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Dr. Eduardo Pahor Filho e Thiago Fernandes Alves da Silva pelas importantes elucidações, contribuições e questionamentos no exame geral de qualificação e defesa

Aos professores Marcio Hoshiba e Rafael Sabioni pelo apoio, incentivo e esclarecimentos durante a defesa

Aos docentes do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) minha sincera gratidão pelo compromisso em compartilhar conhecimento e contribuir para esta formação.

Aos servidores do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) pela paciência, profissionalismo, disponibilidade e empenho em ajudar, fornecendo orientação e suporte em todos os momentos.

Às contemporâneas de mestrado e doutorado, minhas amigas, Aurea Veras e Allana Feitoza, pelo companheirismo, amizades e carinho. Que seja sempre assim: AM, PA e MA.

À Adriane Federici Bido, pela amizade, carinho, companheirismo e apoio durante todos esses anos.

À Thais Lucato, pela amizade construída durante esses anos, obrigada por todo apoio, sempre foste incansável em ajudar. Sou grata por todas as risadas contigo.

À Julyana Cristina, pelo carinho, amizade, companheirismo e incentivo durante às análises.

Reitero meus agradecimentos aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Fisiologia de Peixes: Aurea Veras, Adriane Bido, Allana Feitoza, Mariana Maluli, Ana Paula Montedor, Eduardo Pahor Filho, Allan Emilio, Dayanne Raule, Fábio Gonzalez, Weliton Vilhalba e Camila Faria, pelo apoio e companheirismo durante o desenvolvimento do experimento, ajuda nas amostragens e auxílio nas análises. À Damares Perecim, pela ajuda ao longo desses anos, ajuda nas coletas, conversas e ensinamentos.

Aos alunos do CAUNESP, Inacio, Marcio, Karen, Luana e Thaise, que se dispuseram em ajudar durante as amostragens, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Reprodução de Peixes e Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos pelo fornecimento de espaço durante as análises.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo durante o doutorado para realização deste projeto.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Morfologia, Ângela e Euclides pelos momentos de descontração e boas gargalhadas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, Bolsa de Doutorado 157171/2019-1.

Sumário

LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1.....	5
Introdução Geral	5
1. Panorama da Aquicultura.....	6
2. Estresse em peixes	7
3. Estressores na piscicultura	10
3.1 Exposição aérea.....	11
3.2 Lipopolissacarídeos (LPS)	12
4. Estresse e a interação com sistema imune	13
5. Estresse e a interação com sistema antioxidante.....	17
6. Suplementação nutricional para manutenção da saúde nos peixes	21
6.1 Aminoácidos.....	23
6. 1. 1 Metionina	26
6.1.2 Triptofano	28
7. Modelo experimental	31
8. Referências.....	33
CAPÍTULO 2.....	64
Efeitos da suplementação de metionina em parâmetros fisiológicos de pacus submetidos a estressor agudo	64
RESUMO	65
1. Introdução.....	67
2. Material e Métodos	68
2.1 Aclimação e manejo dos peixes	69
2.2 Processamento das dietas experimentais	69
2.3 Delineamento experimental.....	70
2.4 Amostragem	71
2.5 Análises laboratoriais	72
2.5.1 Indicadores de estresse	72
2.5.2 Indicadores de imunidade inata.....	72
2.5.3 Indicadores Metabólicos	73
2.6 Análise estatística	75

3. Resultados	75
3.1 Indicadores de estresse	75
3.1.1 Concentração plasmática de cortisol (Fig. 3)	75
3.1.2 Concentração plasmática de glicose (Fig. 4)	76
3.2 Indicadores de imunidade inata	77
3.2.1 Atividade respiratória dos leucócitos (Fig. 5)	77
3.2.2 Atividade sérica de lisozima (Fig. 6)	78
	79
3.2.3 Atividade Hemolítica do sistema complemento (Fig. 7)	79
3.3 Indicadores Metabólicos (Fig. 8)	81
	81
3.3.2 Concentrações de lipídio hepático, lipídeo muscular e glicogênio hepático (Fig. 9)	82
3.3.3 Índices Somáticos	83
3.3.3.1 Índice Hepatossomático e Índice de Gordura Visceral (Fig. 10)	83
3.4 Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo	84
3.4.1 Concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 11)	84
	84
3.4.2 Atividade hepática de glutathiona s-transferase (GST) (Fig. 12)	85
3.4.3 Atividade hepática da catalase (CAT) (Fig. 13)	86
3.4.4 Atividade hepática de superóxido dismutase (SOD) (Fig. 14)	87
3.4.5 Peroxidação Lipídica (LPO) (Fig. 15)	88
4. Discussão	89
5. Conclusão	93
6. Referências	94
CAPÍTULO 3	100
Sobre o efeito de triptofano em parâmetros fisiológicos de <i>Piaractus mesopotamicus</i> submetidos a estresse	100
RESUMO	101
Palavras-Chaves	101
ABSTRACT	102
1. Introdução	103
2. Material e Métodos	104
2.1 Aclimação e manejo dos peixes	104
2.2 Processamento das dietas experimentais	105
2.3 Delineamento experimental	105

2.4 Amostras e análises laboratoriais.....	106
2.4.1 Indicadores de estresse	107
2.4.2 Indicadores de imunidade inata.....	107
2.5 Indicadores Metabólicos	107
2.6 Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo	108
3. Análise estatística.....	109
4. Resultados	109
4.1. Indicadores de estresse	109
4.1.1 Concentração plasmática de cortisol (Fig. 1)	109
4.1.2 Concentração plasmática de glicose (Fig. 2).....	110
4.2. Indicadores de imunidade inata.....	112
4.2.1 Atividade respiratória dos leucócitos (Fig. 3).....	112
4.2.2 Atividade de lisozima (Fig. 4).....	112
4.2.3 Atividade hemolítica do sistema complemento (Fig. 5).....	114
4.3 Indicadores metabólicos	115
4.3.1 Concentrações de colesterol e triglicerídeos (Fig. 6)	115
4.3.2 Concentrações de lipídeo hepático, lipídeo muscular e glicogênio hepático (Fig. 7).....	115
4.3.3 Índices Somáticos (Fig. 8)	116
4.4. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo	117
4.4.1 Concentração hepática de glutathione reduzida (GSH) (Fig. 9)	117
4.4.2 Atividade hepática de glutathione s-transferase (GST) (Fig. 10)	119
4.4.3 Atividade hepática da catalase (CAT) (Fig. 11).....	120
4.4.4 Atividade hepática de superóxido dismutase (SOD) (Fig. 12).....	121
4.4.5 Peroxidação Lipídica (LPO) (Fig. 13).....	123
5. Discussão	124
6. Conclusão.....	127
11. Referências.....	127

LISTA DE ABREVIações

AA – Aminoácidos

AAE – Aminoácidos Essenciais

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AHC – Atividade Hemolítica do Sistema Complemento

ANOVA – Análise de Variância

ARL – Atividade Respiratória dos Leucócitos

CAT – Catalase

EA – Estresse Agudo

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetracético

EGTA – Ácido etilenoglicol Tetracético

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH – Glutathione Reduzida

GST – Glutathione s-transferase

IGVS – Índice de Gordura Visceral

IHS – Índice Hepatosomático

LPO – Peroxidação Lipídica

LPS – Lipopolissacarídeo

MDA – Malondialdeído

MET – Metionina

N – Nitrogênio

O – Oxigênio

PB – Proteína Bruta

SAS – Statistical Analysis system

SE – Sem Estresse

SOD – Superóxido Dismutase

TRIP – Triptofano

RESUMO

A presente tese foi desenvolvida em dois experimentos, sendo apresentada em três capítulos. No primeiro capítulo, apresentamos uma introdução geral e referencial teórico sobre os temas que norteiam a tese. Ambos os experimentos contam com análises dos mesmos indicadores: indicadores bioquímicos metabólicos, de estresse, imunidade inata e sistema antioxidante. No primeiro experimento, foram utilizados juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta comercial suplementada com metionina, nos seguintes tratamentos: Controle – 4 g de Met kg⁻¹ de ração; Tratamento 8 g – 8 g Met kg⁻¹ ração; e Tratamento 12 g – 12 g Met kg⁻¹ ração, durante 15 dias, e submetidos a estressor agudo (EA) de exposição aérea ou injeção de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Após o período da dieta experimental, os peixes foram amostrados 1h, 3h, 6h e 24h após o EA. Os resultados mostram que houve elevação das concentrações de cortisol em todos os grupos, independente da condição de estresse, e as concentrações de metionina modularam as respostas de estresse. A glicose foi elevada 1 h e 3 h após o EA e 1 h após o LPS. Em relação aos indicadores imunológicos, o EA e LPS diminuíram a atividade respiratória dos leucócitos. A lisozima foi afetada pelo EA e LPS no tratamento 12 g. Nos grupos sem estressor (SE) e EA, o sistema complemento foi modulado tanto pela suplementação da dieta com 12 g de metionina, quanto pela exposição ao estressor agudo. Nos indicadores metabólicos, as concentrações dos triglicerídeos foram menores nos grupos EA e LPS, as concentrações de lipídeo hepático foram afetadas pelo estressor EA e LPS, e as do lipídeo muscular foram afetadas pelo tratamento 12 g nos Grupos SE e LPS. Nos índices somáticos, o IHS no grupo SE mostrou maior valor. O capítulo 3, correspondente ao segundo experimento, avaliou a inclusão de triptofano nas dietas de juvenis de pacu nas concentrações: Tratamento Controle – 2 g de Trip kg⁻¹ de ração; Tratamento 4 g Trip kg⁻¹ de ração; Tratamento 6 g – 6 g de Trip kg⁻¹ de ração distribuídos em grupos: SE sem estresse; EA estresse agudo; e injeção de LPS. Os resultados mostraram que o cortisol foi elevado após 1 h no grupo EA e LPS e as concentrações do hormônio foram moduladas pela inclusão de triptofano na concentração 6 g. A concentração de glicose foi maior no grupo EA. A atividade de lisozima foi maior no tratamento 4 g 1h após o EA. A atividade do sistema complemento foi menor nos grupos EA e LPS. Nos indicadores bioquímicos, as concentrações de albumina foram maiores nos grupos EA e LPS. A deposição de glicogênio hepático foi afetada pelo EA. Em conjunto, os dados apresentados nos mostram que a metionina e o triptofano tem ações redutora de estresse e imunoestimulante, enquanto o agente estressor afeta negativamente o sistema imunológico e a lipogênese. Em síntese, os resultados nos permitem sugerir a inclusão de ambos os aminoácidos para superar desafios do estresse e reforçar mecanismos de defesa imunológica.

PALAVRAS CHAVES

Aminoácidos, imunidade, metabolismo, antioxidante, pacu

ABSTRACT

The present thesis was developed in two experiments, being presented in three chapters. In the first chapter, we present a general introduction and theoretical framework on the themes that guide the thesis. Both experiments rely on analysis of the same indicators: stress, innate immunity, biochemical, metabolic and antioxidant indicators. In the first experiment, chapter 2, juveniles of pacu *Piaractus mesopotamicus* fed a commercial diet supplemented with Methionine were evaluated at the following concentrations: Control – 4 g of Met Kg⁻¹; Treatment 8 g - 8 g Met Kg⁻¹; and Treatment 12 g - 12 g of Met Kg⁻¹, during 15 days and submitted to the acute stress of air exposure and injection of *Escherichia coli* LPS. After the period of ingestion of the experimental diet, the fish were sampled 1h, 3h, 6h and 24h after the stressor. The results show that was an increase in cortisol concentrations in all groups, regardless of the stress condition, and methionine concentrations modulated the stress responses after the stressor. Glucose was elevated 1 h and 3 h after EA and 1 h after LPS. In the immunological indicators, EA and LPS decreased the respiratory activity of leukocytes. Lysozyme was affected by EA and LPS in the 12 g treatment. In the SE and EA groups, the complement system was modulated both by dietary supplementation with 12 g of methionine and by exposure to an acute stressor. In terms of metabolic indicators, triglycerides were lower in the EA and LPS groups, liver lipid concentrations were affected by the stressor EA and LPS, and muscle lipid was affected by the 12 g treatment in the SE and LPS group. In the somatic indices, the IHS in the SE group showed the highest value. Chapter 3, the second experiment evaluated the inclusion of tryptophan in diets of pacu juveniles in the following concentrations: Control Treatment – 2 g of Trip Kg⁻¹; Treatment 4 g Trip Kg⁻¹; Treatment 6 g – 6 g of Trip Kg⁻¹, divided into groups: SE without stress; Acute stress EA; and LPS injection of lipopolysaccharide *Escherichia coli*. The results showed that cortisol was elevated after 1 h in the EA and LPS group. The inclusion of tryptophan at 4 g and 6 g concentrations demonstrated to modulate cortisol. Glucose concentration was higher in the EA group. Lysozyme activity was higher in the 4 g treatment 1h after the acute stressor. Complement system activity was lower in EA and LPS groups. In biochemical indicators, albumin was higher in the EA and LPS groups. hepatic

glycogen deposition was affected by acute stress. Together, the data presented show us that methionine and tryptophan have stress-reducing and immunostimulating actions. While the stressor negatively affects the immune system and lipogenesis. In summary, it allows us to suggest the inclusion of both amino acids to overcome stress challenges and reinforce immune defense mechanisms.

KYEWORDS

Amino acids, immunity, metabolism, antioxidant, pacu

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Panorama da Aquicultura

Conhecida como a principal alternativa para aumentar a oferta de alimentos de origem animal, a nível mundial (Boyd *et al.*, 2022), a aquicultura é o setor de produção que mais cresce no mundo (Mizuta *et al.*, 2022). Estas informações nos levam a dois cenários: a aquicultura cresceu devido a estabilidade dos estoques pesqueiros a partir do final dos anos 80 (FAO, 2022) e, à medida que a população mundial cresce, a produção de peixes cultivados como fonte de proteína também tende a aumentar (Naylor *et al.*, 2000), devido a demanda que impulsiona maior atividade de criação (Lubchenco e Haugan, 2023).

Nessa conjuntura, a aquicultura é um setor essencial para garantir a produção peixes de forma sustentável para a crescente população mundial (Dawood, 2016; Ahmed e Thompsons, 2019). Boyd *et al.* (2022) avaliam que a contribuição da proteína animal aquática advinda da aquicultura para o suprimento global de proteína de origem animal comprova que a aquicultura é essencial para alimentação mundial. Ainda, ao longo dos anos, percebemos que este setor consolidou seu papel crucial na segurança nutricional global, reduzindo a lacuna oferta-demanda para alimentos aquáticos (Siqueira, 2018). Sample e Dixon (2020) afirmam que a demanda por proteína animal só pode ser atendida pela aquicultura, uma vez que a pesca de captura está cada vez mais atingindo o seu limite.

No cenário mundial, a taxa média de crescimento da produção aquícola foi de 5,6 % durante o período de 2015 - 2020 (FAO, 2020), e a estimativa de aumento dessa produção para os próximos anos é de até 15% (FAO, 2022). No Brasil, a aquicultura também apresenta crescimento positivo, dados da plataforma Peixe BR mostram que os últimos oito anos foram os mais expressivos para o setor nacional, com crescimento de 45% (Peixe BR, 2022), entretanto, estes dados não refletem a capacidade de produção aquícola brasileira, como possuir a maior reserva de água doce do mundo (Valladão *et al.*, 2016), extensa área territorial (Siqueira, 2018), reservatórios (Zaniboni-Filho *et al.*, 2018) e, muitas espécies com potencial produtivo (Marques *et al.*, 2020). Assim, o Brasil possui potencial para atender à crescente demanda mundial e o rápido expansão da aquicultura (Bueno *et al.* 2015).

Contudo, a aumento da produção aquícola é baseado na intensificação dos sistemas de produção e aumento da área de cultivo, gerando, por sua vez,

prejuízos no bem-estar animal (Diana *et al.*, 2013; Boyd *et al.*, 2022). Estes fatores ganharam a atenção da comunidade científica nos últimos anos.

Paralelamente a este cenário a rápida expansão da aquicultura tem afetado o bem-estar em peixes, e isso tem ganhado cada vez mais atenção (Ashley, 2007). Estudos avaliando a influência da intensificação do manejo produtivo: transporte (Shrivastava *et al.*, 2017), restrição alimentar (Midwood, 2016), alta densidade (Santos *et al.*, 2010), alteração da qualidade de água (Sampaio e Freire, 2016) entre outros, e seus feitos no desencadeamento de respostas fisiológicas em peixes são importantes para garantir a sustentabilidade na aquicultura.

2. Estresse em peixes

Como descrito anteriormente, a intensificação do manejo produtivo na aquicultura representa um agente estressor. Estudos sugerem que este processo produtivo leva a desencadear uma série de respostas inerentemente estressantes (Barton e Iwama, 1991; Iversen *et al.*, 2003).

O termo estresse foi proposto no século XVII, sendo usado como sinônimo de “fadiga” e “cansaço”. Nos séculos seguintes, o termo foi empregado da área química e física, relacionado com termos como “força”, “pressão” e “esforço” (Farias, 1985). A partir do século XIX, Claude Bernard desenvolveu estudos averiguando a capacidade dos seres vivos em manter o equilíbrio interno frente a modificações externas (Bernard, 1872), mais tarde resultando no conceito denominado de homeostase orgânica, proposto no século XX pelo fisiologista Walter Cannon (Cannon, 1935). Tal conceito deu suporte para Hans Selye (1936) descrever o modelo biológico de estresse, resultando no que foi denominado de Síndrome da Adaptação Geral (SAG), que apresenta três diferentes estágios em resposta ao estresse: estágio primário – fase de alarme, caracterizada pela rápida ativação do sistema simpático- adrenomedular; estágio secundário – fase de adaptação e resistência, ativação do eixo hipotálamo hipófise-adrenal; e estágio terciário – fase de exaustão, no qual o estresse passa a causar danos, dependendo da sua cronicidade. Corroborando este estudo, Brett (1958) afirma que a intensidade e duração da exposição ao estressor determina se o animal é capaz de lidar com o estresse.

Embora o conceito de estresse seja amplamente utilizado, a definição clássica e mais adequada acerca da relação animal e agente estressor, é que entende-se por estresse como um conjunto de respostas que o indivíduo apresenta a qualquer estímulo extrínseco e/ou intrínseco que altere sua fisiologia orgânica (Jobling, 1994; Sopinka et al., 2016; Urbinati et al., 2020; Tort e Balasch, 2022), sendo estas controladas pelos sistemas nervoso central e hormonal, objetivando aumentar a capacidade de sobrevivência do animal (Barton e Iwama, 1991; Tort e Balasch, 2022), e tendo como resultado a produção de corticosteroides e catecolaminas, principalmente cortisol, adrenalina, noradrenalina e seu precursor dopamina, respectivamente (Mommsen, et al., 1992; Schreck e Tort, 2016; Urbinati et al., 2020).

Nos peixes, as respostas de estresse são desencadeadas após a detecção de um agente estressor, seguido da instalação de um mecanismo de alarme neural que envolve dois eixos distintos: sistema nervoso simpático-células cromafins e hipotálamo-hipófise-interrenal (Wendelaar Bonga, 1997; Pottinguer, 2008; Reid et al., 2022). A ativação do primeiro eixo resulta na liberação imediata dos neurotransmissores catecolaminicos adrenalina e noradrenalina (Reid *et al.*, 1998). As catecolaminas respondem rapidamente, em questão de segundos, à detecção de um agente estressor, dificultando assim quantificá-las (Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 2011). Após serem liberadas na circulação sanguínea pelas células cromafins, atuam modulando alterações homeostáticas (Reid, 1998; Pottinger, 2008; Urbinati et al., 2014), como as funções cardíacas e respiratórias, que por sua vez, aumentam o fluxo sanguíneo branquial (Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati et al., 2020). O segundo eixo a ser mobilizado é o hipotálamo-hipófise-interrenal, que age liberando hormônio liberador de corticotrofina (CRH), atuando na hipófise promovendo a produção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). O ACTH tem como alvo células interrenais na região cefálica renal, estimulando a síntese e secreção de cortisol na circulação (Barton e Iwama, 1991; Gallo e Civinini, 2003; Sopinka et al., 2016; Urbinati *et al.*, 2020) (Figura 1).

Embora os glicocorticoides demorem alguns minutos para serem liberados (Romero e Reed, 2005), o cortisol é o principal hormônio secretado pelo tecido interrenal dos peixes e suas concentrações plasmáticas aumentam expressivamente durante as situações estressantes (Pottinger, 2008; Sopinka *et al.*, 2016), sendo considerado um indicador primordial de estresse (Barton e Iwama,

1991). Após as respostas primárias, ocorrem uma série de alterações metabólicas, osmorregulatórias e imunológicas que buscam suprir a demanda energética do animal (Schreck e Tort, 2016; Urbinati *et al.*, 2020). Ainda como resposta às situações estressantes, temos o aumento glicêmico circulante através das vias glicogênese e glicogenólise, em ação das catecolaminas na degradação das reservas de glicogênio hepático (Iwama *et al.* 1999; Wedemeyer *et al.*, 1990; Silveira, 2009).

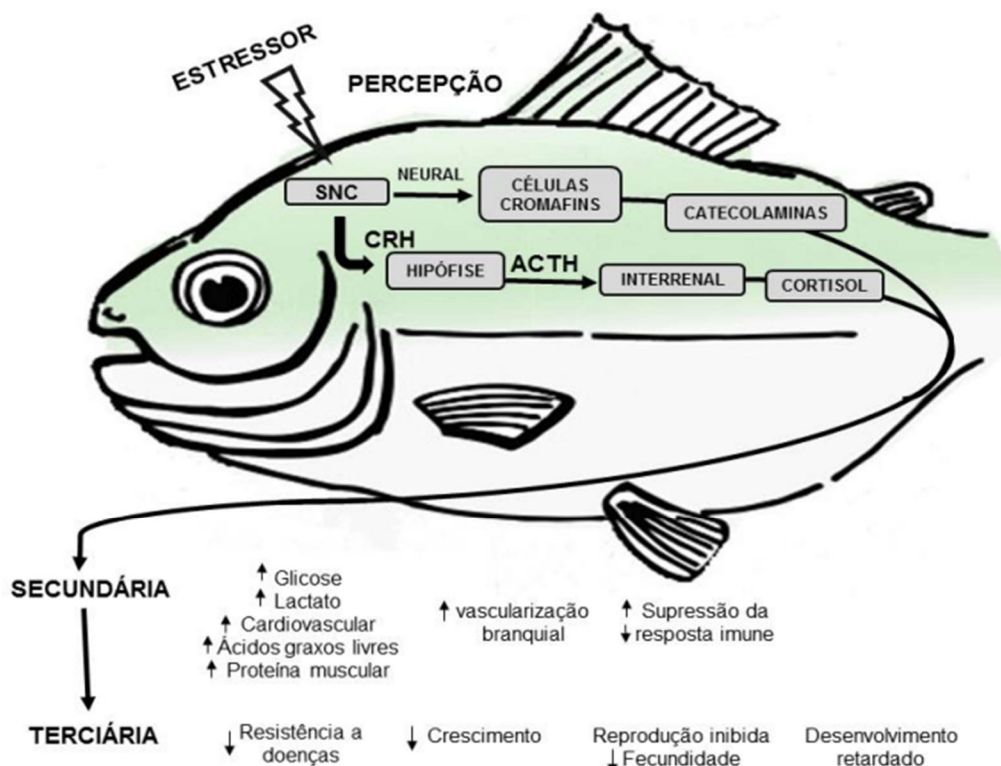


Figura 1 – Esquema das respostas primária, secundária e terciária após a percepção do estressor. Adaptado de Schreck e Tort, 2016.

As alterações fisiológicas decorrentes do estresse podem variar dependendo da intensidade, duração e tipo de agente estressor, sendo classificados como físicos, ambientais e químicos (Barton e Iwama, 1991; Ciji e Akhtar, 2020). Nos sistemas de produção aquícola, os peixes passam constantemente por situações desafiadoras e estressantes, e frente a estas ameaças ocorrem várias alterações fisiológicas (Barton *et al.*, 1980; Portz *et al.*, 2006). Além disso, vale ressaltar que em condições normais e não estressantes, os níveis fisiológicos de hormônios do estresse são essenciais para a manutenção de várias funções, tais como crescimento (Schreck, 1992), sistema imunológico (Tort, 2011; Urbinati *et al.*,

2020), desenvolvimento (Schreck, 1981), entre outros. Assim, tanto o cortisol como as catecolaminas, são moduladores das funções vitais do organismo. Entretanto, os efeitos tornam-se negativos em concentrações elevadas e prolongadas (Reid, 1998; Schreck, 1992).

Tem sido investigado na aquicultura o efeito estressor de técnicas de manejo, como transporte (Barton *et al.*, 1980; Sampaio e Freire, 2016), despesca (Breitburg, 2002; Portz *et al.*, 2006); exposição aérea (Cook, 2015), perseguição (Bolasina, 2011), exemplos de estressores físicos. Além disso, os animais podem ser desafiados inclusive por meio de estresse químico, como alteração na composição química da água (Rottman *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 2019). Por outro lado, são exemplos de estressores ambientais e sociais a densidade de estocagem, dominância e agressividade (Tort, 2011; Urbinati *et al.*, 2014).

3. Estressores na piscicultura

Visando aumentar a produtividade e otimização do desempenho produtivo, o sistema de criação escolhido necessita de adequações. Ainda, o sucesso deste setor depende em grande parte da qualidade da água, parâmetros fisiológicos e bem-estar dos peixes (Schreck e Tort 2016; Ciji e Akhtar, 2020). Comumente nas pisciculturas, encontramos respostas de estresse, devido ao manejo como captura, despesca, intensidade de luz, transporte (Urbinati e Carneiro, 2004; Abreu *et al.*, 2009; Galhardo e Oliveira, 2009).

Pesquisas envolvendo estressores na aquicultura tem sido amplamente desenvolvidas, de modo a esclarecer os mecanismos fisiológicos que afetam o crescimento, imunidade, a reprodução e a produtividade (Wendelaar Bonga, 1997; Pankhurst, 2016).

Os estressores podem ser classificados por diferentes critérios, de origem ou fonte, percepção ou duração (Tort, 2011). O agente estressor pode ser curto e agudo ou longo e crônico, podendo afetar vários aspectos fisiológicos e comportamentais dos peixes (Toni *et al.*, 2017). Segundo Urbinati e Carneiro (2004), durante o manejo, os peixes são submetidos a estressores, que podem ocorrer de forma rápida e aguda, ou longa e contínua. Ambos os termos dependem do contexto, não devendo basear somente pela duração e sim, pelas

consequências fisiológicas no animal (Boonstra, 2013). Estressores agudos derivam de uma situação momentânea de desafio, normalmente de curto prazo e com alta intensidade (Afonso, 2020) e não necessariamente são prejudiciais, podendo haver rápida recuperação (Schreck e Tort, 2016). No entanto, se o estressor for de caráter crônico ou agudo, o animal dependerá de um custo alostático para se recuperar, podendo até mesmo não voltar a homeostase (Schreck, 2000). Estes estressores, apresentam baixa intensidade, embora sejam mais persistentes (Tort, 2011), apesar da recuperação de fatores primários e secundários (Davis e Schreck, 2005).

A captura dos peixes representa uma das etapas mais agressivas durante o processo de manejo (Conte, 2004), pois caracteriza-se pelo caráter agudo e de alta intensidade (Clearwater e Pankhurst, 1997; Ellis *et al.*, 2012). Entretanto, Huntingford *et al.* (2006) afirmam que os estressores são de caráter crônico dentro do ambiente de cativeiro, pois ocorrem com frequência durante um longo período, dependendo da espécie a ser produzida. De qualquer maneira, a resposta de estresse e seus efeitos no sistema imunológico têm implicações importantes para a ocorrência de doenças por meio do manejo (Wedemeyer, 1997; Guo e Dixon, 2021). Por isto, conhecer as etapas de manejo e os aspectos do sistema imunológico dos peixes pode evitar a propagação de doenças nos sistemas de criação (Wedemeyer, 1996; Ashley, 2007).

3.1 Exposição aérea

O manejo dos peixes é um procedimento importante, comum e inevitável nas pisciculturas. Quando submetidos a biometrias, transportes, classificação e despesca, é habitual que os peixes passem por exposição aérea (Biller *et al.*, 2008; Chiste *et al.*, 2020). A exposição ao ar é um estressor frequentemente encontrado na aquicultura, uma vez que, os procedimentos de manejo durante o ciclo produtivo requerem emersão dos peixes com subseqüentes distúrbios fisiológicos (Skrzynska *et al.*, 2018; Lim e Hur, 2018). Por sua vez, a exposição aérea causa privação do fluxo de água e a redução no fornecimento de oxigênio pelas brânquias, o que compromete a energia para retorno a homeostase, podendo levar a imunossupressão e estresse oxidativo (Pereira da Silva *et al.*, 2017). Além disso, o

comprometimento de energia pode influenciar a capacidade alostática dos peixes, ocasionando um estressor agudo adicional (Boerrigter *et al.*, 2016), logo esta sobreposição de agentes estressores podem gerar estresse crônico, que ocorre quando os peixes são expostos a condições de estresse prolongadas e frequentes (Portz *et al.*, 2006).

A compreensão de alterações fisiológicas em peixes submetidos a condições agudas de estresse por exposição aérea é essencial para evitar problemas como imunossupressão e baixo desempenho zootécnico (Pakira *et al.*, 2015). Estudos investigando a exposição aérea como um agente estressor tem sido muito utilizado em várias espécies (Martins *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007; Trushenski, *et al.*, 2010; Pereira da Silva *et al.*, 2017), sendo a duração da exposição aérea um fator crucial na determinação dos efeitos sobre os peixes (Acerete *et al.*, 2004).

Abreu e Urbinati (2006) mostraram que a exposição aérea, durante 2 minutos, de juvenis de matrinxã *Brycon amazonicus*, promoveu alterações metabólicas, hormonais e hematológicas em resposta ao estresse. Ainda, alterações imunológicas podem ser observadas após a exposição aérea durante 4 minutos, como o encontrado por Ortuño e Esteban (2002), com a diminuição da atividade respiratória dos leucócitos e baixa atividade das proteínas do sistema complemento em juvenil de dourada *Sparus aurata*.

A exposição aérea pode levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Qin *et al.*, 2019), promovendo o desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do organismo (Ko *et al.*, 2014), resultando na destruição de moléculas biológicas como o DNA, lipídios e proteínas (Cheng *et al.*, 2017). Em juvenis de robalo europeu *Dicentrarchus labrax*, a exposição aérea durante um minuto causou aumento nos níveis de cortisol e níveis hepáticos de peroxidação lipídica (Resende *et al.*, 2023).

3.2 Lipopolissacarídeos (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, também denominado de endotoxina (Bricknell e Dalmo, 2005; Silipo *et al.*, 2010), sendo formado por um antígeno O e um núcleo (polissacarídeo), que por sua vez, liga-se a um lipídeo A imerso na membrana

externa das bactérias (Swain *et al.*, 2008). O lipídeo A é responsável pela toxidez do LPS quando em contato com o organismo do animal (Smith *et al.*, 2008).

As bactérias Gram negativas, que possuem LPS como um dos componentes estruturais principais da sua parede celular, são responsáveis pela maioria das doenças bacterianas de peixes cultivados (Sakar *et al.*, 2021). Tanto nos mamíferos, como nos peixes, as respostas induzidas pelo LPS ainda são pouco conhecidas (Novoa *et al.*, 2009). Porém, este componente tem sido amplamente utilizado em sistemas experimentais como um potente imunestimulante (Sakai, 1999). Os imunestimulantes aumentam a resistência a doenças infecciosas (Barman *et al.*, 2013), a partir do aumento dos mecanismos de defesa não específicos (Sakai, 1999). O LPS exerce efeitos potentes no sistema imunológico, incluindo a indução de anticorpos, estimulação de linfócitos e aumento geral da imunidade (Giri *et al.*, 2018). Em estudo realizado com carpa *Cyprinus carpio*, a administração de LPS por via intraperitoneal estimulou efetivamente a resposta imune celular inespecífica e secundária contra infecção por *Aeromonas hydrophila* (Selvaraj *et al.*, 2009). A injeção de LPS aumentou a atividade de lisozima e explosão respiratória dos leucócitos em juvenis de carpa *Labeo rohita* (Nayak *et al.*, 2008), entretanto, dependendo da concentração injetada, a imunidade do animal tende a supressão. Em juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus*, a injeção de LPS ativou altamente as proteínas do sistema complemento 3 h após o inóculo (Alves *et al.*, 2021). Em estudo com *Oreochromis niloticus*, a injeção de 250 µg kg⁻¹ LPS promoveu resposta semelhante nos peixes desafiados com *Streptococcus agalactiae* (Biller *et al.*, 2021).

4. Estresse e a interação com sistema imune

O sistema imunológico é formado por um conjunto de estruturas, moléculas, células e órgãos, que tem por finalidade manter a homeostase do organismo, visando combater agressões em geral (Cruvinel *et al.*, 2010; Secombes e Wang, 2012). Este sistema pode ser dividido em dois mecanismos de defesa: imunidade inata e imunidade adquirida.

A resposta inata é a base da defesa imunológica do invertebrados e vertebrados inferiores (Tort *et al.*, 2003), e apresenta-se como a primeira barreira

que protege o organismo contra alguma infecção ou infestação (Takeuchi e Akira, 2010; Firdaus-Nawi e Zamri-Saad, 2016; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014), sendo composto por barreiras físicas, químicas, biológicas, células e moléculas solúveis), independente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (Medzhitov e Janeway, 2000; Tort e Balasch, 2022). Esta resposta imunológica é iniciada por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares (Dalmo e Bogwald, 2022), que são os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) (Janeway, 2002). Wedemeyer (1997) descreve que as respostas biológicas do sistema imune inato são acionadas após a infecção ou infestação patogênica no organismo do hospedeiro e, ao mesmo tempo, são gerados mecanismos de defesa adaptativo produzindo memória imunológica, objetivando evitar futuras infecções pelo mesmo patógeno (Wedemeyer, 1997).

Os peixes apresentam órgãos linfoides, que são estruturas especializadas em produção de linfócitos (Dalmo e Bogwald, 2022), exercendo importante papel no desenvolvimento das respostas imunológicas, produção de anticorpos e reações imunes, como os rins, timo, baço, mucosas da pele, brânquias e intestino (Bayne e Gerwick, 2001; Tort, 2011; Urbinati *et al.*, 2014). Nos peixes, o rim desempenha função semelhante à medula óssea, sendo responsável pela produção de células B, monócitos, macrófagos e granulócitos (Uribe *et al.* 2011; Kim *et al.* 2017). O timo é responsável pela maturação dos linfócitos T (Bowden *et al.* 2005; Barraza *et al.* 2020), já o baço produz linfócitos e plasmócitos (Fiange, 1985; Flajnik, 2018). Os tecidos linfoides associados a mucosa são responsáveis pela produção de componentes celulares, como também, a produção de muco, que contém proteínas da lisozima e proteínas do sistema complemento capazes de combater agentes patogênicos (Hoseinifar e Zoheri, 2016; Dalmo e Bogwald, 2022; Chen *et al.*, 2023).

O sistema complemento é constituído por uma família de mais de 35 glicoproteínas séricas e de membrana, sintetizadas principalmente no fígado, como também, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais (Alegretti *et al.*, 2009; Cruvinel *et al.*, 2010), que participam de respostas inatas (via alternativa) e adquiridas (via clássica) (Holland e Lambris, 2002; Urbinati *et al.*, 2020). Cada componente ativado no sistema complemento tem atividade proteolítica, ativando os elementos seguintes em cascata (Dalmo e Bogwald, 2022). As proteínas do sistema

complemento podem ser encontradas na circulação na sua forma inativa (Biller-Takahashi et al., 2012). Entretanto, é necessário ativá-las para que exerçam suas funções, podendo ser ativada pelas vias: alternativa, clássica e das lectinas (Curvinel et al., 2010).

As vias clássicas e das lectinas utilizam as moléculas C4, seguido da C1 e pôr fim a proteína C2, em conjunto com a fixação de imunoglobulinas. Na via das lectinas, ocorre a ligação a manose, que cliva C2 e C4 a membranas, atuando como C1. A via alternativa é estimulada a partir da ligação de C3 à superfície de patógenos (Bruce e Brown, 2017). A via alternativa é a mais comum e mais importante indicando a importância da resposta inata nos peixes, pois permite a defesa contra microrganismos invasores (Yano, 1996; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014). Na via alternativa, a principal ativadora do sistema, o conjunto de proteínas se ligam através dos PRRs a PAMPs (Cruvinel et al., 2010). A via clássica é ativada quando antígenos são ligados a imunoglobulinas IgG e IgM (Holland e Lambris, 2002; Savan e Sakai, 2009). A via alternativa tem sido analisada em peixes, determinando o tempo em que as proteínas do sistema complemento lisam as hemácias de coelho (Biller-Takahashi et al., 2012; Zanuzzo et al., 2015).

Por sua vez, a lisozima desempenha um papel fundamental na imunidade inata em superfícies mucosas de peixes (Ellis 1999; Saurabh e Sahoo 2008), e importante inibidor de crescimento e invasão de patógenos (Hikima et al., 2003), através da sua ação enzimática lítica, que atua com efeito bactericida em bactérias gram-positivas e gram-negativas (Bayne e Gerwick, 2001). A produção da lisozima é feita por leucócitos, principalmente monócitos e neutrófilos (Ellis, 1999; Murray e Fletcher, 1976), sendo encontrada no muco, saliva e sangue (Saurabh e Sahoo, 2008). As lisozimas são sintetizadas no fígado e em locais extra-hepáticos, no entanto, a cinética de síntese e secreção ainda não está clara (Ragland e Criss, 2017).

A atividade respiratória dos leucócitos ou “burst” oxidativo tem sido frequentemente utilizada para avaliar a resposta imune em peixes (Hampton et al., 2020). Durante a atividade fagocítica de neutrófilos, ocorre o consumo de até 20 vezes de O_2^- , retornando a níveis basais, sendo este processo denominado de “a explosão respiratória” (Di Giulio e Meyer, 2008). Com isso, temos a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), com a redução de O_2^- em H_2O_2 após a redução dos radicais OH^- , H_2O e cloraminas, agindo na destruição de patógenos

(Verlhac *et al.*, 1998; Kolner *et al.*, 2002). Sakai *et al.* (2001) afirmam que peixes alimentados com imunostimulantes em duas dietas demonstram aumento da atividade fagocítica e da atividade respiratória.

A resposta imunológica adquirida ou adaptativa é desencadeada quando o sistema imune inato não elimina uma nova infecção (Cruvinel *et al.*, 2010), possuindo duas características fundamentais: o reconhecimento de antígenos específicos e desenvolvimento da memória imunológica (Gourley *et al.*, 2004). Assim, as células do tipo linfócito B e T desempenham importante papel contra infecção, uma vez que permitem uma rápida eliminação dos patógenos específicos nos peixes (Secombes, 1996; Urbinati *et al.*, 2014; Yada e Tort, 2016). A especificidade do reconhecimento ocorre através de antígenos nas células B e T gerados por genes de recombinação/ativação, conhecidas como receptores BCR e TCR, respectivamente (Nishana e Raghavan, 2012).

No dia a dia do processo produtivo aquícola, sob as condições de manejo, os peixes são submetidos a procedimentos de manejo usando redes, transporte, classificadores, além do aumento de densidade de estocagem (Barton e Iwama, 1991; Sandnes, 1991), entre outros. Nessas condições, o animal tem sua resistência a doenças comprometida (Yada e Tort, 2016), capacidade reduzida de retorno a homeostase, e, em alguns casos, o tornando incapaz de suportar novos desafios (Rauta e Nayak, 2012). Frente a essas condições estressantes, os peixes passam por alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, que os permitem adaptar-se a condições adversas (Yada e Tort, 2016).

Estudos avaliando a relação do estresse (Oliva-Teles, 2012), a inclusão de nutrientes nas dietas (Ciji e Akhtar, 2020) e a resposta imunológica (Islam *et al.*, 2022) em peixes, tem ganhado notoriedade ao longo dos anos. A carga alostática decorrente da ação estressora pode ser descrita como supressora dos processos imunológicos (Yada e Tort, 2016). Rottmann *et al.* (1992) descrevem que o tipo de agente estressor e tempo de duração acarretam alterações imunológicas em peixes, podendo levar a mortalidade. Além disso, Tort (2011) apresenta diferentes respostas para estressores agudo e crônico, enquanto no estressor agudo o padrão de resposta é estimulatória, sendo necessário ativar a resposta imune inata, o estressor crônico mostra efeito supressivo havendo possibilidade de infecção. Embora algumas respostas possam intensificar ou ativar alterações imunológicas, em geral, o estresse crônico apresenta resposta supressiva (Kania e Buchmann,

2018). Como observado por Fast (2008), o estresse crônico de manipulação, comprometeu a competência imunológica com atividade leucocitária diminuída.

O aumento dos níveis de cortisol induzido pelo estresse de manejo tem influência na suscetibilidade a patógenos decorrentes da imunossupressão (Saeji, *et al.*, 2003). Além de elevar os níveis de cortisol circulante, o estresse implica diretamente na redução do crescimento (Barton, 2002; Bernier, 2004; Vijayan, 2010 Tort, 2011); na reprodução (diminuição dos ovários) (De Montalembert *et al.*, 1978), e no comportamento (Johnson *et al.*, 1992).

Como resposta imunológica decorrente de estressores, ocorre modificação em órgãos, por exemplo redução do timo, do baço ou outros órgãos linfáticos (Yada e Tort, 2016). Lin *et al.* (2018) mostraram que o estresse causado pela alta densidade influenciou negativamente a resposta imune, causando apoptose do baço, tornando *Ctenopharyngodon idella* susceptível a patógenos e prejudicando sua sobrevivência. O manejo por perseguição, de ação crônica, realizado por três dias em *Spaurus aurata* gerou diminuição nas atividades do sistema complemento e da lisozima (Sunyer e Tort, 1995). Entretanto, Faria *et al.* (2021) mostram que tanto o estresse crônico como estresse agudo, atenuaram a atividade respiratória dos leucócitos, mas ambas as condições aumentam as respostas de imunidade inata (sistema complemento e lisozima).

5. Estresse e a interação com sistema antioxidante

A descoberta dos radicais livres em sistemas biológicos ocorreu nos anos 50, com estudos iniciados por Rebeca Gerchman, em 1954, voltados para área de doenças ligadas ao envelhecimento, no qual elaborou a hipótese de que radicais de oxigênio poderiam ser gerados como subprodutos de reações enzimáticas (Teixeira, 2010). Posteriormente, em 1956, Denham Harman propôs a Teoria dos Radicais Livres do Envelhecimento, que descrevia que a produção de radicais livres era decorrente de oxidantes ambientais e do metabolismo interno, e que ao longo do tempo causariam danos celulares acarretando problemas estruturais e funcionais (Pomatto e Davies, 2018). Mais tarde, a geração de biomoléculas geradas pelo estresse oxidativo devido ao desequilíbrio no sistema antioxidante,

ganhou áreas como biologia molecular, fisiologia animal e ecologia (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017).

Hoje é de conhecimento que os radicais livres são átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados no seu último orbital, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (HO), entre outros, e são denominados de EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio). Dentre as principais ERNs, temos o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) (Barreiros e David, 2006; Chowdury e Saika, 2020).

O oxigênio molecular é o principal aceptor biológico de elétrons e desempenha funções vitais nas células (Scandalios, 2005), entretanto é possível a formação de radicais livres oriundos do seu metabolismo (Rover Junior *et al.*, 2001). A produção de espécies reativas de oxigênio é um processo natural do metabolismo aeróbico, que ocorre nas mitocôndrias, membranas e citoplasma (Sies, 1997; Biller e Takahashi, 2018), sendo a mitocôndria a principal fonte geradora de radicais livres, a partir da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir de moléculas de glicose e do oxigênio (Barbosa *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2004). Espécies reativas de oxigênio em quantidades limitadas são necessárias para a homeostase celular e sinalização redox (Pisoschi *et al.*, 2021). As principais enzimas envolvidas no processo de formação das EROs são a xantina oxidase, citocromo P450, ciclogênase, a eNOS desacoplada e a NADPH oxidase, sendo a esta a principal enzima formadora do radical superóxido (Fortuno *et al.*, 2005).

Quando o aumento de radicais livres excede a capacidade do organismo combater essas espécies reativas, ocorre o estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2015). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio/nitrogenadas, que contraria os sistemas de defesa do organismo, é conhecida como estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1989; Pisoschi *et al.*, 2021). Sies (1991) descreve o processo de estresse oxidativo como sendo um dano causado pelo desequilíbrio entre agentes oxidantes e o sistema de defesa antioxidante. A produção excessiva de radicais livres durante os processos metabólicos, levou ao desenvolvimento dos mecanismos de defesa, conhecido como sistema antioxidante (Chowdhury e Saika, 2020). O sistema antioxidante é um conjunto de substâncias que protegem as células das consequências destrutivas de oxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1989; Venkatesh, 2001), e são naturalmente produzidos

pelas células (Barreiros e David, 2006; Van der Oost *et al.*, 2003). Um antioxidante é uma substância que mesmo em baixas concentrações, possui capacidade de retardar a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídeos, membrana celular e outros componentes celulares (Oliva-Teles, 2012; Aklakur, 2018; Hoseinifar *et al.*, 2020).

As enzimas antioxidantes compõem a principal linha de defesa aos componentes oxidantes do sistema (Pisoschi *et al.*, 2021). A defesa antioxidante no organismo ocorre de acordo com a função biológica e em duas categorias: sistema primário - impede ou retarda a formação de radicais livres (Yin *et al.*, 2011; Pisoschi, 2015); sistema secundário - reparo das lesões causadas pelas EROs, remoção dos danos DNA e reparo das membranas celulares (Abdalla, 1993; Bianchi e Antunes, 1999). O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (Bianchi e Antunes, 1999).

O sistema antioxidante também pode ser dividido em dois grupos, enzimático e não - enzimático. O sistema de defesa enzimático é o primeiro a agir contra as EROs, e trata-se de conjunto de enzimas endógenas, que inclui a Superóxido Dismutase (SOD), enzima mais abundante nas células aeróbicas (McCord e Fridovich, 1969), tem como função biológica catalisar a dismutação do principal formador de EROS, o radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ formado nos peroxissomos e nas mitocôndrias, convertendo em H_2O_2 e O_2 que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas. Sem a função da SOD, esse radical livre leva à formação de radicais hidroxila (OH) (Li *et al.*, 2016), sendo estes as EROs mais reativas e prejudiciais (Hoseinifar *et al.*, 2020). Nenhum antioxidante é capaz de prevenir a disponibilidade HO, só é possível inibir sua formação ou reparar os danos causados por sua ação (Schieber e Chande, 2014). Existem dois tipos principais de SOD, a CuZnSOD presente no citoplasma, e a MnSOD localizada nas mitocôndrias (Halliwell e Gutteridge, 1989; Barbosa *et al.*, 2010).

A glutathione peroxidase (GPX) atua na decomposição do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, ocorrendo no citosol e mitocôndria, enquanto a catalase CAT, que decompõe peróxido de hidrogênio produzindo água e moléculas oxigênio (Pisoschi *et al.*, 2021) ocorre nos eritrócitos, fígado, baço e rins (Oliveira e Schoffen, 2010). Já a glutathione s-transferase (GST) que atua na detoxificação intracelular, é considerada o principal grupo de proteínas solúveis no fígado (Chasseaund *et al.*, 1979).

A GSH, composto não enzimático, opera em ciclos entre a forma glutathiona oxidada GSSH e GR-glutathiona reduzida (Oliveira e Schoffen, 2010), tem alta atividade no fígado e moderada atividade no coração, pulmão e cérebro, e baixa atividade nos músculos (Halliwell e Gutteridge, 1989)

O grupo não-enzimático é formado por substâncias antioxidantes que provém da dieta (Hoseinifar *et al.*, 2020), são exemplos: vitaminas, minerais e compostos fenólicos (Barbosa *et al.*, 2010). A obtenção de forma exógena viabiliza a oxidação pelos radicais livres, sendo convertido em substâncias menos reativas (Cheng *et al.*, 2018). A vitamina C, conhecida como ácido ascórbico, o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, são micronutrientes essenciais para redução do estresse oxidativo (Narra *et al.*, 2015). A vitamina C atua ligando-se à EROs presentes nas membranas celulares dos organismos, repondo radical livre através da doação de H^+ , juntamente com a vitamina E (Barbosa *et al.*, 2010), atuando também na regeneração da Vitamina E após a interação com radicais livres (Mishra *et al.*, 2015). Além disso, a interação dessas moléculas é importante para inibir a peroxidação lipídica e nos danos oxidativos ao DNA (Bianchi e Antunes, 1999). Os produtos oriundos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído MDA e aldeídos insaturados, alteram a atividade de muitas proteínas (Hoseinifar *et al.*, 2020), além disso, também podem modificar diretamente aminoácidos promovendo a formação de carbonila que altera a estrutura e função de proteínas (Hematyar *et al.*, 2019).

Como descrito anteriormente, devido a atual situação da pesca e a crescente pressão sobre a produção aquícola, tem aumentado os esforços de pesquisa para encontrar soluções para as principais doenças que acometem este setor, bem como a origem dessas patologias. Biller e Takahashi (2018) descrevem que produção de radicais livres são fundamentais para modular o sistema imunológico, embora o estresse oxidativo limite as respostas imunológicas. Com isso, Biller-Takahashi *et al.* (2015) afirmaram que a imunidade em juvenis de pacu foi limitada pelo estresse oxidativo, resultado encontrado devido as baixas concentrações de enzimas antioxidantes no grupo controle, evidenciando a tentativa de evitar a produção de radicais livres.

Em estudo realizado com *Leuciscus cephalus*, Aniagu *et al.* (2006) demonstraram que a natação repetitiva oriunda do manejo excessivo diminuiu a

capacidade antioxidante para as enzimas SOD e GSH, em comparação com o grupo controle.

Estudos avaliando a qualidade da água, mais especificamente a temperatura, mostraram que o estresse causado pela elevação da temperatura afetou as concentrações das enzimas do sistema antioxidante em *Takifugu obscurus* causando apoptose de células sanguíneas (Cheng *et al.*, 2015). O estresse agudo causado pela restrição alimentar induziu o estresse oxidativo, medido através do marcador malondialdeído plasmático em *Salmo salar* (Olsen *et al.*, 2002). Faria *et al.* (2021) avaliaram o efeito do estresse agudo e crônico por perseguição com rede tipo puçá, em juvenis de pacu, e encontraram que ambas as condições causaram estresse oxidativo no fígado, e aumentou a atividade da SOD, em contrapartida prejudicou a CAT e GPx.

6. Suplementação nutricional para manutenção da saúde nos peixes

Ao longo dos anos, com o crescimento da aquicultura, têm sido adotadas tecnologias e sistemas de produção que acarretam efeitos negativos nos peixes (Rehman, *et al.*, 2017; Aklakur, 2018). Com isso, a procura por estratégias para reduzir o estresse e as consequências negativas, bem como, aumentar o bem-estar e a saúde de peixes durante o ciclo de cultivo, vem crescendo e ganhando cada vez mais notoriedade para grupos pesquisas (Lieke, 2020; Dawood, 2021). Ainda, a nutrição tem papel muito importante na gestão da saúde, através da modulação das respostas imunes e resistência a doenças, de modo a evitar a dependência do uso de antibióticos e reduzir perdas econômicas (Kiron, 2012; Oliva -Teles, 2012). A introdução de substâncias para atenuar o estresse dos peixes através da alimentação é um dos métodos mais eficazes para melhorar o bem-estar (Herrera *et al.*, 2017). A utilização de ração de qualidade, com uso de aditivos que estimulem a saúde dos peixes, é uma prática de manejo ecologicamente sustentável, sendo um importante pilar da aquicultura (Conceição *et al.*, 2012; Aklakur, 2018).

Para garantir uma produção sustentável têm sido adotadas abordagens dietéticas como uma forma promissora de aumentar as respostas imunológicas e antioxidantes em peixes (Hoseinifar *et al.*, 2020), auxiliando no controle da disseminação de doenças (Aklakur, 2018). As rações para aquicultura são

formuladas com ingredientes que, quando administrados ao animal, destinam-se a suprir suas necessidades nutricionais para desempenhar suas funções fisiológicas normais, incluindo a manutenção de um sistema imunológico (Encarnação, 2016; Ramos-Pinto *et al.*, 2021). Uma nutrição adequada é essencial para evitar animais com deficiência, manter o desempenho zootécnico e manter a saúde normal (Oliveira-Teles, 2012).

A suplementação dietética é feita com a inclusão de ingredientes funcionais para alimentação, contendo propriedades imunoestimulantes, antioxidantes e antiestresse, para potencializar o desempenho dos animais cultivados (Gupta *et al.*, 2021). Vários aditivos são utilizados para modular o efeito do estresse e preparar o animal para superar os desafios, sejam eles de caráter físico, químico ou biológico (Dawood e Esteban, 2018). Alguns desses incluem plantas medicinais como chá verde *Camellia sinensis* (Hwang *et al.*, 2013), dragão verde *Astragalus membranaceus* (Syahiddah *et al.*, 2015); nim *Azadirachta indica* (Logambal e Michael, 2000); babosa *Aloe vera* (Zanuzzo *et al.*, 2017; Assis e Urbinati, 2020), gengibre *Zingiber officinale* (Haghighi e Rohani, 2013); o β -glucano (Mello *et al.*, 2019; Khanjani e Sharifina, 2021; Sabioni *et al.*, 2019; Raissy *et al.*, 2022); vitaminas como vitamina E (Jiang *et al.*, 2009; El-Sayed e Izquierdo, 2022); vitamina C (Dawood e Koshio, 2018; Ghafarifarsani *et al.*, 2022); minerais como zinco (Kazemi *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2021), selênio (Biller-Takahashi *et al.*, 2015; Mechlaoui *et al.*, 2019), manganês (Liu *et al.*, 2023; Nie *et al.*, 2016).

Apesar da diversidade de aditivos utilizados nas rações para peixes, a escolha permanece restrita devido ao seu impacto nas funções imunológicas e antioxidantes (Hoseinifar *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021). Conhecidos como imunoestimulantes, estes suplementos têm por objetivo promover a ativação dos mecanismos de defesa inatos e adaptativos (Saurabh e Sahoo, 2008). O uso desses imunoestimulantes é um método eficaz de aumentar a imunocompetência e a resistência a doenças dos peixes (Sakai, 1999). Os imunoestimulantes também têm efeitos adicionais, como aumentar o crescimento e as taxas de sobrevivência de peixes sob estresse (Bai *et al.*, 2015).

Estudos sobre imunoestimulantes em peixes estão se desenvolvendo e muitos compostos bioativos estão atualmente em uso na indústria da aquicultura. Dependendo das características imunomoduladoras do suplemento e função no animal, podemos classificá-lo em duas categorias distintas: imunonutrientes e

imunoaditivos (Gupta *et al.*, 2021). A imunonutrição tem como principal função a adição de compostos na dieta que ativem respostas imunes do organismo, obtendo maior grau de proteção para o animal (Kiron, 2012), já os imunoaditivos referem-se a ingredientes não nutritivos, mas com atributos imunoestimulantes e bioatividade conhecida (EFSA, 2005). Várias estratégias têm sido adotadas para evitar respostas negativas de estresse, dentre elas a suplementação da dieta com aminoácidos (AA) para melhorar a resistência ao estresse (Herrera *et al.*, 2017; Assencio-alcudia *et al.*, 2019). Nesse sentido, essa estratégia tem sido amplamente estudada em várias espécies de peixes como tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2013; truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Lepage *et al.*, 2002); carpa comum *Cyprinus carpio* (Hoseini *et al.*, 2012); sargo legítimo *Diplodus sargus* (Saavedra *et al.*, 2002); carpa mrigala *Cirrhinus mrigala* (Tejpal *et al.*, 2009); dourada de Wuchang *Megalobrama amblycephala* (Habte-Tsion *et al.*, 2016); linguado senegalês *Solea senegalensis* (Costas *et al.*, 2011); dourada *Sparus aurata* (Tseng *et al.*, 2023) e corvina legítima *Argyrosomus regius* (Salamanca *et al.*, 2020).

6.1 Aminoácidos

De acordo com a classificação de imunoestimulantes, os aminoácidos pertencem à categoria de imunonutrientes (Kiron, 2012). A inclusão de aminoácidos tem sido amplamente adotada, pois além da importância para manutenção de tecidos, estes compostos afetam diretamente o funcionamento de órgãos importantes para as respostas imunológicas (Hoseini *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021; Li e Wu, 2021).

Neste contexto, muitos trabalhos têm sido propostos com intuito de avaliar a o efeito dos aminoácidos em peixes. Estudos avaliaram que a inclusão de aminoácidos atenua os efeitos adversos do estresse em peixes, causado por alterações na qualidade de água (Kumar *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2020), alta densidade (Abdel-Tawwab 2012; Magalhães *et al.*, 2020), transporte (Hoseini *et al.*, 2022; Herrera *et al.*, 2020), por enriquecer a ração, bem como atuar como substrato energético (Ciji e Akhtar, 2021). Além disso, as concentrações de aminoácidos circulantes têm sido usadas como indicador de estresse (Wilson, 2002; Aragão *et*

et al., 2008), e sob essas condições, o metabolismo de aminoácidos é afetado, devido à síntese de proteína relacionada com a resposta ao estresse (Aragão *et al.*, 2008; Costas *et al.*, 2008). Os aminoácidos e seus metabólitos possuem funções específicas no organismo, sendo peças-chaves para várias vias, como crescimento, imunidade e resistência a doenças (Conceição *et al.*, 2012; Hosseini *et al.*, 2019).

Os aminoácidos (AA) são definidos como biomoléculas que apresentam os grupos carboxila (^-COOH) e grupo amina ($^-NH_3$), ligados por um único carbono, denominado de carbono alfa (Ballantyne, 2001). Em linhas gerais, são blocos de construção das proteínas, sendo classificados nutricionalmente como essenciais e não essenciais (Li *et al.*, 2009). Tradicionalmente, os aminoácidos são classificados em dois grupos: essenciais (indispensáveis) e não essenciais (dispensáveis) (NRC, 2011; NASEM, 2021). Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo não é capaz de sintetizá-los, neste caso, para obtê-los é necessário o fornecimento através da dieta, já os aminoácidos não essenciais são sintetizados pelo próprio organismo (Wilson, 2002). Existem na natureza mais de 200 aminoácidos, mas nas proteínas podemos encontrar apenas 20 aminoácidos principais (Craig *et al.*, 2017). Atualmente, dez aminoácidos são considerados como essenciais para peixes, e o seu fornecimento na dieta é de extrema importância (Li *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2021). De acordo com NRC (2011), os aminoácidos essenciais são: Arginina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano e Valina; e os aminoácidos não-essenciais são Alanina, Asparagina, Aspartato, Cisteína, Glicina, Glutamina, Glutamato, Prolina, Tirosina e Serina.

Estudos realizados em peixes mostram a vasta capacidade dos aminoácidos em regular as principais vias metabólicas, que incluem crescimento, reprodução e resposta imune (Li *et al.*, 2009). Por sua vez, a arginina é um dos aminoácidos mais versáteis, atuando como precursor na síntese de proteínas e na produção de óxido nítrico, que serve como composto nocivo para bactérias, inibindo a replicação e proliferação de vírus e protegendo contra infecções (Buentello e Gatlin, 2001), importante também, na regulação endócrina e funções reprodutivas (Yao *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2015).

A histidina é um dos AA mais abundante na albumina de peixes (Szebedinszky e Gilmour 2002; NRC, 2011), fundamental para o crescimento e desenvolvimento, na produção de células sanguíneas e para manutenção das células do sistema nervoso (Khan *et al.*, 2018). Estudos indicam que a inclusão de

histidina e seus derivados atuam como antioxidantes podendo atenuar o estresse oxidativo (Wade e Tucker, 1998; Belia *et al.*, 2008), além de estimular a resposta imunológica (Jiang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019).

Os aminoácidos de cadeia ramificada BCAA: Leucina, Isoleucina e valina, têm função importante na regulação da síntese proteica no músculo esquelético (Herrera *et al.*, 2019). O aumento da atividade proteolítica foi observado em peixes estressados, juntamente com a diminuição das concentrações plasmáticas de BCAA (Vijayan *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2008; Espe *et al.*, 2021).

A fenilalanina é um AA essencial muito importante para o crescimento os peixes (Feng *et al.*, 2017), podendo ser convertida em tirosina pela fenilalanina hidroxilase dependente de tetraidrobiopterina no fígado e rins (Li *et al.*, 2009), cofator essencial para a síntese de óxido nítrico (Shi *et al.*, 2004). A tirosina é um importante precursor de hormônios e neurotransmissores, incluindo a triiodotironina (T3), tiroxina (T4), epinefrina, norepinefrina, dopamina e melanina (Herrera *et al.*, 2017). A adição de tirosina nas dietas para peixes pode reduzir a necessidade de fenilalanina (Li *et al.*, 2009; Salamanca *et al.*, 2020). Pesquisas avaliando a suplementação de fenilalanina e tirosina em ração para peixes, mostraram que ela reduz deformidades esqueléticas e mortalidades causada por estresse (Saavedra *et al.*, 2010), além de estimular a síntese e liberação de dopamina (Costas *et al.*, 2012).

A treonina é considerada o terceiro AA limitante após a lisina e a metionina em peixes (Ramos-Pinto *et al.*, 2021), responsável por sintetizar os AA glicina e serina, que por sua vez, são responsáveis pela formação do tecido muscular (Habte-Tsion *et al.*, 2015). Baixos níveis de treonina na ração para peixes, podem afetar a imunidade (Li *et al.*, 2007), resistência a doenças (Dong *et al.*, 2018), desempenho zootécnico (Yaghoubi *et al.*, 2017).

Como descrito anteriormente, a lisina é um dos AA limitantes em ingredientes usados em rações para peixes, principalmente se utilizados ingredientes de origem vegetal em substituição a farinha de peixes (Mai *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Hoseini *et al.* (2020) descrevem a importância da arginina na ureagênese, função imunológica, defesa antioxidante, eixo somatotrópico, resposta ao estresse e desintoxicação de amônia em peixes. Além disso, a lisina é essencial para a síntese do composto carnitina, responsável pelo transporte dos ácidos

graxos de cadeia longa até as mitocôndrias para a produção de energia (Zhou *et al.*, 2007; Hoseini *et al.*, 2020).

6. 1. 1 Metionina

A metionina é considerada o primeiro AA limitante em muitas dietas para peixes, principalmente em rações que contêm altos níveis de fontes de proteína vegetal, como farelo de soja, farelo de algodão e farelo de amendoim (Mai *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2013). Comumente encontrada nas formas D e L, sendo que a maioria dos animais utilizam os isômeros de D e L-metionina de formas semelhantes e eficientes (Robinson *et al.*, 1978). Estudos que avaliaram a absorção e desempenho de ambas as formas de metionina demonstraram não haver diferença (Kim *et al.*, 1992; Kim, 1997; Sveier *et al.*, 2001; Pinel *et al.*, 2022).

Além de participar da síntese de proteínas, a metionina atua na sinalização molecular que regula o metabolismo energético, o sistema imunológico e antioxidante em peixes (Wang *et al.*, 2023), atuando como precursora da cisteína, que por sua vez, é necessária para a síntese de glutatona e taurina (Li *et al.*, 2007). Li *et al.* (2009) descrevem que apesar de diferenças quantitativas entre espécies, as vias da metionina transmetilação, remetilação e transsulfuração estão presentes no fígado, tanto de mamífero como de peixes (Grimble e Grimble, 1998). A metionina contém enxofre, devido a isto, pertence a classificação de aminoácidos sulfurados AAS, juntamente com cisteína, homocisteína e taurina (Wu *et al.*, 2004; Metayer *et al.*, 2008). O enxofre é essencial no metabolismo da transsulfuração, pois permite a formação da glutatona a partir da homocisteína, portando a metionina é um elemento essencial para produção da glutatona (Azeredo *et al.*, 2017).

Herrera *et al.* (2019) afirmam que as concentrações de glutatona podem ser afetadas pela deficiência de metionina na alimentação de peixes sob condições de estresse. Efeitos deletérios devido à deficiência de metionina na dieta, incluindo retardo no crescimento, redução do consumo de ração, desenvolvimento intestinal prejudicado e degeneração em peixes (Espe *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009). A inclusão de metionina na dieta afeta o estado imunológico dos peixes, melhorando a resposta imune humoral (Rubin *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2017).

Ao longo dos anos, a exigência de metionina tem sido avaliada para várias espécies de peixes, de acordo com o seu estágio de vida. Wang *et al.* (2023) concluíram que a exigência dietética da metionina em peixes varia entre 0,49% a 2,5%, sendo influenciada pela espécie, estágio de vida e formas de metionina. Exigência de metionina em pompano dourado *Trachinotus blochii* na fase de berçário foi de 11,6% a 11,8% (Ebeneezar *et al.*, 2020). Para juvenis de robalo legítimo *Dicentrarchus labrax* exigência de 1,3% de metionina (Thebault *et al.*, 1985); em corvina amarela *Pseudosciaena crocea* exigência de 1,73% metionina na dieta (Mai *et al.*, 2006); em juvenis de linguado *Paralichthys olivaceus* valores foram de 1,49% (Alam *et al.*, 2000); robalo amarelo *Seriola quinqueradiata* determinada em 1,11% (Ruchimat *et al.*, 1997); garoupa *Epinephelus coioides* exigência de 1,31% (Luo *et al.*, 2005); em juvenis peixe pedra coreano *Sebastes schlegeli* achados de 1,37 % (Yan *et al.*, 2007); em juvenis de bagre-africano *Clarias gariepinus* determinada a exigência de 3,2% (Fagbenro *et al.*, 1999); em juvenis de carpa comum *Cyprinus carpio* exigência de 2,13% (Schwarz *et al.*, 1998); em juvenis de carpa mrigala *Cirrhinus mrigala* a exigência foi de 1% (Ahmed *et al.*, 2003); juvenis de pompano *Trachinotus ovatus* valor encontrado de 2,46% (Niu *et al.*, 2013); juvenis de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* valores entre 1,69% e 1,91 % (Bae *et al.*, 2011); juvenis bacalhau *Sparus macrocephalus* exigência de 1,17% (Zhou *et al.*, 2011); *Myxocyprinus asiaticus* exigência de 1,41% (Chu *et al.*, 2014); juvenis de tilápia Moçambique *Sarotherodon mossambicus* valor entre 0,53 a 0,86% (Jackson e Capper, 1982); juvenis de peixe-gato *Pseudobagrus ussuriensis* 1,43% (Wang *et al.*, 2016); juvenis de achigã *Micropterus salmoides* exigência de 1,22% (Chen *et al.*, 2010); juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* exigência de 2,48% (Rodrigues *et al.*, 2022).

Alguns estudos relatam a eficiência da metionina na inclusão de dietas para peixes. Su *et al.* (2021) encontrou resultados significativos da inclusão de metionina em carpa capim *Ctenopharyngodon idella* alimentados durante 70 dias com aumento da resistência a doenças e melhoria da função imune intestinal. Na mesma espécie, Ji *et al.* (2022) observaram que dietas deficientes em metionina, causaram acúmulo de lipídeo hepático. Em bijupirá *Rachycentron canadum*, Wang *et al.* (2016) afirmaram que dietas deficientes em metionina administradas durante 70 dias, poderiam suprimir o crescimento e diminuir a síntese lipídica. Para mesma

espécie, estudos demonstram que dietas contendo o nível ideal de metionina, estimulou a ingestão alimentar e diminuição na deposição de gordura nos órgãos viscerais (Nguyen *et al.*, 2018; Chi *et al.*, 2020).

A metionina possui várias características que a tornam um aminoácido relevante durante os mecanismos de resposta da imunidade inata (Azeredo *et al.*, 2017). A inclusão de metionina na concentração de 6,1 g kg⁻¹ estimulou a atividade das enzimas SOD, GPx e MDA, já as concentrações 9,7 e 11,8 g kg⁻¹ causaram maior atividade da lisozima e atividade respiratória dos leucócitos (Elmada *et al.*, 2016). Em carpa rohu *Labeo rohita*, a inclusão de 9 g kg⁻¹ estimulou as atividades da lisozima, respiratória dos leucócitos e hemolítica do sistema complemento, entretanto não houve diferença nas respostas do sistema antioxidante, embora o grupo controle, deficiente em metionina, apresentou altas concentrações de MDA (Noor *et al.*, 2021). Peres - Jimenez *et al.* (2012) mostraram que a inclusão de metionina na ração para dourada *Sparus aurata*, durante 30 dias, aumentou a atividade hepática da SOD, semelhante ao encontrado por Kuang *et al.* (2012) em carpa comum *Cyprinus carpio* após 60 dias consumindo ração suplementada com metionina. Neste caso, houve aumento dos níveis de GST, CAT e SOD, como também promoveu a resposta imune com parâmetros: lisozima, atividade respiratória dos leucócitos e sistema complemento.

6.1.2 Triptofano

O triptofano é um aminoácido essencial com grande versatilidade e funcionalidade para importantes vias do sistema biológico (Moffet *et al.*, 2003), que vão desde o sistema neuroendócrino até o sistema imune em vertebrados (Hoseini *et al.*, 2019), além do seu papel principal na síntese de proteína (Mohanty *et al.*, 2014). Atua como precursor para a síntese do neurotransmissor serotonina 5 – hidroxitriptamina ou 5 HT, melatonina e quinurenina, além dos compostos como o ácido quinurênico, ácido quinolínico e niacina (Hoseini *et al.*, 2019). A conversão do triptofano em serotonina ocorre em duas etapas: a conversão do triptofano em 5 – hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase e a descarboxilação do 5-triptofano em serotonina, a vitamina B6 é essencial para esta última etapa (Le Floch *et al.*, 2011).

Na aquicultura, tem sido amplamente investigada a inclusão de triptofano para otimizar dietas para muitas espécies de peixes. O conhecimento das exigências nutricionais é fundamental para melhorar o aproveitamento dos nutrientes da dieta (Pianesso *et al.*, 2015). Além disso, fornecer níveis ideais de triptofano é extremamente importante para o crescimento e bem-estar (Sahu *et al.*, 2020), pois pesquisas demonstram o efeito do triptofano na modulação do comportamento de peixes, respostas ao estresse e sistema antioxidante (Ciji *et al.*, 2015; Hoseini *et al.*, 2019). Atualmente, pesquisas sugerem uma ampla variação do nível de triptofano entre 0,3 a 1,3% para várias espécies, entretanto, as concentrações podem variar, dependendo das condições de criação (Hoseini *et al.*, 2019; Ciji *et al.*, 2021). No entanto, a deficiência de AA causa prejuízos na síntese de proteína e outros processos fisiológicos (Wu, 2013). Posto *et al.* (1983) determinaram que a exigência de triptofano para juvenis de *Salmo gairdneri* é de 0,63%, enquanto Walton *et al.* (1986) encontraram a exigência para mesma espécie de 0,25%. A exigência de triptofano para juvenis de perca gigante *Lates calcarifer* foi de 0,41% (Coloso *et al.*, 1992), enquanto Akiyama *et al.* (1985) encontraram a exigência para salmão *Oncorhynchus keta* de 0,16%; em juvenis de bagre americano *Ictalurus punctatus* a exigência encontrada foi de 0,12% (Wilson *et al.*, 1978); a exigência para juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* foi de 2,9 % (Zaminhan *et al.*, 2018); em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* a exigência foi de 2,5 a 3,4% (Pianesso *et al.*, 2015); para alevinos de bagre australiano *Heteropneustes fossilis* foi encontrada a exigência de 3,2% (Ahmed, 2012); a exigência para alevinos de carpa rohu *Labeo rohita* foi de 0,36 a 0,38% (Fatma Abidi e Khan, 2010); para alevinos de catla *Catla catla* a exigência dietética foi de 2,1 a 2,5% (Zehra e Khan, 2015); para alevinos de pacu *Piaractus mesopotamicus* a exigência foi de 0,14%, juvenil 0,12% e adultos 0,16% (Khan *et al.*, 2020). Ainda para *P. mesopotamicus* na fase de terminação, Rodrigues *et al.* (2022) encontraram a exigência de 10,42%; em juvenis de peixe leite *Chanos chanos* a exigência encontrada foi de 3,1% (Colosso *et al.*, 1992). A exigência de triptofano para alevinos de tambaqui *Colossoma macropomum* encontrada foi de 0,32% (Bomfim *et al.*, 2020) e para as espécies curimatá *Prochilodus lineatus* e matrinxã *Brycon amazonicus* foram encontradas as exigências de 0,67% e 1,02%, respectivamente (Bicudo *et al.*, 2009).

Resultados de pesquisas têm elucidado que o triptofano dietário estimula a recuperação pós estresse em peixes (Basic *et al.*, 2013; Lepege *et al.*, 2002). Esta suplementação pode ser uma estratégia nutricional promissora para o manejo da saúde na aquicultura (Herrera *et al.*, 2017). Como demonstrado em juvenis de truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), a suplementação de triptofano reduziu a agressividade (Hseu *et al.*, 2003); reduziu o canibalismo e deformidades causadas pelo estresse (Höglund *et al.*, 2007); neutralizou o aumento do cortisol induzido após o estresse (Lepage *et al.*, 2003); reduziu o cortisol após a indução de estresse por diminuição do nível de água (Lepage *et al.*, 2002) e diminuiu o comportamento agressivo após teste de residente/intruso (Winberg *et al.*, 2001). Entretanto, algumas espécies não apresentam melhora no desempenho fisiológico (Hosseini *et al.*, 2020; Cerqueira *et al.*, 2020).

A suplementação com triptofano em dietas para peixes é uma importante alternativa a ser tomada durante o cultivo, pois durante o manejo pode haver elevação prolongada do cortisol (Vijayan *et al.*, 1996), afetando negativamente o metabolismo e crescimento (Tejpal *et al.*, 2009), ingestão de alimentos (Hoglund *et al.*, 2007), imunidade (Gonzalez-Silveira, *et al.*, 2018), entre outros.

Azeredo *et al.* (2016) avaliaram o efeito da suplementação com triptofano em peixes criados em alta densidade, e observaram uma promissora capacidade de neutralizar a imunossupressão, com aumento de resposta nos parâmetros imunológicos, como relatado por Azeredo *et al.*, (2019) em linguado senegalês (*Solea senegalensis*), em que a inclusão de triptofano promoveu otimização do estado imunológico e resistência a doenças em peixe sob altas densidades.

Em estudos realizados com carpa *Labeo rohita*, a suplementação com triptofano em dietas para animais que passaram por alterações no ambiente aquático promoveu aumento da atividade antioxidante com elevação da CAT e SOD (Ciji *et al.*, 2015). Ainda na mesma espécie, Kumar *et al.* (2018) avaliaram a suplementação em peixes submetidos a elevação da temperatura, e concluíram que a suplementação mitigou os efeitos do estresse induzido, havendo melhora nos parâmetros imunológicos.

O tempo de administração do triptofano na dieta para peixes é um fator a ser observado (Hosseini *et al.*, 2019). Peixes alimentados com triptofano durante sete dias apresentaram aumento da atividade serotoninérgica e diminuição do cortisol basal, entretanto, após o estresse induzido por exposição ao ar e perseguição, não

teve efeito significativo no cortisol (Martins *et al.*, 2013). Basic *et al.* (2013) observaram que a administração de triptofano durante sete dias em salmão (*Salmo salar*) não teve diferença significativa do cortisol basal e pós estresse. Lepage *et al.* (2003) mostraram que a alimentação de peixes com dietas contendo triptofano durante sete dias resultou em baixos níveis de cortisol após o estresse, no entanto, a oferta da ração suplementada para os grupos 3 dias e 28 dias, não diminuiu o cortisol pós estresse. Contudo, outros estudos também mostram que a alimentação de curto prazo de dietas contendo triptofano promove recuperação das respostas primárias e secundárias após o agente estressor (Herrera *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2022).

7. Modelo experimental

O modelo experimental utilizado neste estudo é um peixe pertencente família Characidae, que inclui os peixes nativos de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileira (Urbinati *et al.*, 2013), o pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmber, 1887, que tem como característica morfológica o corpo coberto de escamas, coloração cinza com graduações de verde e amarelo, pertence a categoria de peixes redondos, por ter corpo prensado, em formato de disco e comprimido nas laterais (Ribeiro *et al.*, 2017). Sua distribuição ocorre naturalmente na América do Sul, nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975; Franceschini *et al.*, 2013). Seu comportamento alimentar é preferencialmente herbívoro com preferência a frugívoros, com consumo de folhas, frutos e resíduos de vegetais, tolerando altos níveis de fibra na dieta (Urbinati *et al.*, 2020). Apresenta precocidade e rusticidade (Stech *et al.*, 2010), além de fácil adaptação à alimentação natural em ambiente de cultivo (Galetti *et al.*, 2008). Atualmente, o pacu vem sendo amplamente cultivado desde países como a Argentina, até a região centro-oeste do Brasil (Cian *et al.*, 2017), devido ao seu alto ganho de peso, manejo simples e notável plasticidade alimentar, além de ser muito valorizado para fins comerciais (Jomori *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2022).

O pacu é uma das espécies de água doce mais estudadas e utilizadas como modelo biológico em diversas pesquisas voltadas para área da fisiologia de peixes no Brasil (Urbinati *et al.*, 2020). Estudos avaliando a influência de agentes estressores e o uso de dietas suplementas tem demonstrados diversos resultados

que corroboram com o conhecimento sobre a espécie. Ale *et al.* (2021) demonstraram resultados satisfatórios para a espécie com a indução de um ambiente com baixa temperatura, sob os parâmetros bioquímicos e metabólicos. Avaliando os aspectos imunológicos, Biller-Takahashi *et al.* (2014) verificaram que pacus após o desafio bacteriano apresentaram aumento da atividade respiratória dos leucócitos e da atividade hemolítica do sistema complemento, e a suplementação com β -glucana aumentou gradualmente os níveis de lisozima. A exposição de juvenis de pacu a agente estressores crônico e agudo afetou negativamente os componentes do sistema imunológico inato, como também causou estresse oxidativo no fígado, e modulou a atividade antioxidante (Faria *et al.*, 2021). Biller-Takahashi *et al.* (2015) demonstraram que parâmetros imunológicos em pacu foram afetados pelo estresse oxidativo, enquanto Neyrão *et al.* (2021) afirmaram que o estresse oxidativo prejudicou a atividade antioxidante das enzimas glutathione peroxidase, catalase e glutathione reduzida.

Em estudos, avaliando a suplementação dietética para alimentação de pacu, Zanuzzo *et al.* (2017) utilizaram *Aloe vera* como imunoestimulante e observaram efeito positivo nos parâmetros imunológicos, assim como, Assis e Urbinati (2020) observaram que a inclusão de *Aloe vera* durante 7 dias na ração reduziu efeitos do estresse e estimulou a imunidade inata, além de proteger parâmetros metabólicos.

O efeito adjuvante da inclusão de levamisol foi avaliado por Biller-Takahashi *et al.* (2016) no pacu promovendo aumento na resposta imunológica, e Pahor Filho *et al.*, (2017) avaliaram a mesma inclusão durante 15 dias, e obtiveram a modulação dos níveis de cortisol em resposta de estresse e melhor desempenho imunológico contra a infecção por *Aeromonas hydrophila* na mesma espécie.

Com isso, para garantir resultados satisfatórios na produção de peixes nativos, neste caso o pacu, são necessárias as boas práticas de manejo e adoção de estratégias mitigadoras que diminuam o efeito negativo dos agentes estressores decorrentes do processo produtivo, bem como encorajar estudos científicos para área da fisiologia de peixes.

8. Referências

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI**, São Paulo, v.26, p.141-164, 1993.

ABDEL-MAGEID, Afaf D. et al. The extent to which lipopolysaccharide modulates oxidative stress response in Mugil cephalus juveniles. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 1, p. 426-431, 2020.

ABDEL-TAWWAB M. Effects of dietary protein levels and rearing density on growth performance and stress response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **International Aquatic Research** 4: 3–1, 2012.

ABIDI, Shabihul; KHAN, Mukhtar A. Dietary tryptophan requirement of fingerling rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), based on growth and body composition. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 5, p. 700-709, 2010.

ABIMORAD, Eduardo Gianini et al. Dietary digestible lysine requirement and essential amino acid to lysine ratio for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 4, p. 370-377, 2010.

ABÓS, Beatriz; BAILEY, Christyn; TAFALLA, Carolina. Adaptive Immunity. In: **Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection**. Cham: Springer International Publishing, p. 105-140, 2022.

ABREU, S. J.; URBINATI, E. C. Physiological responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 36, p. 519-524, 2006.

ACERETE, L. et al. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v. 237, n. 1-4, p. 167-178, 2004.

AFONSO, Luis OB. Identifying and managing maladaptive physiological responses to aquaculture stressors. In: **Fish Physiology**. Academic Press, p. 163-191, 2020.

AHMED, Imtiaz; KHAN, Mukhtar A.; JAFRI, A. K. Dietary methionine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Aquaculture international**, v. 11, p. 449-462, 2003.

AHMED, Imtiaz. Dietary amino acid L-tryptophan requirement of fingerling Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), estimated by growth and haemato-biochemical parameters. **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, p. 1195-1209, 2012.

AHMED, Nesar; THOMPSON, Shirley. The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. **Science of the Total Environment**, v. 652, p. 851-861, 2019.

AKIYAMA, Toshio; Arai, Shigeru; Murai, Takeshi. Tryptopahn Requirements of Chum Salmon Fry. *Bulletin of the Japanese of Scientific Fisheries*. v 51, p 1005 – 1008, 1985.

AKLAKUR, Mohammad. Natural antioxidants from sea: A potential industrial perspective in aquafeed formulation. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 385-399, 2018.

ALAM, Md Shah et al. Methionine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 31, n. 4, p. 618-626, 2000.

ALE, Analía et al. Low temperature stress in a cultured fish (*Piaractus mesopotamicus*) fed with *Pyropia columbina* red seaweed-supplemented diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 829-839, 2021.

ALEGRETTI, Ana Paula et al. O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 49, p. 276-287, 2009.

ALVES, Angélica Priscila do Carmo et al. Nile tilapia fed insect meal: Growth and innate immune response in different times under lipopolysaccharide challenge. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 2, p. 529-540, 2021.

ANIAGU, S. O., Day, N., Chipman, J. K., Taylor, E. W., Butler, P. J., & Winter, M. J. Does exhaustive exercise result in oxidative stress and associated DNA damage in the chub (*Leuciscus cephalus*)? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47, 616–623, 2006.

ARAGÃO C, Corte-Real J, Costas B, Dinis MT, Conceicao L. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids* 34: 143–148, 2008.

ASENCIO-ALCUDIA, Gloria et al. Stressors due to handling impair gut immunity in meagre (*Argyrosomus regius*): the compensatory role of dietary L-tryptophan. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 547, 2019.

ASHLEY, Paul J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n. 3-4, p. 199-235, 2007.

ASHRAF, Syed Amir et al. Fish-based bioactives as potent nutraceuticals: Exploring the therapeutic perspective of sustainable food from the sea. **Marine drugs**, v. 18, n. 5, p. 265, 2020.

ASSIS, R. W. S.; Urbinati, E. C. Physiological activity of Aloe vera in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with *Aeromonas hydrophila*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 46, p. 1421-1430, 2020.

AZEREDO, Rita et al. Dietary tryptophan induces opposite health-related responses in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reared at low or high stocking densities with implications in disease resistance. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 508, 2019.

AZEREDO, Rita et al. Dietary tryptophan supplementation modulates immune status and disease resistance in senegalese sole, *Solea senegalensis*, reared at low or high density. In: **Frontiers in Marine Science Conference Abstract: IMMR| International Meeting on Marine Research (Lausanne)**. 2016.

AZEREDO, Rita et al. Neuroendocrine and immune responses undertake different fates following tryptophan or methionine dietary treatment: tales from a teleost model. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1226, 2017.

AZEREDO, R. et al. Local immune response of two mucosal surfaces of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*, fed tryptophan-or methionine-supplemented diets. **Fish & shellfish immunology**, v. 70, p. 76-86, 2017.

BAE, J.-Y. et al. Reevaluation of dietary methionine requirement by plasma methionine and ammonia concentrations in surgically modified rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 3, p. 887-891, 2011.

BAI SC, Katya K, Yun H (2015) Additives in aquafeed: an overview. In: Davis A (ed.) *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, pp. 171–202. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition

BALLANTYNE, J. S. Amino acid metabolism. **Fish physiology**, v. 20, p. 77-107, 2001.

BARBOSA K BF, Costa NMB, Alfenas RDCG, De Paula SO, Minim VP, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição* 23:629-643, 2010.

BARMAN, Debtanu et al. Immunostimulants for aquaculture health management. **J. Mar. Sci. Res. Dev**, v. 3, n. 3, p. 1-11, 2013.

BARRAZA, Felipe et al. Revisiting the teleost thymus: current knowledge and future perspectives. **Biology**, v. 10, n. 1, p. 8, 2020.

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

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517–525, 2002.

BARTON, B. A., Peter, R. E. and Paulencu, C. R. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement,

transport, and stocking. **Canadian Journal of Fish. Aquatics Science**. 37, 805–811, 1980.

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

BASIC, Dean et al. Short-and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 388, p. 8-13, 2013.

BAYNE C. J; GERWICK L. The acute phase response and innate immunity of fish. **Developmental Comparative Immunology** v. 25: 725-743, 2001.

BELLIA, F.; Amorini, A.M.; La Mendola, D.; Vecchio, G.; Tavazzi, B.; Giardina, B.; Di Pietro, V.; Lazzarino, G.; Rizzarelli, E. New glycosidic derivatives of histidine-containing dipeptides with antioxidant properties and resistant to carnosinase activity. **Europe Journal Medicine. Chemistry**, 43, 373–380, 2008.

BERNARD, C. LA constitution physico-chimique du milieu intérieur [The physicochemical constitution of the environment within]. *Revue scientifique*, 2, 670 – 672, 1872.

BERNIER, Nicholas J.; BEDARD, Nicole; PETER, Richard E. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. **General and comparative endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 230-240, 2004.

BIANCHI M. L. P; ANTUNES L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12 p.123-30, 1999.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BICUDO, A. J. A; CYRINO, José Eurico Possebon. Estimating amino acid requirement of Brazilian freshwater fish from muscle amino acid profile. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 6, p. 818-823, 2009.

BILLER-TAKAHASHI J.D; TAKAHASHI L.S; MARZOCCHI-MACHADO, C. M; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74, n. 3, p. 698-703, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E. C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1483-1495, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, Jaqueline D. et al. The immune system is limited by oxidative stress: dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune

defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, n. 1, p. 360-367, 2015.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; MONTASSIER, H. J.; TAKAHASHI, L. S.; URBINATI, E. C. Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 164-173, 2016.

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, 2018.

BILLER, Jaqueline Dalbello; TAKAHASHI, Leonardo Susumu; URBINATI, Elisabeth Criscuolo. Under stress conditions, pacu *Piaractus mesopotamicus* modulates the metabolic allostatic load even after *Dolops carvalhoi* challenge to maintain self-protection mechanisms. **Fish physiology and biochemistry**, v. 46, p. 1309-1321, 2020.

BILLER, Jaqueline Dalbello et al. Lysozyme activity as an indicator of innate immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) when challenged with LPS and *Streptococcus agalactiae*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 50, 2021.

BIRNIE-GAUVIN, Kim et al. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928-942, 2017.

BOERRIGTER, Jeroen G. J. et al. Effects of density, PVC-tubes and feeding time on growth, stress and aggression in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 8, p. 2553-2568, 2016.

BOLASINA, Sergio Néstor. Stress response of juvenile flounder (*Paralichthys orbignyanus*, Valenciennes 1839), to acute and chronic stressors. **Aquaculture**, v. 313, n. 1-4, p. 140-143, 2011.

BOMFIM, Marcos Antonio Delmondes et al. Digestible tryptophan requirement for tambaqui (*Colossoma macropomum*) fingerlings. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, 2020.

BOONSTRA, R. Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. **Functional Ecology**. 27, 11–23, 2013.

BOWDEN T, Cook P, Rombout J. Development and function of the thymus in teleosts. **Fish Shellfish Immunology** 19(5):413–427, 2005.

BOYD, Claude E.; MCNEVIN, Aaron A.; DAVIS, Robert P. The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. **Food security**, v. 14, n. 3, p. 805-827, 2022.

BREITBURG, Denise. Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment, on coastal fishes and fisheries. **Estuaries**, v. 25, n. 4, p. 767-781, 2002.

BRETT, J.R. Implications of assessment of environmental stress. In: Larkin, P.A. (ed.) The investigation of fish-power problems. H.R. MacMillan Lectures in Fisheries, University of British Columbia, Vancouver, Canada, pp 69-83, 1958.

BRICKNELL, Ian; DALMO, Roy A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 19, n. 5, p. 457-472, 2005.

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

BUENO, Guilherme W. et al. Implementation of aquaculture parks in Federal Government waters in Brazil. **Reviews in Aquaculture**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2015.

BUENTELLO, J.A., Gatlin III, D.M., 2001. Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri*. J. Aquat. Anim. Health 13, 194–201, 2001.

CARNEIRO, William Franco et al. Diets containing *Arthrospira platensis* increase growth, modulate lipid metabolism, and reduce oxidative stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to ammonia. **Aquaculture**, v. 547, p. 737402, 2022.

CANNON, W. B. (1935). Stresses and strains of homeostasis. American Journal of the Medical Sciences, 189, 13–14, 1935.

CERQUEIRA, Marco et al. How tryptophan levels in plant-based aquafeeds affect fish physiology, metabolism and proteome. **Journal of proteomics**, v. 221, p. 103782, 2020.

CHASSEAUND, L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferase in the chemicals carcinogens and other electrophilic agents. Adv. Cancer Res. 29, 175-274, 1979.

CHEN, NaiSong et al. Assessment of dietary methionine requirement in largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Journal of Fisheries of China**, v. 34, n. 8, p. 1244-1253, 2010.

CHEN, Shiyu et al. Ferulic acid alleviates lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture**, v. 532, p. 735972, 2021.

CHENG, Chang-Hong et al. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. **Journal of Thermal Biology**, v. 53, p. 172-179, 2015.

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

CHI, Shuyan et al. Dietary methionine affects growth and the expression of key genes involved in hepatic lipogenesis and glucose metabolism in cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 123-133, 2020.

CHISTE, Bruna Milke et al. Risk assessment and acute toxicological effects of atrazine on Nile tilapia larvae after stress. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 1, p. 23-29, 2020.

CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Oxidative stress in fish: a review. **Journal of Scientific Research**, v. 12, n. 1, p. 145-160, 2020.

CHU, Z. J. et al. Optimal dietary methionine requirement of juvenile Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 253-264, 2014.

CIJI, Alexander et al. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. **Aquaculture research**, v. 46, n. 8, p. 2013-2024, 2015.

CIJI, Alexander et al. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. **Aquaculture research**, v. 46, n. 8, p. 2013-2024, 2015.

CIJI, Alexander; AKHTAR, Mohammad S. Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2190-2247, 2021.

CLEARWATER, S. J.; PANKHURST, N. W. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. **Journal of fish biology**, v. 50, n. 2, p. 429-441, 1997.

COLOSO, Relicardo M.; TIRO, Lillian B.; BENITEZ, Lita V. Requirement for tryptophan by milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 10, p. 35-41, 1992.

CONCEIÇÃO, Luis EC et al. Dietary nitrogen and fish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 119-141, 2012.

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 205–23, 2004.

COOK, Katrina V. et al. Fish out of water: how much air is too much?. **Fisheries**, v. 40, n. 9, p. 452-461, 2015.

COSTAS B, Aragão C, Mancera JM, Dinis MT, Conceição LEC. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquacult Res.* (2008) 39:1–9, 2008.

COSTAS, Benjamín et al. Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 6, p. 838-847, 2011.

COSTAS, Benjamín et al. Effects of dietary amino acids and repeated handling on stress response and brain monoaminergic neurotransmitters in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 161, n. 1, p. 18-26, 2012.

COUTINHO, F. et al. Effects of dietary methionine and taurine supplementation to low-fish meal diets on growth performance and oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 479, p. 447-454, 2017.

CRAIG, Steven R. et al. Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. 2017.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.

DALMO, Roy Ambli; BØGWALD, Jarl. Innate Immunity. In: **Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection**. Cham: Springer International Publishing, p. 31-103, 2022.

DAVIS, M. W. and Schreck, C. B. Responses by Pacific halibut to air exposure: lack of correspondence among plasma constituents and mortality. **Transactions of the American Fisheries Society**. 134, 2005.

DAWOOD, Mahmoud AO. Nutritional immunity of fish intestines: Important insights for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 642-663, 2021.

DAWOOD, Mahmoud AO; KOSHIO, Shunsuke. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 334-350, 2018.

DAWOOD, Mahmoud AO; KOSHIO, Shunsuke; ESTEBAN, Maria Ángeles. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 4, p. 950-974, 2018.

DE MELLO, Mariana Maluli Marinho et al. β -glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 93, p. 1076-1083, 2019.

DE MONTALEMBERT, G., JALABERT, B. BRY, C. Precocious induction of maturation and ovulation in northern pike (*Esox lucius*). **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 18: 969-976, 1978.

DI GIULIO RT, Meyer JN. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio RT, Hinton DE, editors. *The Toxicology of Fishes*. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group. p. 273–324, 2008.

DIANA, James S. et al. Responsible aquaculture in 2050: valuing local conditions and human innovations will be key to success. **BioScience**, v. 63, n. 4, p. 255-262, 2013.

DONG, Yu-Wen et al. Dietary threonine deficiency depressed the disease resistance, immune and physical barriers in the gills of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under infection of *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 72, p. 161-173, 2018.

EBENEEZAR, Sanal et al. Optimum dietary methionine requirement of juvenile silver pompano, *Trachinotus blochii* (Lacepede, 1801). **Animal Feed Science and Technology**, v. 268, p. 114592, 2020.

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

ELLIS, Tim et al. Cortisol and finfish welfare. **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, p. 163-188, 2012.

ELMADA, C. Z. et al. The effect of dietary methionine on growth, antioxidant capacity, innate immune response and disease resistance of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Aquaculture nutrition**, v. 22, n. 6, p. 1163-1173, 2016.

EL-SAYED, Abdel-Fattah M.; IZQUIERDO, Marisol. The importance of vitamin E for farmed fish—A review. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 2, p. 688-703, 2022.

ENCARNAÇÃO, Pedro. Functional feed additives in aquaculture feeds. In: **Aquafeed formulation**. Academic Press, 2016. p. 217-237.

ESPE, Marit et al. Leucine did not stimulate growth and accretion in either stressed or unstressed Atlantic salmon. **Aquaculture Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 2459-2467, 2021.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 3, n. 6, p. 223, 2005.

FAGBENRO, O. A.; BALOGUN, A. M.; FASAKIN, E. A. Dietary methionine requirement of the African catfish, *Clarias gariepinus*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 8, n. 4, p. 47-54, 1999.

FAO - Food and Aquaculture Organization of the United Nations. National Aquaculture Sector Overview: Brazil. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Text by Sulicy, F.M. In: FAO Fisheries Division (online) Rome, Italy, 2020.

FAO - Food and Aquaculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: Towards Blue Transformation, SOFIA-ONU, Rome, Italy, 2022.

FARIA, C. F. P. dos Reis Martinez, C. B., Takahashi, L. S., de Mello, M. M. M., Martins, T. P., & Urbinati, E. C. 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.

FARIAS, Francisco Ramos. Sobre o conceito de estresse. **Arquivos Brasileiros de Psicologia**, v. 37, n. 4, p. 97-105, 1985.

FAST, Mark D. et al. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. **Fish & shellfish immunology**, v. 24, n. 2, p. 194-204, 2008.

FENG, L. et al. Methionine hydroxy analogue prevents oxidative damage and improves antioxidant status of intestine and hepatopancreas for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 6, p. 595-604, 2011.

FENG, Lin et al. Protective role of phenylalanine on the ROS-induced oxidative damage, apoptosis and tight junction damage via Nrf2, TOR and NF-κB signalling molecules in the gill of fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 60, p. 185-196, 2017.

FIANGE R, Nilsson S. The fish spleen: structure and function. *Experientia* 41(2):152–158, 1985.

FILGUEIRAS, Julio Cesar; HIPPERT, Maria Isabel Steinherz. A polêmica em torno do conceito de estresse. **Psicologia: ciência e profissão**, v. 19, p. 40-51, 1999.

FIRDAUS-NAWI, M.; ZAMRI-SAAD, M. Major components of fish immunity: a review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 39, n. 4, 2016.

FLAJNIK M. F. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 18(7):438–453, 2018.

FORTUNO, Ana et al. Oxidative stress and vascular remodelling. **Experimental physiology**, v. 90, n. 4, p. 457-462, 2005.

FRANCESCHINI, Lidiane et al. Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus* x *Piaractus brachypomus*) cultured in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 407-414, 2013.

GALETTI M.; DONATTI C.I.; PIZO M.A.; GIACOMINI H.C. Big fish are the best: seed dispersal of *Bactris glaucescens* by the pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in the Pantanal, Brazil. *Biotropica*, v. 40, n. 3, p. 386-389, 2008.

GALHARDO, Leonor; OLIVEIRA, Rui Filipe. Psychological stress and welfare in fish. **Annual Review of Biomedical Sciences**, p. 1-20, 2009.

GALLO, Valentina Patrizia; CIVININI, Annalena. Survey of the adrenal homolog in teleosts. **International Review of Cytology**, p. 89-187, 2003.

GHAJARIFARSANI, Hamed et al. Effects of dietary vitamin C, thyme essential oil, and quercetin on the immunological and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 553, p. 738053, 2022.

GIRI, Sib Sankar et al. Use of bacterial subcellular components as immunostimulants in fish aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 474-492, 2018.

GODOY, M. P. Peixes do Brasil: subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Franciscana, v. 1 – 4, 1975.

GONZALEZ-SILVERA, Daniel et al. Effects of the dietary tryptophan and aspartate on the immune response of meagre (*Argyrosomus regius*) after stress. **Fishes**, v. 3, n. 1, p. 6, 2018.

GOURLEY TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16:323–33, 2004.

GREEN K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *53*:108-110, 2004.

GRIMBLE, Robert F.; GRIMBLE, George K. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. **Nutrition**, v. 14, n. 7-8, p. 605-610, 1998.

GUO, Huming; DIXON, Brian. Understanding acute stress-mediated immunity in teleost fish. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 2, p. 100010, 2021.

GUPTA, Akriti et al. Immunomodulation by dietary supplements: A preventive health strategy for sustainable aquaculture of tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2364-2394, 2021.

H. Yin, L. Xu, N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5944-5972, 2011.

HABTE-TSION, Habte-Michael et al. A deficiency or an excess of dietary threonine level affects weight gain, enzyme activity, immune response and immune-related

gene expression in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 2, p. 439-446, 2015.

HABTE-TSION, Habte-Michael et al. Threonine modulates immune response, antioxidant status and gene expressions of antioxidant enzymes and antioxidant-immune-cytokine-related signaling molecules in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & shellfish immunology**, v. 51, p. 189-199, 2016.

HAGHIGHI, Masoud; ROHANI, Mostafa Sharif. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of medicinal Plant and Herbal therapy research**, v. 1, n. 1, p. 8-12, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. Oxford University Press, 1989

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.

HAMPTON, Leah M. Thornton; JEFFRIES, Marlo K. Sellin; VENABLES, Barney J. A practical guide for assessing respiratory burst and phagocytic cell activity in the fathead minnow, an emerging model for immunotoxicity. **MethodsX**, v. 7, p. 100992, 2020.

HEMATYAR N, Rustad T, Sampels S, Kastrup Dalsgaard T. 2019. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Aquac Res.* 50 (5):1393–1403, 2019.

HERRERA, M. et al. Physiological and metabolic effects of a tryptophan-enriched diet to face up chronic stress in meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture**, v. 522, p. 735102, 2020.

HERRERA, Marcelino et al. Effects of amino acid supplementations on metabolic and physiological parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) under stress. **Fish physiology and biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 591-602, 2017.

HERRERA, Marcelino; MANCERA, Juan Miguel; COSTAS, Benjamín. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 447, 2019.

HERRERA, Marcelino; MANCERA, Juan Miguel; COSTAS, Benjamín. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 447, 2019.

HIKIMA, Jun-ichi; HIRONO, Ikuo; AOKI, Takashi. The lysozyme gene in fish. **Aquatic genomics: steps toward a great future**, p. 301-309, 2003.

HÖGLUND E.; SORENSEN, C.; BAKKE, M.J.; NILSSON, G.E. & ØVERLI, Ø. Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pretreatment with dietary L-tryptophan. *Br J Nutr* 97:786–789, 2007.

HOGGLUND, Erik et al. Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 786-789, 2007.

HOLLAND, M.C.; LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, v.12, p.399-420, 2002.

HOLLAND, M.C.; LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, v.12, p.399-420, 2002.

HOSEINI SM, Perez-Jimenez A, Costas B, Azeredo R, Gesto M. Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. *Rev Aquacult.* (2019) 11:3–24. doi: 10.1111/raq.1 2223

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Effects of dietary tryptophan supplementation and stocking density on growth performance and stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 519, p. 734908, 2020.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Effects of rearing density and dietary tryptophan supplementation on intestinal immune and antioxidant responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 528, p. 735537, 2020.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future researches. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 4, p. 2091-2108, 2020.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. A suplementação dietética de glicina alivia o estresse induzido pelo transporte na carpa comum, *Cyprinus carpio*. **Aquicultura**, v. 551, p. 737959, 2022.

HOSEINI, Seyyed Morteza; HOSSEINI, Seyed Abbas; SOUDAGAR, Mohammad. Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 1419-1426, 2012.

HOSEINIFAR, Seyed Hossein et al. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 29, n. 2, p. 198-217, 2020.

HSEU, J.R.; LU, F.I.; SU, H.M.; WANG, L.S.; TSAI, C.L. & HWANG, P.P. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 218:251–263, 2003.

HUNTINGFORD, F. A. et al. Current issues in fish welfare. **Journal of fish biology**, v. 68, n. 2, p. 332-372, 2006.

HWANG JH, Lee SW, Rha SJ, Yoon HS, Park ES, Han KH et al. (2013) Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture International* 21: 525–538.

ISLAM, Md Jakiul; KUNZMANN, Andreas; SLATER, Matthew James. 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.

IVERSEN, M. FINDSTAD, B.; MCKINLEY, R. S.; ELIASSEN, R. A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqu-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 221, p. 549-566, 2003.

IWAMA, George K.; AFONSO, Luis OB; VIJAYAN, Mathilakath M. Stress in fish. **Annals-New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 304-310, 1998.

JACKSON, A. J.; CAPPER, B. S. Investigations into the requirements of the tilapia *Sarotherodon mossambicus* for dietary methionine, lysine and arginine in semi-synthetic diets. **Aquaculture**, v. 29, n. 3-4, p. 289-297, 1982.

JANEWAY C. A. Medzhitov R. Innate immunity recognition. *Annu Rev Immunology*; 20:197-216, 2002.

Jl, Ke et al. Optimal methionine supplementation improved the growth, hepatic protein synthesis and lipolysis of grass carp fry (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture**, v. 554, p. 738125, 2022.

Jl, Seung-Cheol et al. Dietary medicinal herbs improve growth performance, fatty acid utilization, and stress recovery of Japanese flounder. **Fisheries Science**, v. 73, p. 70-76, 2007.

JIA, Peng et al. Effects of dietary methionine levels on the growth performance of juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 37, n. 2, p. 217-226, 2013.

JIANG, J. et al. Influence of glutamine and vitamin E on growth and antioxidant capacity of fish enterocytes. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 409-414, 2009.

JIANG, J.; SHI, D.; ZHOU, X. Q.; HU, Y.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, W. D.; ZHAO, Y. In vitro and in vivo protective effect of arginine against lipopolysaccharide induced inflammatory response in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 42, p. 457– 464, 2015.

JIANG, Wei-Dan et al. Changes in integrity of the gill during histidine deficiency or excess due to depression of cellular anti-oxidative ability, induction of apoptosis, inflammation and impair of cell-cell tight junctions related to Nrf2, TOR and NF-κB signaling in fish. **Fish & shellfish immunology**, v. 56, p. 111-122, 2016.

JOHNSON, Elizabeth O. et al. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 2, p. 115-130, 1992.

JOMORI, Rosângela Kiyoko et al. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.

KANIA, Per W.; BUCHMANN, Kurt. Complement Activation in Fish with Emphasis on MBL/MASP. In: **Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 279-300.

KAZEMI, Esmail et al. Effect of different dietary zinc sources (mineral, nanoparticulate, and organic) on quantitative and qualitative semen attributes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 515, p. 734529, 2020.

KHALIL, Magdy T. et al. Antioxidant defense system alternations in fish as a bio-indicator of environmental pollution. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 21, n. 3, p. 11-28, 2017.

KHAN, A. M. et al. Histidine requirement of cultivable fish species: A review. **Oceanogr. Fish. Open Access J**, v. 8, p. 1-7, 2018.

KHAN, Kifayat U. et al. Whole-body amino acid pattern of juvenile, preadult, and adult pacu, *Piaractus mesopotamicus*, with an estimation of its dietary essential amino acid requirements. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 51, n. 1, p. 224-234, 2020.

KHANJANI, Mohammad Hossein; SHARIFINIA, Moslem; GHAEDI, Gholamreza. β -glucan as a promising food additive and immunostimulant in aquaculture industry. **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 3, p. 817-827, 2021.

KIM YK, Lee JS, Jung JW, Hikima J, Ohtani M, Jang HB, Nho SW, Cha IS, Park SB, Lee JH, Aoki T, Jung TS. Characterization of a specific monoclonal antibody against immunoglobulin light kappa/L1 chain in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immun* 60:88–96, 2017.

KIM, Kyu-II. Re-evaluation of protein and amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 151, n. 1-4, p. 3-7, 1997.

KIM, Kyu-II; KAYES, Terrence B.; AMUNDSON, Clyde H. Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 101, n. 1-2, p. 95-103, 1992.

KIRON, Viswanath. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.

KO, Ju-Young et al. Protective effect of aquacultured flounder fish-derived peptide against oxidative stress in zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 1, p. 320-323, 2014.

KOKOU, Fotini et al. Efeitos de níveis dietéticos graduados de concentrado de proteína de soja suplementado com metionina e fosfato sobre as respostas imunes e antioxidantes da dourada (*Sparus aurata* L.). **Imunologia de peixes e mariscos**, v. 64, p. 111-121, 2017.

KOLLNER, Bernd et al. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) how can environmental influences be detected?. **Toxicology letters**, v. 131, n. 1-2, p. 83-95, 2002.

KUANG S-Y, Xiao W-W, Feng L, Liu Y, Jiang J, Jiang W-D, Hu K, Li S-H, Tang L, Zhou X-Q. 2012. Effects of graded levels of dietary methionine hydroxy analogue on immune response and antioxidant status of immune organs in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian. *Fish Shellfish Immunol.* 32(5):629–636, 2012.

KUMAR S, Sahu NP, Pal AK, Subramanian S, Priyadarshi H, Kumar V. High dietary protein combats the stress of *Labeo rohita* fingerlings exposed to heat shock. *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 1005–1019, 2011.

KUMAR, Prem et al. Dietary L-Tryptophan potentiates non-specific immunity in *Labeo rohita* fingerlings reared under elevated temperature. **Journal of thermal biology**, v. 74, p. 55-62, 2018.

LE FLOC'H, Nathalie; OTTEN, Winfried; MERLOT, Elodie. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino acids**, v. 41, p. 1195-1205, 2011.

LEPAGE, O.; TOTTMAR, O. & WINBERG, S. Elevated dietary intake of Ltryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 205:3679–3687, 2003.

LEPAGE, Olivier et al. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 20, p. 3589-3599, 2003.

LEPAGE, Olivier; TOTTMAR, Olof; WINBERG, Svante. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 23, p. 3679-3687, 2002.

LI, Huatao et al. The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through inhibiting mitochondria and calcium ion involved pathways in fish erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 92, p. 126-140, 2016.

LI, Min et al. Effects of dietary curcumin on growth performance, lipopolysaccharide-induced immune responses, oxidative stress and cell apoptosis in snakehead fish (*Channa argus*). **Aquaculture Reports**, v. 22, p. 100981, 2022.

LI, P., Yin, Y.L., Li, D., Kim, S.W., Wu, G.Y. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*. 98, 237-252, 2007.

LI, Peng et al. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 237-252, 2007.

LI, Peng et al. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino acids**, v. 37, p. 43-53, 2009.

LI, Xinyu; ZHENG, Shixuan; WU, Guoyao. Nutrição e funções dos aminoácidos em peixes. **Aminoácidos em Nutrição e Saúde: Aminoácidos na Nutrição de Animais de Companhia, Zoológicos e de Fazenda**, p. 133-168, 2021. See More

LI, Xinyu; ZHENG, Shixuan; WU, Guoyao. Nutrição e funções dos aminoácidos em peixes. **Aminoácidos em Nutrição e Saúde: Aminoácidos na Nutrição de Animais de Companhia, Zoológicos e de Fazenda**, p. 133-168, 2021.

LIEKE, Thora et al. Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 943-965, 2020.

LIM, Han Kyu; HUR, Jun Wook. Effects of acute and chronic air exposure on growth and stress response of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 18, n. 1, p. 143-151, 2018.

LIN, Wang et al. Long-term crowding stress causes compromised nonspecific immunity and increases apoptosis of spleen in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 540-545, 2018.

LIU, Dongwu et al. Effect of Dietary Manganese on the Growth Performance, Lipid Metabolism, and Antioxidant Capacity in the Post-Larval Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Animals**, v. 13, n. 8, p. 1310, 2023.

LOGAMBAL, S. M.; Michael, R. Immunostimulatory effect of azadirachtin in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 38, pp 1092-1096, 2000.

LUBCHENCO, Jane; HAUGAN, Peter M. The future of food from the sea. In: **The Blue Compendium: From Knowledge to Action for a Sustainable Ocean Economy**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 1-13.

LUO, Zhi et al. Dietary L-methionine requirement of juvenile grouper *Epinephelus coioides* at a constant dietary cystine level. **Aquaculture**, v. 249, n. 1-4, p. 409-418, 2005.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.

MACHADO, Marina et al. Dietary methionine supplementation improves the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status following long-term feeding on fishmeal-free diets. **British Journal of Nutrition**, v. 124, n. 9, p. 890-902, 2020.

MACHADO, Marina et al. Tryptophan Modulatory Role in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Immune Response to Acute Inflammation under Stressful Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12475, 2022.

MAGALHÃES, Cláudia et al. Protein changes as robust signatures of fish chronic stress: a proteomics approach to fish welfare research. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2020.

MAHBOOB, Shahid. Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Life Science Journal**, v. 10, p. 336-347, 2013.

MAI K, Wan J, Ai Q, Xu W, Liufu Z, Zhang L, Zhang C, Li H. Dietary methionine requirement of juvenile yellow croaker *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture* 251:564–572, 2006.

MARQUES, Flavielle Blanco et al. Overview of Brazilian aquaculture production. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 12, p. 4838-4845, 2020.

MARTINS CI, Silva PI, Costas B, Larsen BK, Santos GA, Conceição LE. The effect of tryptophan supplemented diets on brain serotonergic activity and plasma cortisol under undisturbed and stressed conditions in grouped-housed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 400: 129–134, 2013.

MARTINS, Maurício Laterça et al. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, p. 31-39, 2006.

MCCORD J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprien). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055, 1969.

MECHLAOUI, Marwa et al. Effects of different dietary selenium sources on growth performance, liver and muscle composition, antioxidant status, stress response and expression of related genes in gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 507, p. 251-259, 2019.

MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY JR, Charles. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MELLO, Mariana Maluli Marinho et al. β -glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 93, p. 1076-1083, 2019.

MÉTAYER, S., Seiliez, I., Collin, A., Duchêne, S., Mercier, Y., Geraert, P.-A., Tesseraud, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. **19**, 207-215, 2008.

MÉTAYER, Sonia et al. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 207-215, 2008.

MIDWOOD, Jonathan D. et al. Stress and food deprivation: linking physiological state to migration success in a teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 23, p. 3712-3718, 2016.

MISHRA V, Shah C, Mokashe N, Chavan R, Yadav H, Prajapati J. 2015. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J Agric Food Chem*. 63(14):3615–3626, 2015.

MIZUTA, Darien D.; FROEHLICH, Halley E.; WILSON, Jono R. The changing role and definitions of aquaculture for environmental purposes. **Reviews in Aquaculture**, 2022.

MOFFETT, John R.; NAMBOODIRI, MA ARYAN. Tryptophan and the immune response. **Immunology and cell biology**, v. 81, n. 4, p. 247-265, 2003.

MOHANTY, Bimal et al. Amino acid compositions of 27 food fishes and their importance in clinical nutrition. **Journal of amino acids**, v. 2014, 2014.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.9, p.211-268, 1999.

MONIRUZZAMAN, Mahammed et al. Melatonin ameliorates lipopolysaccharide induced brain inflammation through modulation of oxidative status and diminution of cytokine rush in *Danio rerio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 103983, 2022.

NARRA MR, Rajender K, Rudra Reddy R, Rao JV, Begum G. 2015. 20. The role of vitamin C as antioxidant in protection of biochemical and haematological stress induced by chlorpyrifos in freshwater fish *Clarias batrachus*. *Chemosphere* 132:172–178, 2015

NAYAK, S. K. et al. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 4, p. 394-399, 2008.

NAYLOR, Rosamond L. et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1017-1024, 2000.

NEYRAO, Iuri Moraes et al. Modulation of immunity and hepatic antioxidant defense by corticosteroids in pacu (*Piaractus Mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 260, p. 111025, 2021.

NGUYEN, Minh Van et al. The role of dietary methionine concentrations on growth, metabolism and N-retention in cobia (*Rachycentron canadum*) at elevated water temperatures. **Aquaculture nutrition**, v. 25, n. 2, p. 495-507, 2019.

NIE, Jia-quan et al. Effects of dietary manganese sources and levels on growth performance, relative manganese bioavailability, antioxidant activities and tissue mineral content of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* L.). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 5, p. 1402-1412, 2016.

NISHANA M, Raghavan SC (2012) Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* 137:271–281, 2012.

NIU, J. et al. Quantitative dietary methionine requirement of juvenile golden pompano *T. rachinotus ovatus* at a constant dietary cystine level. **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 5, p. 677-686, 2013.

NOOR, Zohaib et al. Dietary supplementations of methionine improve growth performances, innate immunity, digestive enzymes, and antioxidant activities of rohu (*Labeo rohita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 451-464, 2021.

NOVOA, Beatriz et al. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & shellfish immunology**, v. 26, n. 2, p. 326-331, 2009.

NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Animal Nutrition Series. Washington, 2011.

OGNJANOVIĆ, Branka I. et al. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 191-197, 2010.

OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. **Journal of fish diseases**, v. 35, n. 2, p. 83-108, 2012.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLSEN, Rolf Erik et al. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. **Fish physiology and biochemistry**, v. 26, p. 211-221, 2002.

ORTUÑO, Jesús; ESTEBAN, M. Angeles; MESEGUER, José. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 84, n. 1-2, p. 17-27, 2002.

PAHOR-FILHO, E.; CASTILLO, A. S. C.; PEREIRA, N. L.; PILARSKI, F. URBINATI, E. C. Levamisole enhances the innate immune response and prevents increased cortisol levels in stresses pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, v 65, p. 95-102, 2017.

PAKHIRA, Chitra et al. Stress responses in rohu, *Labeo rohita* transported at different densities. **Aquaculture Reports**, v. 2, p. 39-45, 2015.

PAN, Fei-Yu et al. Methionine hydroxy analogue improves intestinal immunological and physical barrier function in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 64, p. 122-136, 2017.

PANKHURST, N. W. Reproduction and development. In: **Fish physiology**. Academic Press, 2016. p. 295-331.

PEIXE, B. R. Anuário Peixe BR da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura from [https://www. peixebr. com. br/anuario-2021/](https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/)**. Accessed, v. 20, 2022.

PEREIRA-DA-SILVA, Elyara Maria; OLIVEIRA, Ricardo Henrique Franco. Physiological responses of lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000) to air exposure. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3268-3271, 2017.

PERES H, Rubio VC, Oliva-Teles A, Pe A. 2012. The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr*. 108 (7): 1202–1209, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Amalia et al. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 506-516, 2012.

PIANESSO, D. et al. Determination of tryptophan requirements for juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) and its effects on growth performance, plasma and hepatic metabolites and digestive enzymes activity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 172-183, 2015.

PIANESSO, D. et al. Determination of tryptophan requirements for juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) and its effects on growth performance, plasma and hepatic metabolites and digestive enzymes activity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 172-183, 2015.

PINEL, Karine et al. Are the Main Methionine Sources Equivalent? A Focus on DL-Methionine and DL-Methionine Hydroxy Analog Reveals Differences on Rainbow

Trout Hepatic Cell Lines Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 2935, 2022.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112891, 2021.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POMATTO, Laura CD; DAVIES, Kelvin JA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 420-430, 2018.

Portz, D. E., Woodley, C. M. and Cech, J. J., Jr. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 16, 125–170, 2006

PORTZ, Donald E.; WOODLEY, Christa M.; CECH, Joseph J. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 16, p. 125-170, 2006.

POSTON, Hugh A.; RUMSEY, Gary L. Factors affecting dietary requirement and deficiency signs of L-tryptophan in rainbow trout. **The Journal of nutrition**, v. 113, n. 12, p. 2568-2577, 1983.

POTTINGER, Thomas G. The stress response in fish-mechanisms, effects and measurement. **Fish welfare**, p. 32-48, 2008.

Qi C, Han F, Wang X, Xu C, Huang Z, Li E et al. High protein diet alleviates the high pH stress in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture* 516: 734523, 2020.

QIN, Zhendong et al. Antibacterial activity of erythrocyte from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with phagocytosis and reactive oxygen species generation. **Fish & shellfish immunology**, v. 92, p. 331-340, 2019.

RAGLAND, Stephanie A.; CRISS, Alison K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006512, 2017.

RAISSY, Mehdi et al. The effect of dietary combined herbs extracts (oak acorn, coriander, and common mallow) on growth, digestive enzymes, antioxidant and immune response, and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 546, p. 737287, 2022.

RAMOS-PINTO, Lourenço et al. Dietary histidine, threonine, or taurine supplementation affects gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune status. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1193, 2021.

RAUTA, P. R, NAYAK, B.; Das, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology Letters* v. 148:23 –3, 2012.

REHMAN, Saima et al. Stress in aquaculture hatcheries: source, impact and mitigation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 10, p. 3030-3045, 2017.

REID, Connor H. et al. An updated review of cold shock and cold stress in fish. **Journal of Fish Biology**, v. 100, n. 5, p. 1102-1137, 2022.

REID, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C* 120, 1–27, 1998.

RESENDE, Daniela et al. Stress response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed plant-based diets supplemented with swine blood hydrolysates. **Aquaculture Reports**, v. 30, p. 101600, 2023.

RIBEIRO, F. M. et al. Alimentação e nutrição de pacu (*Piaractus mesopotamicus*): revisão de literatura. **Nutritime**, v. 14, n. 1, p. 4936-4943, 2017.

ROBINSON, Edwin H. et al. Utilization of dietary sulfur compounds by fingerling channel catfish: L-methionine, DL-methionine, methionine hydroxy analogue, taurine and inorganic sulfate. **The Journal of Nutrition**, v. 108, n. 12, p. 1932-1936, 1978.

RODRIGUES, Andressa Tellechea et al. Estimation of the ideal dietary essential amino acid pattern for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in the later-juvenile growth phase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 284, p. 115146, 2022.

RODRIGUES, Andressa Tellechea et al. Estimation of the ideal dietary essential amino acid pattern for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in the later-juvenile growth phase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 284, p. 115146, 2022.

ROMERO, L. M. and Reed, J. M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough?. *Comp. Biochem. Physiol. A* 140, 73–79, 2005.

ROTTMANN, R. W.; FRANCIS-FLOYD, R.; DURBOROW, R. **The role of stress in fish disease**. Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center, 1992.

ROTTMANN, R. W.; FRANCIS-FLOYD, R.; DURBOROW, R. **The role of stress in fish disease**. Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center, 1992.

ROVER JÚNIOR, Laércio et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

RUBIN LL, Canal CW, Ribeiro ALM, Kessler A, Silva I, Trevizan L, Viola T, Raber M, Gonçalves TA, Krás R. Effects of methionine and arginine dietary levels on the immunity of broiler chickens submitted to immunological stimuli. *Rev Bras de Ciênc Avíc* 9:241–247, 2007.

RUCHIMAT, Toni et al. Quantitative methionine requirement of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Aquaculture**, v. 150, n. 1-2, p. 113-122, 1997.

SAAVEDRA, Margarida et al. Tyrosine and phenylalanine supplementation on *Diplodus sargus* larvae: effect on growth and quality. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 10, p. 1523-1532, 2010.

SABIONI, Rafael Estevan; ZANUZZO, Fábio Sabbadin; CYRINO, José Eurico Possebon. Immunomodulation of Juvenile Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, by Different β (1-3)(1-6)-D glucan Products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, 2019.

SADDICK, Salina; AFIFI, Mohamed; ZINADA, Osama A. Abu. Effect of Zinc nanoparticles on oxidative stress-related genes and antioxidant enzymes activity in the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 7, p. 1672-1678, 2017.

SAEIJ, Jeroen PJ et al. Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: in vitro modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 3, p. 233-245, 2003.

SAHU, Shubham et al. A review on physiological, behavioral and metabolic role of dietary tryptophan in fish. **IJCS**, v. 8, n. 3, p. 2411-2417, 2020.

SAKAI, M. Current research status of immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SAKAI, Masahiro. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SALAMANCA, Natalia et al. Phenylalanine and tyrosine as feed additives for reducing stress and enhancing welfare in gilthead seabream and meagre. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 45, 2020.

SALAMANCA, Natalia et al. Phenylalanine and tyrosine as feed additives for reducing stress and enhancing welfare in gilthead seabream and meagre. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 45, 2020.

SAMPAIO, Flávia DF; FREIRE, Carolina A. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 4, p. 1055-1072, 2016.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, Francisco Javier et al. Environmental cycles, melatonin, and circadian control of stress response in fish. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 279, 2019.

SANDNES, Kjartan. Vitamin C in fish nutrition, A review. **Fiskeridirektoratets skrifter. Serie ernæring**, n. 1, p. 3-32, 1991.

SANTOS, G. A. et al. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): the combined effects of fish crowding and water quality deterioration. **Aquaculture**, v. 299, n. 1-4, p. 73-80, 2010.

SARKAR, Purabi et al. Pathogenic bacterial toxins and virulence influences in cultivable fish. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2361-2376, 2021.

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

SAVAN, R.; SAKAI, M. Immunoglobulin Genes of Teleosts: Discovery of New Immunoglobulin Class. In Zaccone, G., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A. and Kapoor, B.G., Eds., *Fish Defenses: Immunology*, Science Publishers, p. 221-239, 2009.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHIEBER M, Chande NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol. Biol.* 24(10): R453–R462, 2014.

SCHRECK, C. B; TORT, L. The concept of stress in fish. In Schreck, C. B; Tort, L.; Farrell, A.; Brauner, C. *Biology of stress in fish: V. 35 – Fish Physiology*, p. 1-34, 2016.

SCHWARZ, Frieder J.; KIRCHGESSNER, Manfred; DEURINGER, Ute. Studies on the methionine requirement of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 161, n. 1-4, p. 121-129, 1998.

SECOMBES C., Wang T. The innate and adaptive immune system of fish, *Infect. Dis. Aquac. Prev. control* v.231, p.3 e 68, 2012.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. San Diego: Academic Press, p.63-103, 1996.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, Vaithilingam. Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 286, n. 3-4, p. 176-183, 2009.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. v. 138 p.32-32, 1936.

SEMPLE, Shawna L.; DIXON, Brian. Imunidade antibacteriana de salmonídeos: uma perspectiva da aquicultura. *Biologia*, v. 9, n. 10, pág. 331, 2020.

SHARMA, Madhu et al. Behavioural responses in effect to chemical stress in fish: A review. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 7, n. 1, p. 01-05, 2019.

SHRIVASTAVA, Jyotsna et al. Temporal assessment of metabolic rate, ammonia dynamics and ion-status in common carp during fasting: a promising approach for optimizing fasting episode prior to fish transportation. **Aquaculture**, v. 481, p. 218-228, 2017.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London, p.15-22, 1991.

SIES, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*, v. 82, p. 291-295, 1997

SILVA RM, Goulart CT, Guido LA. Evolução histórica do conceito de estresse. *Rev. Cient. Sena Aires*. 2018; 7(2): 148-56.

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

SILIPO, Alba et al. Lipopolysaccharides. **Prokaryotic cell wall compounds: structure and biochemistry**, p. 133-153, 2010.

SIQUEIRA, T. V. Aquaculture: the new frontier for sustainable food production. **Revista do BNDES**, v. 25, p. 119-170, 2018

SKRZYNSKA, Arleta K. et al. Impact of air exposure on vasotocinergic and isotocinergic systems in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): New insights on fish stress response. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 96, 2018.

SMITH, Juliette L.; BOYER, Greg L.; ZIMBA, Paul V. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 5-20, 2008.

SOPINKA, Natalie M. et al. Stress indicators in fish. In: **Fish physiology**. Academic Press, p. 405-462, 2016

SOUZA, Carine de Freitas et al. Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: a review. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 785, 2019.

STECH, Marcia Regina; CARNEIRO, Dalton José; DE CARVALHO, Maria Regina Barbieri. Fatores antinutricionais e coeficientes de digestibilidade aparente da

proteína de produtos de soja para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 255-262, 2010.

STOLIAR, Oksana B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmental pollution and oxidative stress in fish. **Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants**, p. 131-166, 2012.

SU, Yue-Ning et al. The improved growth performance and enhanced immune function by DL-methionyl-DL-methionine are associated with NF- κ B and TOR signalling in intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & shellfish immunology**, v. 74, p. 101-118, 2018.

SUNYER, J. Oriol; TORT, Lluís. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 45, n. 3-4, p. 333-345, 1995.

SURAI, P. F. et al. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 14, n. 7, p. 1024-1050, 2001.

SVEIER, H. et al. Dietary inclusion of crystalline D-and L-methionine: Effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmon salar L.*). 2001. Sveier, 2001.

SWAIN, P. et al. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 3, p. 191-201, 2008.

SYAHIDAH, A. et al. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. 2015.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TEIXEIRA, Ilka Nicéia D.; GUARIENTO, Maria Elena. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 2845-2857, 2010.

TEJPAL, C. S. et al. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. **Aquaculture**, v. 293, n. 3-4, p. 272-277, 2009.

THEBAULT, Herve; ALLIOT, Elisabeth; PASTOUREAUD, Annie. Quantitative methionine requirement of juvenile sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v. 50, n. 1-2, p. 75-87, 1985.

Toni M, Angiulli E, Malavasi S, Alleva E, Cioni. Variation in environmental parameters in research and aquaculture: effects on behaviour, physiology and cell biology of teleost fish. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, 2017.

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

TORT, Lluís; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

TORT, Lluís; BALASCH, Joan Carles. Stress and Immunity in Fish. In: **Principles of Fish Immunology: From Cells and Molecules to Host Protection**. Cham: Springer International Publishing,. p. 609-655, 2022.

TRUSHENSKI, Jesse et al. Physiological responses of cobia *Rachycentron canadum* following exposure to low water and air exposure stress challenges. *Aquaculture*, v. 307, n. 1-2, p. 173-177, 2010.

TSENG, Yiyen et al. Effects of the dietary supplementation of copper on growth, oxidative stress, fatty acid profile and skeletal development in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, v. 568, p. 739319, 2023.

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

URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D., TAKAHASHI, L.S., 2013. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisseroto, B., de Carvalho Gomes, L. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2ª edição revisada e ampliada. Editora UFSM, Santa Maria, p. 205–244, 2013.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e biologia Aquática**. Editora TecArt. São Paulo.SP. 171-193, 2004.

URBINATI, E.C.; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B. (Org.) Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 3ed. Santa Maria: Editora UFSM, 544p., 2020.

URBINATI, Elisabeth Criscuolo; ZANUZZO, Fábio Sabbadin; BILLER, Jaqueline Dalbello. Stress and immune system in fish. In: **Biology and physiology of freshwater neotropical fish**. Academic Press, 2020. p. 93-114.

URIBE C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med-Czech* 56(10):486–503, 2011.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos; GALLANI, Sílvia Umeda; PILARSKI, Fabiana. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

VENKATESH, Pradeep et al. Antioxidantes: Conceitos básicos em relação ao olho. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 16, p. 9-14, 2001.,

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, v.8, p.409-424, 1998.

VIJAYAN M. M, ALURU N, LEATHERLAND J. F. Stress Response and the Role of Cortisol In: *Fish diseases and disorders*, edited by Leatherland JF, Woo PTK. Vol. 2 CAB International, Wallingford: 182–201, 2010.

VIJAYAN MM, Pereira C, Gordon Grau E, Iwama GK. Metabolic response associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp Biochem Physiol C*. (1997) 116:89–95, 1997.

VIJAYAN, M.M.; MOMMSEN, T.P.; GLÉMET, H.C. & MOON, T.W. Metabolic effects of cortisol treatment in marine teleost, the sea raven. **Journal Experimental Biology** 199:1509–1514, 1996

Wade, A.M.; Tucker, H.N. Antioxidant characteristics of L-histidine 1. *Journal Nutritional Biochemycal*, 308–315, 1998.

WALTON, M. J. et al. Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 2, p. 161-169, 1986.

WANG, Lei et al. Methionine in fish health and nutrition: Potential mechanisms, affecting factors, and future perspectives. **Aquaculture**, p. 739310, 2023.

WANG, Lei et al. Methionine in fish health and nutrition: Potential mechanisms, affecting factors, and future perspectives. **Aquaculture**, p. 739310, 2023.

WANG, Y. Y. et al. Dietary methionine requirement of juvenile *Pseudobagrus ussuriensis*. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 6, p. 1293-1300, 2016.

WANG, Zhen et al. Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 454, p. 148-156, 2016.

WEDEMEYER, G. A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.) **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge, Cambridge University Press, p. 35-72, 1997.

WEDEMEYER, Gary A.; WEDEMEYER, Gary A. Basic physiological functions. **Physiology of fish in intensive culture systems**, p. 10-59, 1996.

WEISS, WP Breve introdução ao NASEM (anteriormente conhecido como NRC) das exigências nutricionais do gado leiteiro. 2021.

WILSON RP (2002) Amino acids and proteins. In: Halver J, Hardy RW (eds.) Fish Nutrition, pp. 143–179. Academic Press, New York, NY

WILSON RP. Protein and amino acids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) Fish Nutrition, 3rd version. Elsevier Science, San Diego, USA, pp 144–179, 2002.

WILSON, Robert P. et al. Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish. **The Journal of Nutrition**, v. 108, n. 10, p. 1595-1599, 1978.

WINBERG, Svante; ØVERLI, Øyvind; LEPAGE, Olivier. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 22, p. 3867-3876, 2001.

WU GY, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134:489–92, 2004.

WU, Guoyao et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

WU, Guoyao. **Amino acids: biochemistry and nutrition**. CRC Press, 2021.

WU, Pei et al. Effect of choline on antioxidant defenses and gene expressions of Nrf2 signaling molecule in the spleen and head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish & shellfish immunology**, v. 38, n. 2, p. 374-382, 2014.

YADA, T.; TORT, L. Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions. In: Schreck, C.B.; Tort, L.; Farrel, A. P.; Brauner, C.J. Fish Physiology – Biology of Stress in Fish, Sand Diego, CA: Academic Pres, 2016.

YAGHOUBI, Morteza et al. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on the growth performance and humoral immune response in silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 10, p. 5311-5323, 2017.

YAN, Q. et al. Dietary methionine requirement for juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture nutrition**, v. 13, n. 3, p. 163-169, 2007.

YANG, Qiang et al. Dietary histidine affects intestinal antioxidant enzyme activities, antioxidant gene expressions and inflammatory factors in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 249-259, 2019.

YANO T. The nonspecific immune system: humoral defense. In Iwama G, Nakanishi T. **The immune fish system Academic Press** p.106–59, 1996.

YAO K, Yin YL, Chu W, Liu Z, Deng D, Li T, Huang R, Zhang J, Tan B, Wang W, Wu G. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr* 138:867–872, 2008.

ZAMINHAN, M. et al. Exigência de triptofano total e disponível para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Nutrição da Aquicultura**, v. 24, n. 5, pág. 1553-1562, 2018.

ZANIBONI-FILHO, Evoy; PEDRON, Janaína dos Santos; RIBOLLI, Josiane. Opportunities and challenges for fish culture in Brazilian reservoirs: a review. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 30, 2018.

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

ZANUZZO, Fábio S. et al. Aloe vera enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 65, p. 198-205, 2017.

ZEHRRA, S.; KHAN, M. A. Dietary tryptophan requirement of fingerling *Catla catla* (Hamilton) based on growth, protein gain, RNA/DNA ratio, haematological parameters and carcass composition. **Aquaculture nutrition**, v. 21, n. 5, p. 690-701, 2015.

ZHOU, F. et al. Dietary l-methionine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*) at a constant dietary cystine level. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 469-481, 2011.

ZHOU, Qi-Cun et al. Dietary lysine requirement of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 634-640, 2007.

ZHOU, Qi-Cun et al. Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 551-557, 2006.

CAPÍTULO 2

Efeitos da suplementação de metionina em parâmetros fisiológicos de pacus submetidos a estressor agudo

RESUMO

A metionina é geralmente o primeiro aminoácido essencial limitante para o crescimento normal e outras funções importantes nos peixes. Com isso, avaliamos o efeito da inclusão de metionina na ração, ração comercial (controle 4 g kg⁻¹ de ração; tratamento 8 g kg⁻¹ de ração; 12 g kg⁻¹ de ração), para juvenis de pacu submetidos ao estresse agudo por exposição aérea e injeção contendo LPS, nos indicadores de estresse, imunidade inata, bioquímicos, metabólicos e antioxidante. Como resultado temos que cortisol foi modulado tanto pelos tratamentos 8 g e 12 g como pelos grupos SE, EA e LPS. Enquanto os estressores elevaram o hormônio, a elevação foi atenuada pela metionina. A glicose foi elevada 1 h e 3 h após o EA e 1 h após o LPS, sem interferência do AA. A atividade respiratória dos leucócitos foi reduzida pelos estressores EA e LPS, sem ação da metionina. Em relação ao sistema complemento, tanto EA quanto LPS ativaram o sistema em relação ao grupo controle e as repostas foram moduladas pelas duas concentrações da metionina, que já na condição basal estava ativado e esse efeito permaneceu ao longo das amostragens nos grupos SE e EA. Os triglicerídeos foram menores nos grupos EA e LPS, as concentrações de lipídeo hepático foram afetadas pelo estressor EA e LPS, e o lipídeo muscular foi afetado pelo tratamento 12 g no Grupo SE e LPS. Nos índices somáticos, o IHS diminuiu após o EA e LPS. A exposição aérea diminuiu a atividade da GSH, GST e CAT e causou aumento nos níveis de LPO. A concentração de 12 g de metionina estimulou a CAT e GST após 15 dias de alimentação. Concluimos que a metionina oferecida por 15 dias teve efeito redutor nos indicadores de estresse, imunidade inata estimulada e aumento nas defesas antioxidantes, enquanto os estressores afetaram os triglicerídeos, inibiu a lipogênese no fígado e no músculo e, causou estresse oxidativo no fígado.

PALAVRAS CHAVES

estresse, imunidade, DL - metionina e *Piaractus mesopotamicus*

ABSTRACT

Methionine is generally the first limiting essential amino acid for normal growth and other important functions in fish. Thus, we evaluated the effect of including methionine in the commercial diet (control 4 g kg⁻¹ of diet; treatment 8 g kg⁻¹ of diet; 12 g kg⁻¹ of diet), for pacu juveniles submitted to stress acute by air exposure and injection containing LPS, on stress, innate immunity, biochemical, metabolic and antioxidant indicators. As a result, cortisol was modulated both by the 8 g and 12 g treatments and by the SE, EA and LPS groups. While stressors elevated the hormone, the elevation was attenuated by methionine. Glucose was elevated 1 h and 3 h after EA and 1 h after LPS, without AA interference. The respiratory activity of leukocytes was reduced by the stressors EA and LPS, without the action of methionine. Lysozyme showed oscillations that do not characterize the action of stressors or AA. Regarding the complement system, both EA and LPS activated the system in relation to the control group and the responses were modulated by the two concentrations of methionine, which was already activated in the baseline condition and this effect remained throughout the samplings in the SE and EA groups. Triglycerides were lower in the EA and LPS groups, liver lipid concentrations were affected by the stressor EA and LPS, and muscle lipid was affected by the 12 g treatment in the SE and LPS group. In the somatic indices, the HSI was affected by the stressors EA and LPS. Air exposure decreased GSH, GST and CAT activity and caused an increase in LPO levels. The concentration of 12 g of methionine stimulated CAT and GST after 15 days of feeding. We conclude that methionine offered for 15 days had a reducing effect on stress indicators, stimulated innate immunity and increased antioxidant defenses, while stressors affected triglycerides, inhibited lipogenesis in the liver and muscle, and caused oxidative stress damage in the liver.

KEYWORDS

stress, immunity, DL - methionine and *Piaractus mesopotamicus*

1. Introdução

O rápido desenvolvimento da aquicultura tem sido considerado a revolução azul, que é uma abordagem para aumentar a produção global de peixes, a fim de contribuir para a nutrição humana e a segurança alimentar (Ahmed e Thompson, 2019; Boyd *et al.*, 2022). Durante o ciclo produtivo aquícola, são comuns procedimentos que geram estresse nos peixes, tais como confinamento (Stevens *et al.*, 2017); transporte (King *et al.*, 2009); manejo nos viveiros (Costas *et al.*, 2020); despesca (Papaharisis *et al.*, 2019), entre outros (Bayunova *et al.*, 2002; Martos-Sitcha, *et al.*, 2020; Afonso *et al.*, 2020). As respostas fisiológicas de peixes submetidos a estresse geram uma cascata de reações (Brandl *et al.*, 2020; Dahlke *et al.*, 2020). Em resposta ao estresse ocorre perda da homeostase (Barton, 1997; Schreck e Tort, 2016) e novas condições biológicas que envolvem respostas primárias (hormonais), secundárias (metabólicas, iônicas, hematológicas) e terciárias (desempenho e imunológicas) (Urbinati *et al.*, 2020), sendo essas respostas essenciais para ajudar o animal a se adaptar a uma nova condição biológica (Barton e Iwama, 1991). Uma característica dessa série de respostas de estresse é a mobilização de energia para sustentar os processos adaptativos à condição estressora (Wendelaar Bonga, 1997). O sistema imune é um dos sistemas ativado durante a resposta de estresse (Tort, 2011), sendo formado por células e fatores humorais (Secombes e Wang 2012), que dependem de energia, impondo uma sobrecarga metabólica aos mecanismos celulares de produção de energia, bem como nas respostas gerais ao estresse (Mommsen *et al.* 1999), o que pode afetar o equilíbrio redox celular, com produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos oxidativos a moléculas como carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Nimse e Pal, 2015).

Para mitigar os prejuízos da produção intensiva, a aquicultura deve crescer de forma sustentável e, ao mesmo tempo, reduzir os impactos significativamente (Boyd *et al.*, 2022; Tada *et al.*, 2023). Existem duas abordagens para mitigar o estresse: biológica - controle ambiental como qualidade da água e controle dos parâmetros físico-químicos da água; e química que inclui suplementação dietética de vitaminas, minerais, probióticos e aminoácidos, (Kumar *et al.*, 2015). Essa estratégia é fundamentada por evidências notáveis de que a nutrição é um importante modulador do sistema imunológico dos peixes (Trichet, 2010; Caipang

e Lazado *et al.*, 2015). Neste contexto, a metionina regula as principais vias metabólicas importantes para as respostas imunes e sua inclusão em dietas pode aumentar a síntese de proteínas relacionadas ao sistema imunológico (Machado *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2021).

Além disso, evidências obtidas em humanos sugerem que uma dieta enriquecida com L-metionina pode ser benéfica durante o envelhecimento para proteger os neurônios do desequilíbrio oxidativo e da disfunção mitocondrial, evitando assim a progressão de processos neurodegenerativos (Catanesi *et al.*, 2021). Por outro lado, estudo com carpa mostrou que a deficiência de metionina na dieta induziu uma diminuição da capacidade antioxidante no hepatopâncreas e no intestino de juvenis (Wu *et al.*, 2017).

Adicionalmente, outro estudo com yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) mostrou que o nível ideal de metionina na dieta de juvenis da espécie pode melhorar o status antioxidante, a resposta imune inata e a proteção contra a infecção de bactérias (Elmada *et al.*, 2016). Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da metionina em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em respostas metabólicas, do sistema imune inato e do sistema antioxidante após manejos considerados estressores como exposição aérea dos peixes e injeção com lipopolissacarídeo (LPS) após 15 dias com ração suplementada com o AA.

2. Material e Métodos

O presente estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo nº 3959/22), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Câmpus Jaboticabal – São Paulo.

2.1 Aclimação e manejo dos peixes

O experimento foi conduzido no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – FCAV, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus Jaboticabal. Foram utilizados 270 juvenis de pacu, com peso médio de $80,5 \pm 10,21$ g e comprimento padrão $13,5 \pm 1,73$ cm, fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP. Os peixes foram distribuídos em 27 caixas de polietileno (10 peixes/caixa) com capacidade de 100 litros cada, dispostas em sistema aberto de renovação contínua de água e aeração constante. Os animais foram aclimatados durante quinze dias às condições experimentais, sendo alimentados com ração comercial extrusada NUTRIPISCIS TR 32 (32% PB e 3.200 Kcal EB/kg), até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (10:00 e 16:00).

2.2 Processamento das dietas experimentais

As dietas foram preparadas na Fábrica de Ração do Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP, a partir da moagem da ração comercial utilizada na aclimação dos peixes, à qual foi incorporada a metionina. Todos os tratamentos passaram pelos mesmos procedimentos. As dietas experimentais foram determinadas a partir da concentração inicial de metionina presente na ração comercial, aproximadamente 4 g por kg de ração, sendo assim: Tratamento 1 (Controle): ração contendo 4 g/kg; Tratamento 2: ração enriquecida 2X (8 g de DL-metionina/kg de ração) e Tratamento 3: ração enriquecida 3X (12 g de DL-metionina/kg de ração). As dietas foram processadas em máquina de moer carne com adição de 45 % de água e secas em estufa de secagem à temperatura de 40 °C, posteriormente foram resfriadas e armazenadas em sacos plásticos à 20°C

2.3 Delineamento experimental

Após o período de aclimação, os peixes começaram a receber as dietas correspondentes aos três tratamentos dietários:

Tratamento 1 (Controle) – ração comercial contendo 4 g de metionina (de acordo com a especificação do fabricante);

Tratamento 2 – ração enriquecida 2X a partir da ração comercial (8 g de DL-metionina/kg de ração);

Tratamento 3 – ração enriquecido 3X a partir da ração comercial (12 g de DL-metionina/kg de ração).

Cada tratamento foi disposto com 9 réplicas (unidades experimentais), divididas em 3 grupos de 3 réplicas cada (30 peixes/grupo). Cada grupo correspondia a um tipo de manejo: todas as dietas descritas, sem estressor SE; todas as dietas descritas + exposição a estressor agudo EA; e todas as dietas + injeção de LPS (Figura 2). Os peixes foram alimentados com a ração do tratamento correspondente, durante 15 dias, duas vezes ao dia (10 h e 16 h) até a saciedade aparente. Durante este período, a água das caixas temperatura de $27,64 \pm 0,5$ °C, concentração de oxigênio dissolvido de $5,0 \pm 0,31$ mg/L, pH $7,17 \pm 0,02$ e amônia total $0,12 \pm 0,06$ mg/L. O fotoperíodo foi de 12 h claro e 12 h escuro.

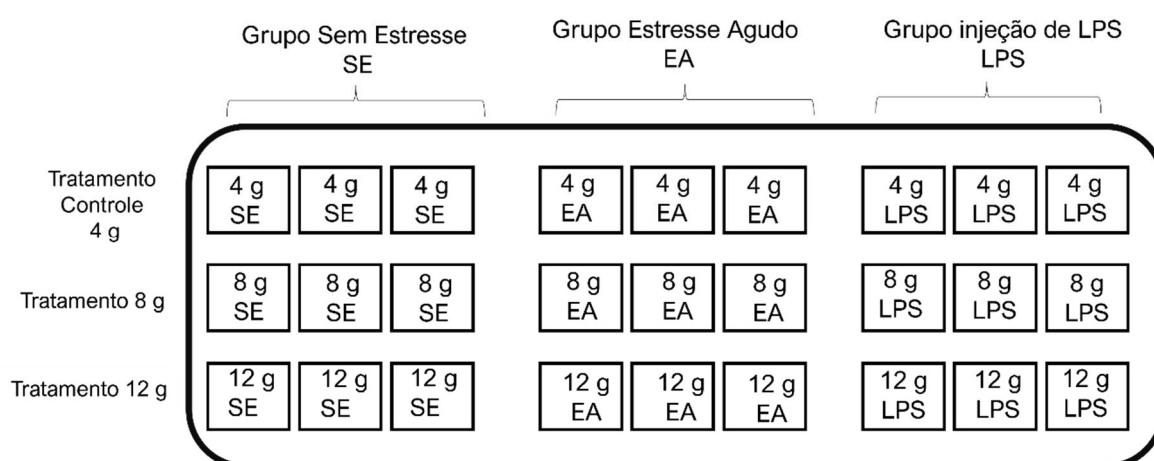


Figura 2. Esquema do delineamento experimental desenvolvido com pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE, expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS.

2.4 Amostragem

Após o período de alimentação experimental, e após 24 h sem a ingestão de alimento, peixes de todas as caixas foram amostrados para caracterização da condição basal (Inicial), e em seguida, cada grupo exposto ao manejo específico: o Grupo SE não foi manejado; no Grupo EA todos os peixes da caixa foram expostos ao ar com puçá durante 2 minutos; e o Grupo LPS recebeu injeção intraperitoneal de 0,01 mL g⁻¹ de peixe contendo 1.500 µg kg⁻¹ de LPS de *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma – Aldrich, Ref. L3755) dissolvidos em solução tampão PBS (Mello et al., 2019). Os peixes foram, então, amostrados 1, 3, 6 e 24 horas depois. A amostragem basal foi composta por 27 peixes, sendo 9 de cada tratamento dietário/grupo/manejo; já as demais amostragens, foram compostas por 6 peixes de cada tratamento dietário/grupo/manejo (2 peixes de 3 réplicas, n=6).

Durante as amostragens, os peixes foram anestesiados com eugenol (200 mg ml⁻¹, Quinarí – Ref. 1880, Paraná, Brasil) diluído em álcool etílico, e a coleta de sangue foi realizada via punção de vasos caudais com seringas sem anticoagulante (aproximadamente 2 ml de sangue), e posteriormente os dados biométricos, peso e comprimento total, foram mensurados.

Do sangue sem anticoagulante, alíquotas foram armazenadas em microtubos contendo heparina (Hepamax-S 5000 UI ml⁻¹, Blau Farmacêutica, São Paulo, Brasil) para análise da atividade respiratória dos leucócitos, e contendo Glistab (Labtest, Ref. 29-400, Minas Gerais, Brasil) e centrifugado a 1714 x g durante 10 minutos para separação do plasma, estocado para posterior análise de glicose e cortisol. Outra parte do sangue, foi adicionada em tubos de vidro sem anticoagulante, mantido em repouso em ambiente refrigerado durante três horas e posteriormente, centrifugado a 2117 x g durante 10 minutos, para separação do soro, armazenado a - 80° C para posterior determinação da atividade hemolítica do sistema complemento e da lisozima e de indicadores bioquímicos.

Após a retirada do sangue, os peixes foram eutanasiados por seccionamento medular para remoção do fígado, porção inicial do intestino e uma fração do músculo (aproximadamente 2 cm). O fígado foi pesado, congelado em gelo seco e armazenado a -80° C até as análises de indicadores metabólicos e do sistema antioxidante.

2.5 Análises laboratoriais

2.5.1 Indicadores de estresse

A análise de cortisol foi realizada por ensaio imunoenzimático com o kit DRG® (Cortisol Elisa - Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Ref. EIA 1887, Springfield, Estados Unidos), pelo método de ligação competitiva, em que anticorpos monoclonais presentes nas microplacas se ligam a um sítio antigênico na molécula de cortisol.

A concentração de glicose foi determinada com kit comercial (Labtest® – Glicose Liquiform, Ref. 133, Minas Gerais, Brasil), com base na catálise da oxidação da glicose pela glicose oxidase, formando peróxido de hidrogênio, através de uma reação oxidativa de acoplamento, resultando em uma coloração vermelha.

2.5.2 Indicadores de imunidade inata

A atividade respiratória de leucócitos foi determinada seguindo protocolo de Anderson e Siwicki (1995) modificado para o pacu (Biller-Takahashi et al., 2013). O método determina as espécies reativas de oxigênio - EROs produzidas pelo “burst” oxidativo das células, baseado na redução do corante *nitro blue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel de coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). À uma alíquota de 50 µL de sangue total heparinizado foi adicionada 50 µL de NBT (Sigma-Aldrich – Ref. N6639 -1G, St Louis, MO, USA). Em seguida, a mistura foi homogeneizada e incubada por 30 min a temperatura ambiente, após 50 µL dessa suspensão foi colocado em tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetilformamida - DMF (Sigma-Aldrich, Ref. 227056 - 2L, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 1714 x g por 5 minutos, e foram lidas em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV - Vis, no comprimento de onda de 540 nm.

A determinação da atividade de lisozima seguiu a metodologia proposta por Smolelis e Hartsell (1949) modificada por Zanuzzo et al. (2015), que consiste na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (SigmaAldrich, Ref. M3770 - 25G, St Louis, MO, USA), usando lisozima da clara de ovo de galinha como padrão (Sigma-Aldrich, Ref. 62970 – 1G). A redução da densidade óptica da solução foi

medida em comprimento de onda de 450 nm, a cada cinco minutos durante dez minutos (inicial, 5 e 10 min.), utilizando um leitor de microplacas (Thermo Plate Reader MN). A atividade enzimática foi determinada pela fórmula: $UA = ([\text{lisozima}] / 0,001) / 10$.

A atividade hemolítica do sistema complemento foi determinada de acordo com a metodologia modificada para pacu, proposta por Zanuzzo et al. (2015). O ensaio cinético determina o tempo (em segundos) necessário para as proteínas das amostras lisarem 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. As leituras foram realizadas a cada 20 segundos, durante 20 minutos a 700 nm, em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV - Vis. A atividade hemolítica da via alternativa foi calculada pela fórmula: $1/\text{tempo (segundos)}$.

2.5.3 Indicadores Metabólicos

As concentrações de colesterol e triglicerídeos foram determinadas no soro, pelo método colorimétrico com kit Labtest (Labtest® – Liquiform, Minas Gerais, Brasil). Para determinação de lipídeo hepático e muscular foi utilizada a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), que consiste na extração a frio de amostras trituradas em solução clorofórmio/metanol. O glicogênio hepático foi determinado de acordo com Perry *et al.* (1998). O índice hepatossomático (IHS) foi calculado considerando o peso do órgão em relação ao peso do total do peixe $[(\text{peso do fígado} / \text{peso do peixe}) * 100]$. O índice de gordura visceral (IGVS) foi calculado pesando a gordura retirada da cavidade abdominal e entre as vísceras em relação ao peso total dos peixes $[(\text{peso da gordura} / \text{peso do peixe}) * 100]$.

2.5.4 Indicadores de sistema antioxidante

A determinação da concentração de proteína da amostra seguiu a metodologia proposta por Bradford (1976), que consiste na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Ref. 27815, St Louis, MO, USA) à proteína, utilizando albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, Ref. 4919-5G, St

Louis, MO, USA) como padrão. A leitura foi realizada à 595 nm, utilizando um leitor de microplacas (Biotek Epoch).

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) seguiu a metodologia proposta por Beutler *et al.* (1963), usando o ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB – Reagente de Ellman (Sigma-Aldrich, Ref. D21820-5G, St Louis, MO, USA). A reação da GSH com DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercaptop-benzóico (TNB) de cor amarela, avaliado pela absorbância a 405 nm utilizando um leitor de microplacas (Biotek Epoch 2 Microplate Reader).

A atividade da GST foi determinada de acordo com Keen *et al.* (1976). O substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reduz a glutathiona (GSH) para formar glutathiona-2,4-nitrobenzeno e a leitura da absorbância é feita a 340 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan Ascent 354). A atividade da GST é expressa em nmol por mg de proteína.

A enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada seguindo a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que consiste na inibição da taxa de redução do citocromo C (Sigma-Aldrich, Ref. C2037, St Louis, MO, USA) pelo radical superóxido via sistema xantina/xantina oxidase, a 550 nm, 25°C, utilizando um leitor de microplacas (Biotek Epoch 2 Microplate Reader). A atividade da SOD é expressa em mg proteína⁻¹, uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima que promove inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com Aebi (1984), através do consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno pela catalase, gerando água e oxigênio. A absorbância da solução foi mensurada em espectrofotometria a 240nm, no leitor de microplacas Biotek Epoch 2 Microplate Reader. durante 15 segundos por 5 minutos e expressa em mmol / mg proteína/minuto.

A lipoperoxidação (LPO) foi determinada utilizando o método TBARS (ácido tiobarbitúrico), devido esta técnica detectar os níveis de MDA (malondialdeído). Seguindo a metodologia proposta por Federici *et al.*, (2007) que consiste na produção de fluorescência detectável quando acrescentada solução de TBA a temperatura de 60 °C, em microplacas para fluorescência. A absorbância foi mensurada em leitor de microplacas Biotek Epoch 2 Microplate Reader, expressa em nmol de MDA mg de proteína⁻¹.

2.6 Análise estatística

O experimento foi desenvolvido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial 5x3x3 (cinco tempos de amostragem x 3 tratamentos dietário x 3 grupos de manejo). Os dados foram avaliados quanto à normalidade (Cramer-von Mises) e à homocedasticidade (Brown-Forsythe) e quando necessário foram transformados. Após os ajustes, dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para comparação das médias foi utilizado o teste Tukey, com significância $p < 0,05$ pelo software SAS (versão 9.0). Os resultados estão apresentados em gráficos com média e desvio padrão.

3. Resultados

3.1 Indicadores de estresse

3.1.1 Concentração plasmática de cortisol (Fig. 3)

Na amostragem inicial, após 15 dias de alimentação com os 3 tratamentos dietários (4g, 8g e 12 g Met/kg ração), as concentrações plasmáticas de cortisol do grupo EA, nos peixes que receberam 8g e 12g, apresentam valores mais baixos do que naqueles que receberam a ração comercial (4g) ($p=0,0012$), mas essa diferença não aparece no grupo LPS, embora as condições sejam semelhantes.

Nos peixes do Grupo EA, as concentrações apresentaram um pico de elevação do cortisol nos três tratamentos, após 1 hora, com retorno aos níveis basais após 6 h ($p=0,0001$). Comparando tratamentos, após exposição ao estressor, a elevação do cortisol foi menor nos peixes que receberam suplementação de metionina 1 h ($p=0,0001$) e 3 h ($p=0,0001$) em relação aos que receberam ração controle (4g).

No grupo LPS, as concentrações de cortisol aumentaram 1 hora após a injeção, com recuperação após 3 H ($p=0,0001$) em todos os tratamentos. Comparando tratamentos, na amostragem 1 hora, a suplementação com 8 g e 12 g de metionina ($p=0,0001$) reduziu a elevação do hormônio circulante.

Comparando os Grupos, houve diferença nas concentrações de cortisol nas amostragens de 1 e 3 h, com maiores concentrações no grupo EA ($p=0,0001$).

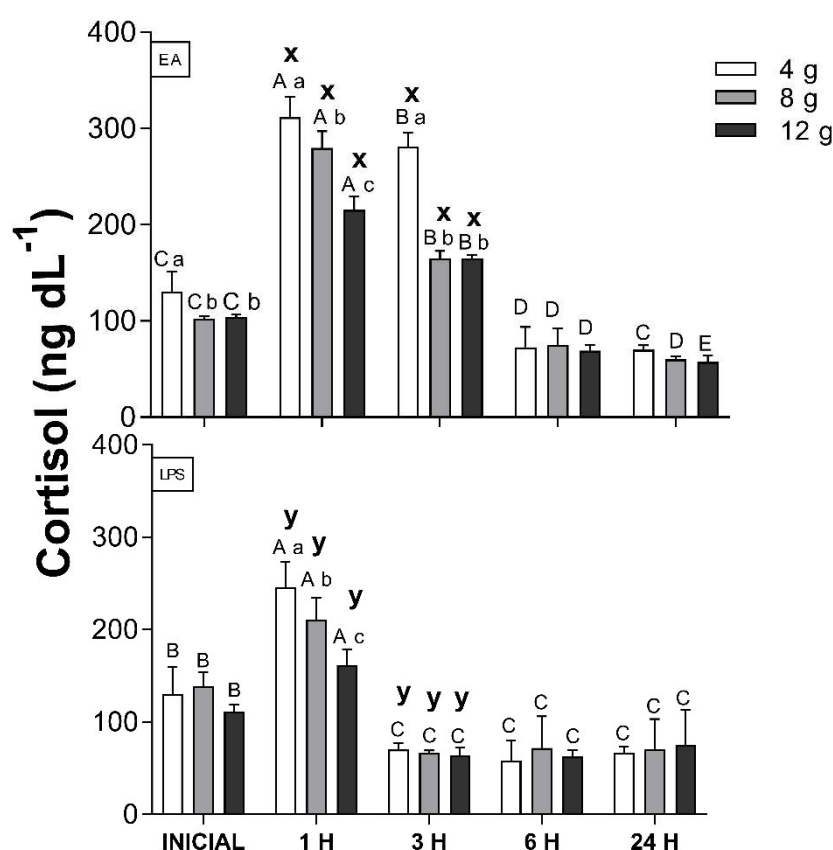


Figura 3. Concentrações plasmáticas de cortisol em pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre as condições de manejo. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

3.1.2 Concentração plasmática de glicose (Fig. 4)

No grupo EA, as concentrações de glicose aumentaram 1 h após o estressor, permanecendo até 3 h, retornando aos níveis a partir de 6 h em todos os tratamentos ($p=0,0001$). Na amostragem inicial, as concentrações foram mais elevadas nos peixes que receberam 12g de metionina ($p=0,0350$) e às 24 h nos que receberam 8g ($p=0,0367$).

No grupo LPS, as concentrações de glicose aumentaram após a injeção do inóculo, em todos os tratamentos, com redução às 3 h e recuperação dos valores iniciais às 6 h ($p=0,0001$). Comparando tratamentos, 1 h após a injeção, as

concentrações foram mais elevadas nos peixes que receberam 8g e 12 g em relação aos que receberam 4g ($p=0,0002$).

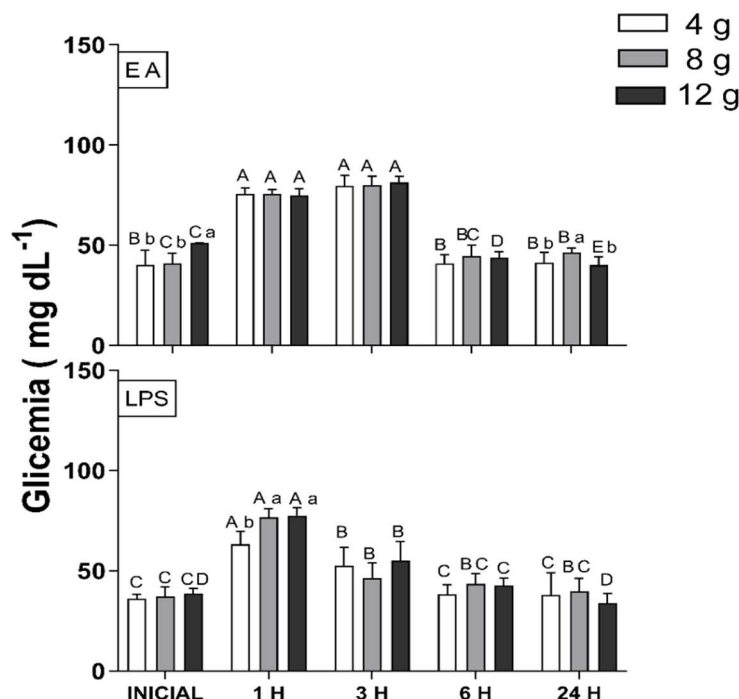


Figura 4. Concentrações plasmáticas de glicose em pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.2 Indicadores de imunidade inata

3.2.1 Atividade respiratória dos leucócitos (Fig. 5)

No grupo EA, a menor atividade foi observada 3 h após exposição ao estresse nos tratamentos controle, 8g e 12g ($p=0,0044$; $p=0,0047$; $0,00048$, respectivamente).

No grupo LPS, uma redução da ARL foi observada 1 h e 3 h após a injeção, com retorno aos níveis iniciais às 6 h (controle $p=0,0004$; 8 g $p=0,0001$; 12 G $P=0,0456$).

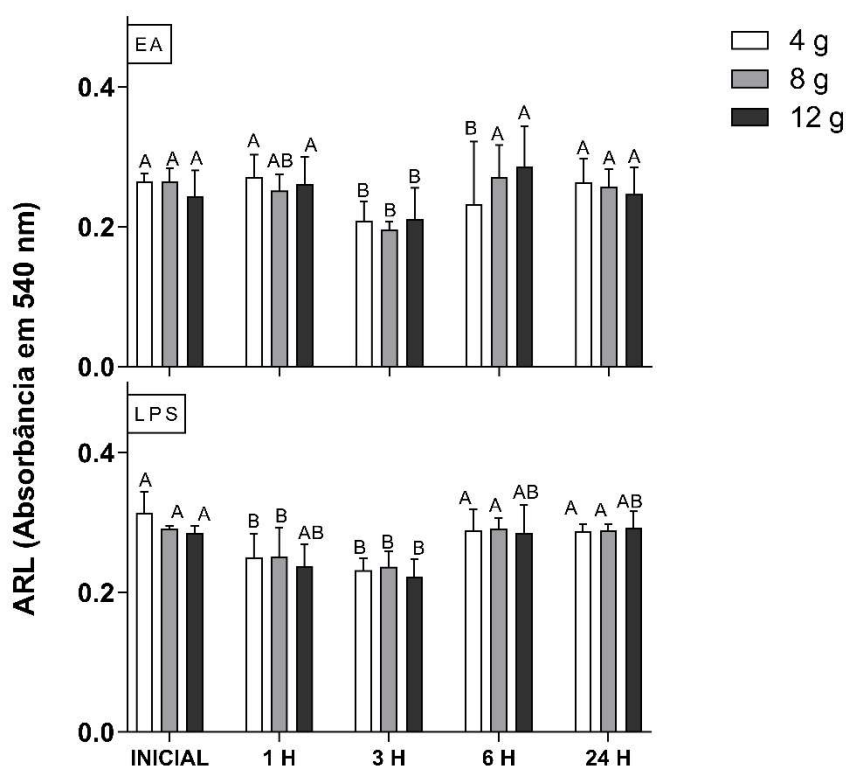


Figura 5. Atividade respiratória dos leucócitos em pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.2.2 Atividade sérica de lisozima (Fig. 6)

No grupo EA, a atividade de lisozima diminuiu nos tratamentos controle e 8 g ($p=0,0048$; $p=0,0045$) após 3h e 6h do estressor, enquanto no tratamento 12 g a redução foi observada após 6h ($p=0,0008$). Os tratamentos diferiram após 3h, com redução da atividade nos tratamentos controle e 8 g em relação ao tratamento 12g ($p=0,0041$).

No grupo LPS, a atividade de lisozima não se alterou no tratamento controle, reduziu após 6h nos peixes que receberam 8g e a partir de 3h nos que receberam 12g ($p=0,0042$). Comparando os tratamentos, a suplementação com 12g de metionina reduziu a atividade da lisozima nas amostragens de 1 e 3 h ($p=0,0005$; $p=0,0004$, respectivamente).

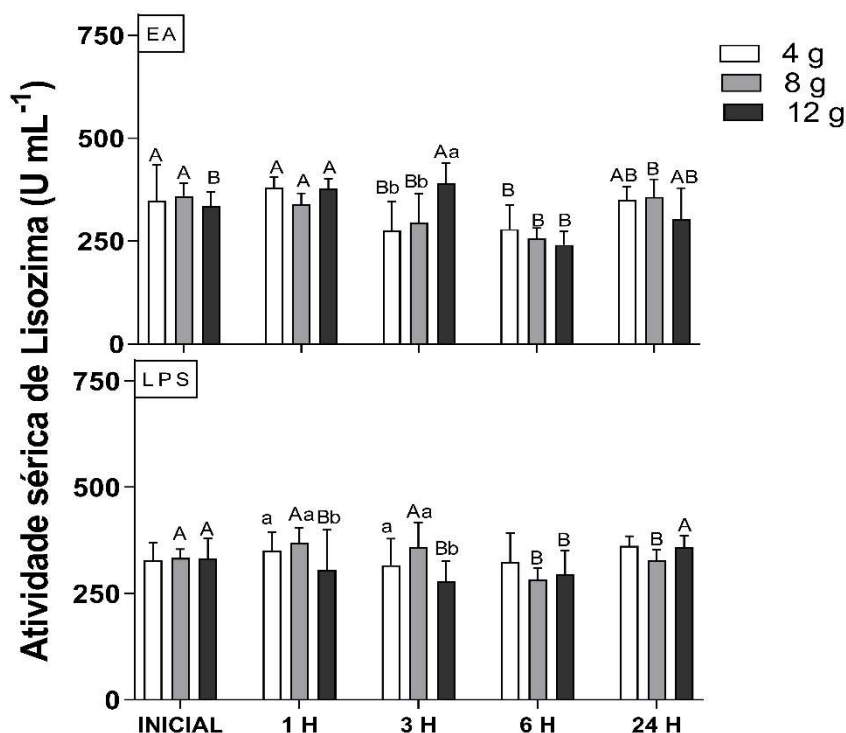


Fig. 6 Atividade de lisozima em pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica sem diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.2.3 Atividade Hemolítica do sistema complemento (Fig. 7)

No grupo EA, os tratamentos que receberam suplementação de metionina apresentaram maior atividade em relação ao controle, enquanto o tratamento 12 g foi o que apresentou maior atividade ao longo das amostragens ($p=0,0001$). A atividade do complemento diminuiu no tratamento 12 g 6h após o estressor, não retornando aos valores basais na amostragem seguinte ($p=0,0001$).

No grupo LPS, a atividade do sistema complemento aumentou a partir de 1h após a injeção de LPS, nos tratamentos com suplementação de metionina (8g e 12g), a maior atividade no tratamento 8 g às 3 h ($p=0,0001$) sem retorno ao nível inicial até 24 h em todos os tratamentos. Na amostragem inicial, embora a atividade nos peixes dos 2 tratamentos com suplementação de metionina fosse numericamente superior ao do controle, perfil semelhante ao observado no grupo EA, a diferença não foi significativa.

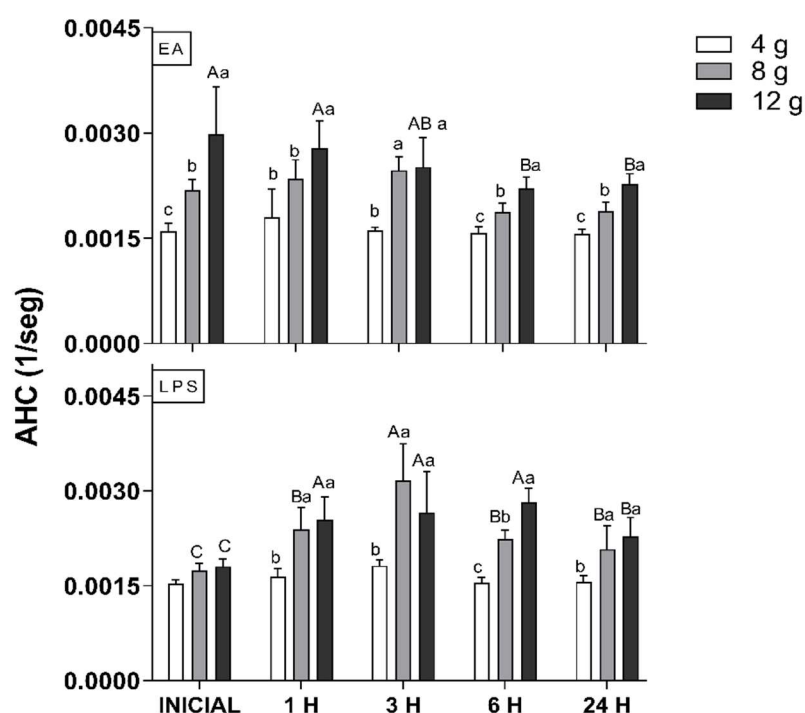


Figura 7. Atividade hemolítica do sistema complemento em pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$). AHC: 1/tempo (segundos).

3.3 Indicadores Metabólicos (Fig. 8)

3.3.1 Concentração de colesterol e triglicerídeos

As concentrações de colesterol e triglicerídeos não apresentaram diferença entre os tratamentos. Porém entre os agentes estressores, as concentrações de triglicerídeos foram afetadas pelos agentes estressores, com diminuição após o estresse nos tratamentos 4 e 8 g ($p=0,0092$; $p=0,00425$, respectivamente).

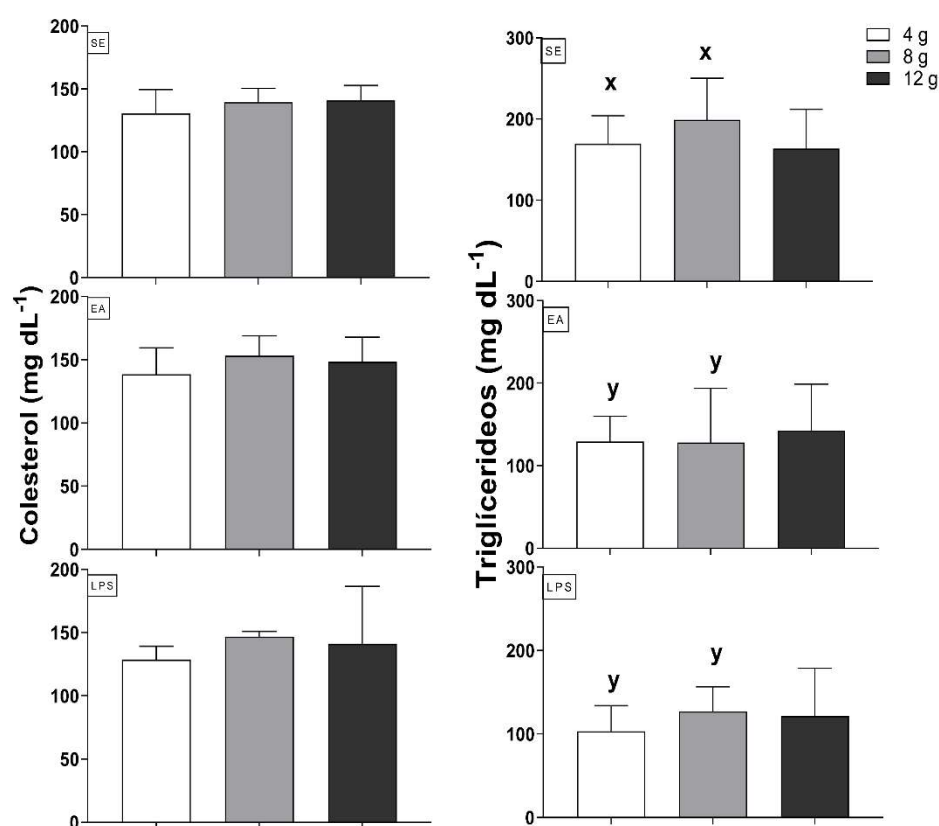


Figura 8. Concentrações de colesterol e triglicerídeos de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE (amostragem inicial), expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras xyz indicam diferença entre os grupos SE, EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.3.2 Concentrações de lipídio hepático, lipídeo muscular e glicogênio hepático (Fig. 9)

No grupo SE, a concentração de lipídio hepático diminuiu após os 15 dias de alimentação com dieta suplementada com 8g e 12g de metionina ($p=0,0010$), enquanto no grupo EA a redução foi observada no tratamento 8 g ($p=0,00255$). Comparando os grupos, o tratamento controle apresentou menores concentrações em relação aos outros grupos ($p=0,0021$). O tratamento 8 g mostrou diminuição após o estresse agudo ($p=0,0003$).

Em relação ao lipídeo muscular, a suplementação com 8 e 12 g de metionina reduziu as concentrações de lipídio ($p=0,0126$), enquanto isso foi observado, no grupo LPS nos peixes que receberam 12 g ($p=0,0018$).

As concentrações de glicogênio hepático não apresentaram diferenças entre os tratamentos e grupos de diferentes manejos.

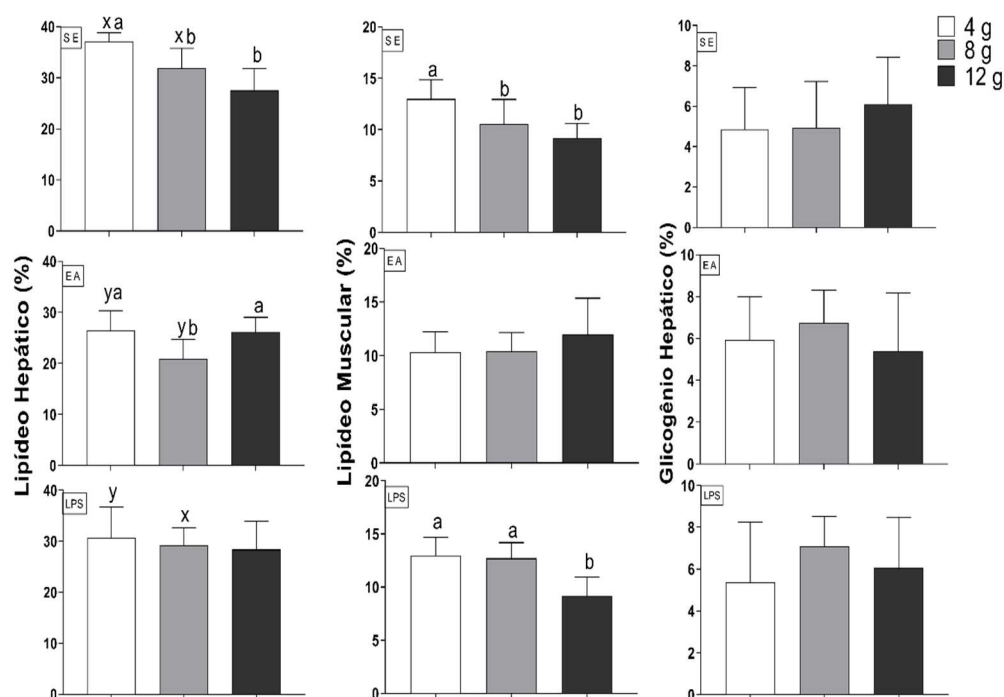


Figura 9. Concentrações de Lipídeo Hepático, Lipídeo Muscular e Glicogênio Hepático de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE (amostragem inicial), expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos SE, EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.3.3 Índices Somáticos

3.3.3.1 Índice Hepatosomático e Índice de Gordura Visceral (Fig. 10)

A suplementação com metionina não afetou os valores do índice hepatossomático (IHS), embora valores maiores tenham sido observados no grupo SE em relação a EA e LPS ($p=0,0002$).

A alimentação por 15 dias com metionina não influenciou o Índice de gordura visceral (IGVS) e não foram observadas alterações entre os diferentes grupos.

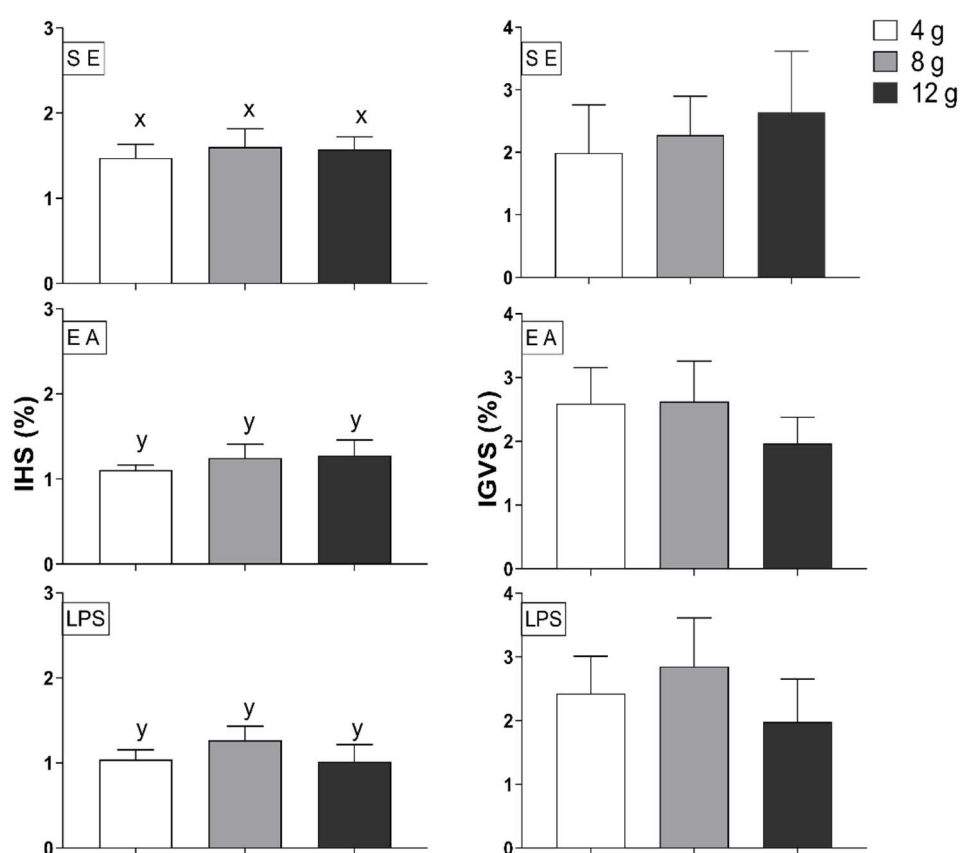


Figura 10. Índice Hepatosomático e Índice de Gordura Visceral de pacu alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE (amostragem inicial), expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos SE, EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.4 Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

3.4.1 Concentração hepática de glutatona reduzida (GSH) (Fig. 11)

No grupo EA, os tratamentos que receberam suplementação de 8 g e 12 g metionina apresentaram maiores concentrações de glutatona reduzida ($p=0,0010$) em relação ao controle. Os peixes que receberam 8 g e 12 g apresentaram menores concentrações e diferiram 1 h ($p=0,0196$) e 3 h ($p < 0,0001$) após o manejo e o tratamento 12 g demonstrou recuperação e retorno a concentração basal 24 h após o estressor agudo.

Nos peixes do grupo LPS, a amostragem inicial indicou que após 15 dias de alimentação o tratamento 12 g apresentou maiores concentrações de GSH ($p=0,005$), permanecendo com o mesmo comportamento 6 h após injeção de LPS. Comparando os tratamentos, 1 h e 3 h após exposição ao estressor, houve diminuição nas concentrações de GSH nos tratamentos 4 g e 12 g ($p= 0,02540$; $p= 0,0362$, respectivamente), não retornando aos valores basais nas amostragens seguintes.

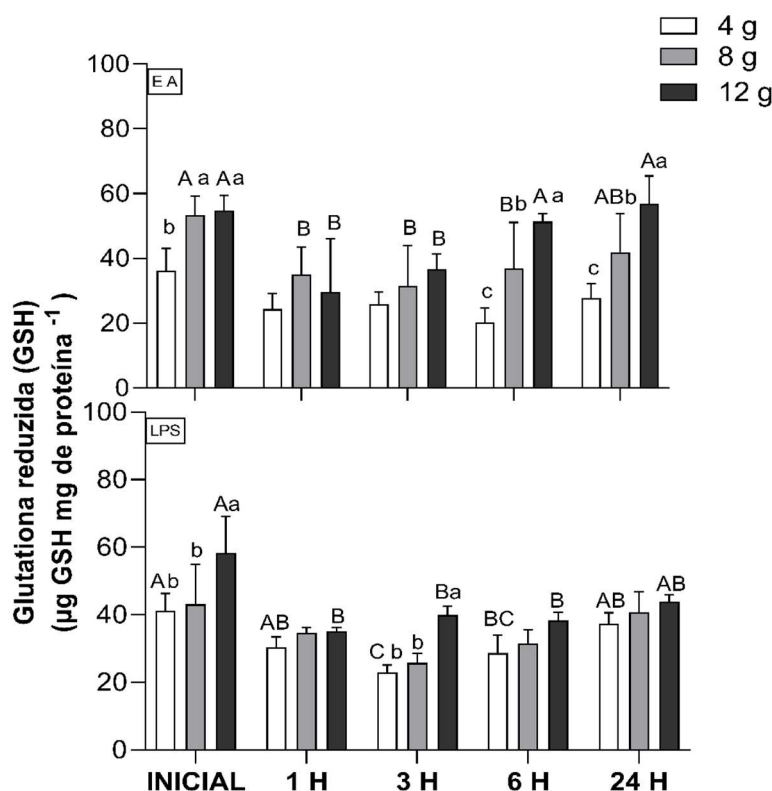


Figura 11. Concentração de glutatona reduzida de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.4.2 Atividade hepática de glutatona s-transferase (GST) (Fig. 12)

No grupo EA, a atividade da glutatona s-transferase 15 dias após alimentação contendo metionina, foi maior no tratamento 12 g ($p=0,0001$). Após 1 h de exposição do agente estressor houve diminuição em todos os tratamentos ($p=0,0020$), porém os peixes que receberam suplementação de metionina demonstraram maior atividade ($p=0,0005$).

Semelhante ao encontrado no grupo EA, 15 dias de alimentação com dieta suplementada com 8 g e 12 g de metionina demonstrou aumentar as concentrações de GST em relação ao tratamento controle ($p=0,0001$). Após a injeção, houve diminuição nas atividades em todos os tratamentos ($p=0,0005$), retornando às concentrações iniciais após 3 h ($p=0,0001$). A concentração de 12 g demonstrou maior atividade após a injeção 1 h ($p=0,0002$), 6 h ($p=0,0219$) e 24 h ($p=0,0007$).

Entre os grupos, o manejo EA demonstrou diminuir as atividades de GST às 3 h ($p=0,0001$) em comparação ao grupo LPS.

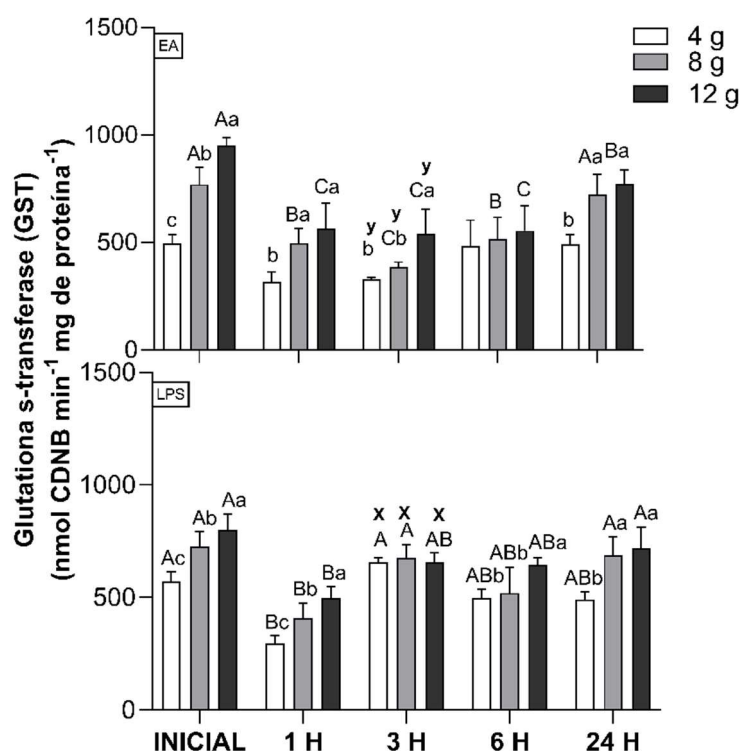


Figura 12. Atividade de glutatona s-transferase de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.4.3 Atividade hepática da catalase (CAT) (Fig. 13)

A atividade da enzima catalase foi estimulada após 15 dias de alimentação na concentração de 12 g em relação aos tratamentos 4 g e 8 g ($p=0,00431$), comportamento semelhante encontrado 6 h após o grupo EA ($p=0,00822$).

A amostragem inicial, no grupo LPS, indicou que os tratamentos 8 g e 12 g estimularam a atividade da catalase em relação ao tratamento controle ($p=0,0044$). Após injeção com LPS, o tratamento 4 g ($p=0,0175$) e 8 g ($p=0,0144$) mostrou menor atividade nas amostragens 1 h, 3 h, a partir de 6 h o tratamento 4 g mostrou retorno aos valores basais, perfil semelhante no tratamento 8 g ($p=0,0002$; $p=0,0170$).

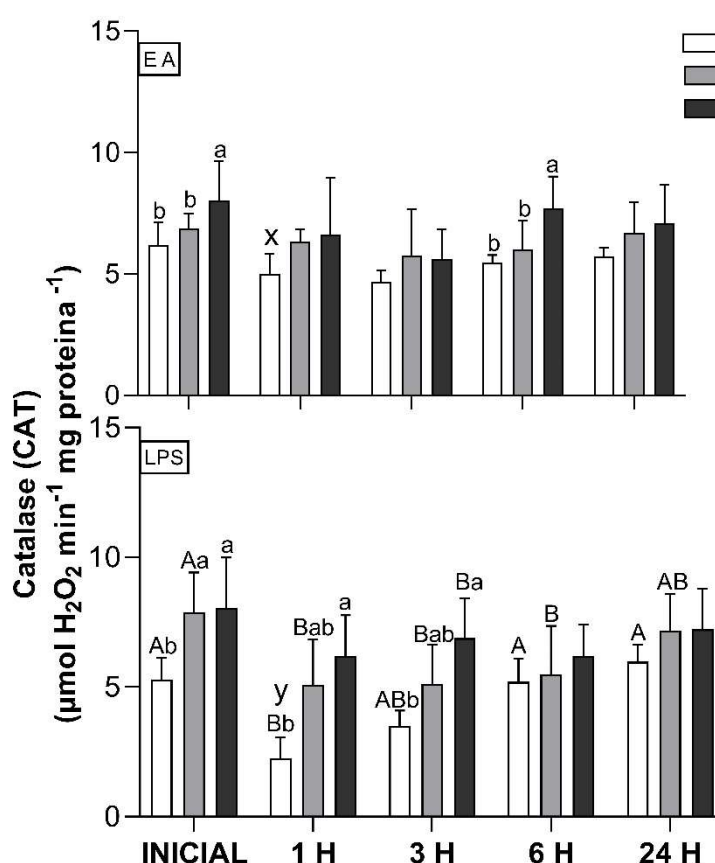


Figura 13. Atividade de catalase de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.4.4 Atividade hepática de superóxido dismutase (SOD) (Fig. 14)

A atividade da SOD demonstrou aumento nos tratamentos 8 g e 12 g após 15 de alimentação em relação ao tratamento 4 g ($p=0,008$), comportamento semelhante observado nas amostragens seguintes 1h ($p=0,0001$), 3 h ($p=0,0001$), 6 h ($p=0,0001$) e 24 h ($p=0,0001$).

No grupo LPS, a inclusão de metionina nas concentrações 8 g e 12 g apresentaram comportamento semelhante de aumento da atividade após 15 de alimentação em relação ao tratamento 4 g ($p=0,0294$). Após a injeção, foi observado diminuição na atividade da SOD nos tratamentos 4 g e 8 g ($p=0,0088$), enquanto no tratamento 12 g este comportamento foi encontrado 6 h ($p=0,0443$).

Entre os grupos, o estresse agudo diminuiu a atividade da SOD no tratamento 4 g após 3 h ($p=0,0006$), 6 h ($p=0,0182$) e 24 h ($p=0,0318$), enquanto o tratamento 8 g demonstrou diminuição na atividade 3 h ($p=0,0001$) e 24 h ($p=0,0257$).

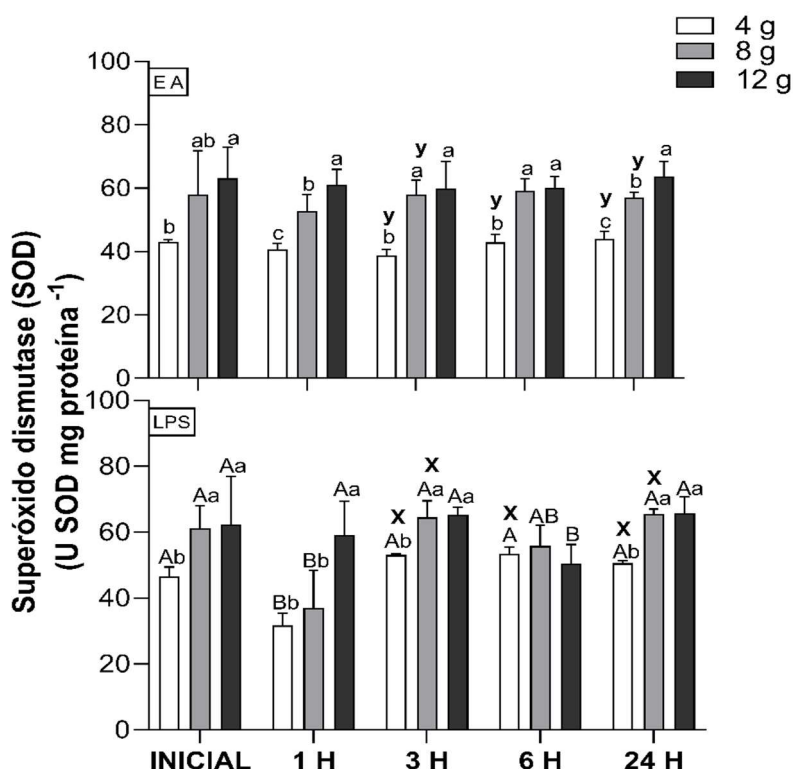


Figura 14. Atividade da superóxido dismutase de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

3.4.5 Peroxidação Lipídica (LPO) (Fig. 15)

No grupo EA, a peroxidação lipídica foi maior no tratamento controle 1 h ($p=0,0001$), 3 h ($p=0,0002$), 6 h ($p=0,001$), em relação aos tratamentos com suplementação de metionina. Após 24 h do estressor agudo, a LPO foi maior no tratamento controle mostrando um comportamento semelhante ao encontrado na amostragem basal.

A injeção de LPS aumentou a LPO nos tratamentos 4 g e 8 g após 1 h ($p=0,0138$), 3 h ($p=0,0002$) e 6 h ($p=0,0347$), retornando aos valores iniciais após 24 h ($p=0,0184$), enquanto o tratamento 12 g não demonstrou diferença estatística.

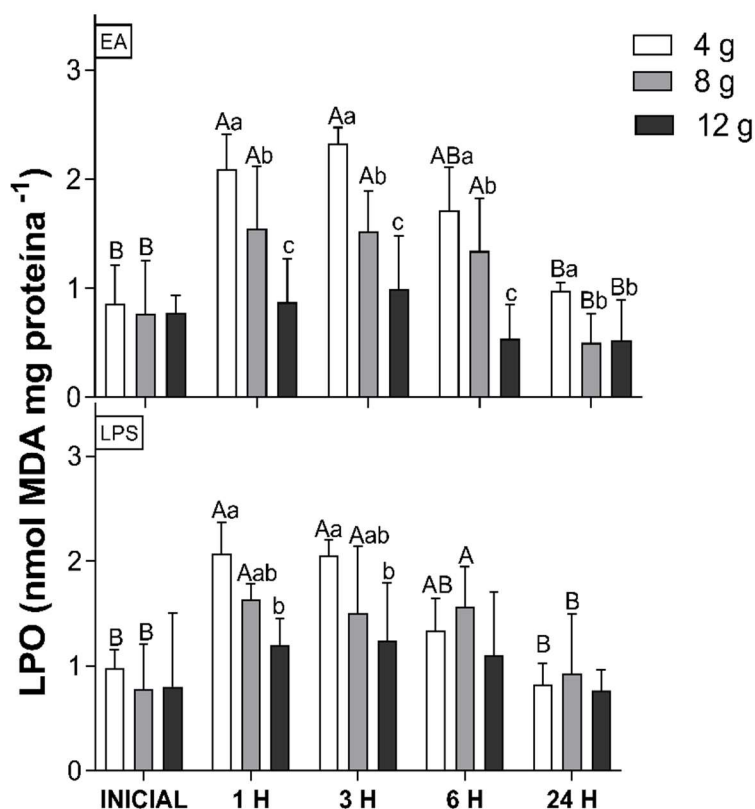


Figura 15. Peroxidação lipídica de pacus alimentados com dietas contendo metionina (Controle 4g, 8 g e 12 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4. Discussão

Para avaliar o efeito da inclusão de metionina em respostas metabólicas, de estresse, de imunidade inata e de indicadores do sistema antioxidante, juvenis de pacu foram alimentados com dietas contendo suplementação de metionina e expostos a um manejo de exposição aérea e à inoculação de LPS, dois manejos estressores que são conhecidos por atuar no sistema imune. Como ambos são sistemas de alto custo energético, o sistema antioxidante também foi monitorado para avaliar a resposta do estado redox de células hepáticas.

Estudos recentes têm mostrado o importante papel dos aminoácidos em diversas funções fisiológicas que incluem, além da síntese de proteínas, síntese hormonal, metabolismo lipídico e respostas imunes e do sistema antioxidante (Wang *et al.*, 2023). A metionina é um destes AA (Tesseraud *et al.*, 2009).

Em relação aos indicadores metabólicos, as concentrações de metionina oferecidas durante 15 dias não influenciaram as concentrações de colesterol e triglicerídeos, mas reduziram o depósito de lipídeos no fígado e músculo como observado nos peixes que receberam 8g e 12g de metionina, como pode ser observado nos peixes SE.

As concentrações de triglicerídeos foram reduzidas nos peixes EA e LPS. Na análise de lipídeos teciduais, uma hora após a exposição aérea e injeção de LPS, também ocorreu redução da quantidade de lipídeo hepático, em relação aos peixes não estressados, e entre os tratamentos dietário de EA a redução foi mais intensa na suplementação com 8g de metionina.

A redução nas concentrações de triglicerídeos nos grupos EA e LPS pode ser explicada devido a mobilização de lipídeos para atender as demandas do processo de adaptação da homeostase fisiológica (Chang *et al.*, 2006). Em relação à diminuição de depósitos de lipídeos teciduais por efeito da metionina, os aminoácidos não atuam apenas na síntese de proteínas, mas também atuam como sinais moleculares que regulam o metabolismo energético e os sistemas imunológico e antioxidante em animais (Wang *et al.*, 2023). Estudo prévio com suínos (Castellano *et al.*, 2015) mostrou que a metionina, aminoácido limitante da taxa para a síntese de proteínas, apresenta papéis não proteinogênicos no metabolismo lipídico e no estresse oxidativo. Uma taxa aumentada de acúmulo de lipídios foi relatada em suínos em crescimento alimentados com uma dieta

deficiente em metionina. Ji *et al.* (2021) estudaram a resposta de *Megalobrama amblycephala* juvenil a diferentes níveis de metionina na dieta. Dependendo da concentração utilizada, a metionina aumentou o conteúdo lipídico hepático, enquanto diminuiu o conteúdo lipídico muscular, por meio de alteração dos níveis de mRNA da sintetase de ácidos graxos e acetil-CoA carboxilase, e promoveu β -oxidação de ácidos graxos e a lipólise no fígado e no músculo, aumentando os níveis de mRNA da carnitina palmitoil transferase, lipoproteína lipase e lipase. A metionina pode regular o metabolismo da glicose e lipídios em peixes. Estudo *in vitro* com células musculares primárias de *Scophthalmus maximus* L. sob privação de metionina mostraram expressão inibida de genes relacionados à glicólise e síntese de ácidos graxos, ao mesmo tempo em que induziram a β -oxidação de ácidos graxos (Jiang *et al.*, 2017). Entretanto, outros estudos mostraram que a resposta do metabolismo de nutrientes à metionina dietética promove respostas espécie-específicas. Em juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas deficientes em metionina mostrou uma relação positiva com a expressão hepática de mRNA da fase negativa com os níveis relativos de expressão de mRNA de *cpt1* e frutose-1,6-bifosfatase (*fbp*) (Rolland *et al.*, 2016), enquanto a deficiência e o excesso de metionina induziram acúmulo de lipídio no fígado de *Pelteobagrus fulvidraco* (Song *et al.*, 2018). Esses dados sugerem que a resposta dos peixes à metionina é complexa e exige mais estudos para entendimento dos mecanismos envolvidos.

Em relação às respostas de estresse, os resultados deste estudo mostraram que as concentrações de metionina testadas e os manejos considerados agentes estressores influenciaram o comportamento do cortisol circulante.

A ocorrência de estresse foi confirmada pelo aumento da concentração plasmática de cortisol e da glicose imediatamente após o estressor agudo e a injeção de LPS. As concentrações de 8 g e 12 g atenuaram o efeito do estresse agudo e da injeção de LPS 1h após a exposição. Este efeito persistiu até 6h no caso da exposição aérea, enquanto, neste tempo, as concentrações de cortisol nos peixes injetados com LPS diminuíram em peixes de todos os tratamentos dietários, inclusive do controle. Sobre o efeito do estressor agudo, segundo Aragão *et al.* (2008), que expuseram *Solea senegalensis* a manejo de exposição aérea, as concentrações de metionina no plasma mostraram que seu requerimento nos

peixes estressados se alterou, o que, provavelmente reflete síntese de proteínas ou de outros compostos específicos da resposta de estresse.

A natureza bioquímica e a funcionalidade fisiológica de aditivos da dieta, incluindo AAs, afetam fortemente a resposta ao estresse e, de fato, podem atuar como neurotransmissores ou precursores hormonais, substratos energéticos, cofatores e outros elementos essenciais, implicando em respostas de vários sistemas (Herrera *et al.*, 2019).

No presente estudo, a glicose aumentou 1 hora após o estressor e a injeção com LPS, como relatado por Faria *et al.* (2021), em pacu, após estresse agudo por perseguição, e por Aragão *et al.* (2008) após exposição aérea de *Solea senegalensis*. As respostas decorrentes do estresse agudo são geralmente medidas por análises plasmáticas do cortisol e glicose (Vargas-Chacoff *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2012; De la Roca *et al.*, 2017), que são os principais indicadores de estresse em peixes (Martínez-Porchas *et al.*, 2009; Abdel-Ghany *et al.*, 2023).

Em relação aos parâmetros imunológicos, a atividade respiratória dos leucócitos não foi afetada pelas concentrações de metionina, mas pelo agente estressor agudo e injeção de LPS, comportamento observado por Azeredo *et al.* (2017), em *Dicentrarchus labrax*, no qual a atividade respiratória dos leucócitos sofreu influência apenas da injeção da bactéria *Photobacterium damsela* e não da suplementação de metionina. A atividade da lisozima diminuiu 6h após o estressor agudo e injeção de LPS nos peixes que receberam 12g de metionina, demonstrando um efeito mais tardio do AA, na resposta de estresse. Em *Solea senegalensis*, Costas *et al.* (2011) observaram o mesmo comportamento após o estresse por perseguição, demonstrando uma ação imunossupressora de longo prazo. Já, considerando a suplementação de metionina, He *et al.* (2017) observaram maior atividade da lisozima e do sistema complemento em juvenil de *Oreochromis niloticus* que receberam a suplementação, mas é importante destacar que o tratamento dietário foi de 8 semanas, enquanto no presente estudo foi de apenas 15 dias.

A inclusão de 12 g de metionina teve efeito imunoestimulantes na atividade hemolítica do sistema complemento no grupo EA, resultado semelhante encontrado em juvenis de *Dicentrarchus labrax* por Machado *et al.* (2018), que após oferta de duas semanas de dietas contendo 10g, observaram aumento da atividade do sistema complemento. No grupo LPS, os peixes alimentados com 8g e 12g

mostraram maior ativação imunitária. Diferentemente, Kuang *et al.* (2012) encontraram maior ativação dos componentes C3 e C4 após o desafio bacteriano em carpas alimentadas com concentrações menores de metionina (5,1 g e 7,0 g). A metionina demonstrou modular o sistema imunológico de em peixes, melhorando as respostas imunes celular e humoral (Machado, *et al.*, 2015). Entretanto, as respostas podem ser espécie-específicas, além de protocolos experimentais diferentes.

A produção de espécies reativas de oxigênio originadas como subprodutos naturais do metabolismo celular, é fundamental para as funções e defesa das células (Li *et al.*, 2022), e a partir do desequilíbrio entre estes componentes e os mecanismos naturais antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo (Wu *et al.*, 2014; Biller e Takahashi, 2018).

As enzimas antioxidantes SOD, CAT, GST e GSH modulam produção de radicais livres, evitando a peroxidação lipídica e mantendo a estrutura e a função celular (Surai *et al.*, 2001; Ognjanovic *et al.*, 2010).

Neste estudo, o estresse agudo causado pela exposição aérea durante 2 minutos diminuiu a atividade antioxidante no fígado, observada pela diminuição das atividades GSH, GST e CAT, acompanhada pelo aumento nos níveis de LPO, resultado do desequilíbrio antioxidante no organismo. Por sua vez, em nosso estudo, a SOD, que se apresenta como a primeira enzima antioxidante a ser acionada em uma situação de estresse oxidativo (Souza *et al.*, 2019), não sofreu alterações nas suas concentrações após o estressor aéreo. Estudos avaliando a relação entre os agentes estressores físicos e as repostas antioxidantes, ainda são escassos, uma vez que a grande maioria avalia a homeostase redox celular de peixes expostos a componentes tóxicos (Stoliar e Lushchak, *et al.*, 2012; Mahboob, 2013; Saddick *et al.*, 2017; Khalil *et al.*, 2017). Em juvenis de *Piaractus mesopotamicus*, a exposição aérea durante 3 minutos causou estresse oxidativo no fígado com aumento nos níveis de LPO e, diminuição da atividade da CAT e GSH (Faria *et al.*, 2021). Em paulistinha *Danio rerio*, após indução ao estresse com LPS, houve aumento do marcador malondialdeído (MDA) (Moniruzzaman *et al.*, 2022), sendo este o produto da peroxidação lipídica LPO. Resultado semelhante encontrado neste estudo, pois houve aumento da LPO nas amostragens posteriormente a injeção contendo LPS. Os altos níveis de LPO hepática ocasionaram a diminuição das enzimas antioxidantes SOD, GSH, CAT e GST,

demonstrando que houve estresse oxidativo. Em juvenis de tainha *Mugil cephalus*, foram encontradas alterações significativas nas respostas antioxidantes, com diminuição da CAT e SOD após injeção com LPS, dependendo da dose e tempo de administração do inoculo (Abdel-Mageid, *et al.*, 2020). Após a injeção com LPS, juvenis de *Megalobrama amblycephala* excederam a produção de ERO, resultando em peroxidação lipídica (Chen *et al.*, 2021), pois o organismo ao ser infectado por patógenos, induz o estresse oxidativo em decorrência do aumento do consumo de oxigênio durante a fagocitose, realizada pelos leucócitos (Biller e Takahashi, 2018; Wu *et al.*, 2014). Peixes quando expostos a agente estressores, em associação com alimentação contendo nutrientes potencialmente eficazes contra imunossupressão e estresse oxidativo, apresentam respostas satisfatórias do ponto de vista de bem-estar (Ashraf *et al.*, 2020). A inclusão de metionina nas dietas de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) na concentração de 7 g aumentou a atividade hepática da CAT e GSH (Coutinho *et al.*, 2017). Enquanto, neste estudo, a inclusão de metionina na concentração na 12 g estimulou a CAT e GST após 15 dias de alimentação. A metionina é um dos aminoácidos necessários para a síntese da glutathione (Coutinho *et al.*, 2017), devido a sua conversão em cisteína, por meio do processo de transsulfuração (Brown-Borg *et al.*, 2005). Além disso, a GSH atua como cofator necessário para a atividade da SOD (Perez-Jimenez *et al.*, 2012), permitindo a neutralização dos radicais livres no estresse oxidativo (Feng *et al.*, 2011). A concentração de metionina pode afetar a geração de GSH, que por sua vez, repercute no estresse oxidativo (Li *et al.*, 2007, Métayer *et al.*, 2008).

5. Conclusão

A inclusão de metionina modulou o cortisol após o estressor agudo e a injeção de LPS, mostrando um efeito de atenuação do hormônio, evitando assim, altas elevações. Ainda, a metionina estimulou a produção de proteínas da lisozima e do sistema complemento, como também atenuou o estresse oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica, com estímulo das enzimas antioxidantes. O estressor agudo e a injeção de LPS modulou respostas metabólicas, como inibição da lipogênese no fígado e no músculo. Recomendamos a inclusão de 12 g de metionina

6. Referências

- ABDEL-GHANY, Heba M.; EL-SISY, Doaa M.; SALEM, Mohamed El-S. A comparative study of effects of curcumin and its nanoparticles on the growth, immunity and heat stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2523, 2023.
- AEBl, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. v. 105, n. 2, p. 121-126, 1984.
- ANDERSON, James L.; ASCHE, Frank; GARLOCK, Taryn. Economics of aquaculture policy and regulation. **Annual Review of Resource Economics**, v. 11, p. 101-123, 2019.
- ARAGAO, C. et al. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Amino Acids**, v. 34, p. 143-148, 2008.
- AZEREDO, Rita et al. Neuroendocrine and immune responses undertake different fates following tryptophan or methionine dietary treatment: tales from a teleost model. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1226, 2017.
- BASIC, Dean et al. Short-and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 388, p. 8-13, 2013.
- BEUTLER., E., DURAN O., KELLY., B.,M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. p. 861,882, 1963.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., SAITA, M. V., GIMBO, R. Y. URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology*, vol. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n.08, p. 911-917.
- BOYD, Claude E.; MCNEVIN, Aaron A.; DAVIS, Robert P. The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. **Food security**, v. 14, n. 3, p. 805-827, 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.
- CASTELLANO R, Perruchot M-H, CondeAguilera JA, van Milgen J, Collin A, Tesseraud S, Mercier, Y., Gondret, F. A Methionine Deficient Diet Enhances Adipose Tissue Lipid Metabolism and Alters Antioxidant Pathways in Young Growing Pigs. *PLoS ONE* 10(7), 2015.
- CATANESI, M.; BRANDOLINI, L., D'ANGELO, M., BENEDETTI, E.; TUPONE, M.G., ALFONSETTI, M., CABRI, E., IACONIS, D., FRATELLI, M., CIMINI, A.,

CASTELLI, V., ALLEGRETTI, M. L-Methionine Protects against Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Antioxidants*, 1467, 2021.

Chang, Y.M., Cao, D.C., Sun, X.W., Liang, L.Q. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. *Chin. J. Fish.*, 2, 71–75, 2006.

CIJI, Alexander; AKHTAR, Mohammad S. Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2190-2247, 2021.

COSTAS, Benjamín et al. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, v. 316, n. 1-4, p. 68-76, 2011.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 49, p. 275-285, 2016.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. Selenium nanoparticles as a natural antioxidant and metabolic regulator in aquaculture: a review. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1364, 2021.

FARIA, C. F. P. dos Reis Martinez, C. B., Takahashi, L. S., de Mello, M. M. M., Martins, T. P., & Urbinati, E. C. 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.

DE LA ROCA, E. et al. Daily activity rhythms and the stress-related response in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). **Physiology & behavior**, v. 173, p. 272-278, 2017.

EBENEEZAR, Sanal et al. Optimum dietary levels of lysine and methionine reduces the crude protein requirement and improves growth in Snubnose pompano (*Trachinotus blochii*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 290, p. 115370, 2022.

ELMADA, C.Z., Huang, W., Jin, M., Liang, X., Mai, K., Zhou, Q. The effect of dietary methionine on growth, antioxidant capacity, innate immune response and disease resistance of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture Nutrition*; 1163–1173, 2016.

FEDERICI, Gillian; SHAW, Benjamin J.; HANDY, Richard D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415-430, 2007.

GONZALEZ-SILVERA, Daniel et al. Effects of the dietary tryptophan and aspartate on the immune response of meagre (*Argyrosomus regius*) after stress. **Fishes**, v. 3, n. 1, p. 6, 2018.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. 5th ed. Oxford University Press, USA, 2015.

HARSIJ, Mohammad; KANANI, Hosna Gholipour; ADINEH, Hossein. Effects of antioxidant supplementation (nano-selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. **Aquaculture**, v. 521, p. 734942, 2020.

HE, Ju Yun et al. Effect of dietary l-methionine concentrations on growth performance, serum immune and antioxidative responses of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture research**, v. 48, n. 2, p. 665-674, 2017.

HEDAYATI, Seyed Aliakbar et al. Effect of dietary *Lactobacillus casei* on physiometabolic responses and liver histopathology in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to iron oxide nanoparticles. **Biological trace element research**, v. 200, n. 7, p. 3346-3354, 2022.

HERRERA, M. et al. Physiological and metabolic effects of a tryptophan-enriched diet to face up chronic stress in meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture**, v. 522, p. 735102, 2020.

HERRERA, Marcelino et al. Physiological short-term response to sudden salinity change in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, p. 1741-1751, 2012.

HÖGLUND, Erik et al. Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 786-789, 2007.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 3-24, 2019.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future researches. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 4, p. 2091-2108, 2020.

HOSEINI, Seyyed Morteza; REVERTER, Míriam. Efeitos promotores de saúde de aminoácidos em peixes. In: **Avanços biotecnológicos na gestão da saúde da aquicultura**. Cingapura: Springer Nature Cingapura, 2022. p. 493-533.

HOSSAIN, Md Sakhawat; KOSHIO, Shunsuke; KESTEMONT, Patrick. Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1028-1053, 2020.

Ji, K., Liang, H., Ren, M., Ge, X., Pan, L., Yu, H. Nutrient metabolism in the liver and muscle of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in response to dietary methionine levels. **Scientific Reports**, 11:23843, 2021.

JIANG, H. W. et al. Nutrient sensing and metabolic changes after methionine deprivation in primary muscle cells of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J. Nutr. Biochem.* 50, 74–82, 2017

KAISER, Frederik et al. Dietary Supplementation with Chromium DL-Methionine Enhances Growth Performance of African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 2023, 2023.

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

KIRON, Viswanath. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.

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

KUANG, Sheng-Yao et al. Effects of graded levels of dietary methionine hydroxy analogue on immune response and antioxidant status of immune organs in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 5, p. 629-636, 2012

MACHADO, Marina et al. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 2, p. 353-362, 2015.

MACHADO, Marina et al. Dietary methionine improves the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status, inflammatory response, and disease resistance. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2672, 2018.

MAHDY, Mohammed A. et al. Uso de leveduras na nutrição e imunoestimulação da aquicultura: uma revisão. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 5, pág. 59-65, 2022.

MARTINEZ-PORCHAS, Marcel; MARTINEZ-CORDOVA, Luis R. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

MCCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biology and Chemistry* v. 244: p. 6049-6055, 1969.

MELLO, M.M.M., FARIA, C.F.P., ZANUZZO, F.S., URBINATI, E.C. β -glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated

with heat-killed *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.93, p.1076–1083, 2019.

MIR, Ishfaq Nazir et al. Synergistic effect of l-methionine and fucoidan rich extract in eliciting growth and non-specific immune response of *Labeo rohita* fingerlings against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 479, p. 396-403, 2017.

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

PERRY, G. J.; GILLAN, F. T.; JOHNS, R. B. LIPID COMPOSITION OF A PROCHLOROPHYTE 1. **Journal of Phycology**, v. 14, n. 3, p. 369-371, 1978.

POHLENZ, Camilo; GATLIN III, Delbert M. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, v. 431, p. 111-117, 2014.

Rolland, M. et al. Increasing levels of dietary crystalline methionine affect plasma methionine profiles, ammonia excretion, and the expression of genes related to the hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 198(2016), 91–99, 2016.

SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís. The concept of stress in fish. In: **Fish physiology**. Academic Press, 2016. p. 1-34.

SEALEY, Wendy M.; GATLIN III, Delbert M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops*♀ × *M. saxatilis*♂) but have limited effects on immune responses. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 4, p. 748-755, 2002.

SHARF, Yusra; KHAN, Mukhtar A. Dietary tryptophan requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth, hematological parameters, intestinal enzymes, non-specific immune response, and antioxidant capacity. **Aquaculture**, v. 562, p. 738745, 2023.

SIQUEIRA, Tagore Villarim de. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. 2017.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The determination of lysozyme. **Journal of bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949.

SONG, Y. F. et al. Upstream regulators of apoptosis mediate methionine-induced changes of lipid metabolism. **Cell. Signal.** 51(2018), 176–190, 2018.

SYAHIDAH, A. et al. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. 2015.

TESSERAUD, S., Sonia Métayer Coustard, Anne Collin, Iban Seilliez Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101, 1132–1139, 2009.

THOMAS, Jith K. et al. Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 130, p. 112-122, 2013.

TORT, Lluís. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

VARGAS-CHACOFF, Luis et al. Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different environmental salinities and stocking densities. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 9, p. 1269-1278, 2011.

Wang, L., Gao, C., Wang, B., Wang, C., Sagada, G., Yan, Y. Methionine in fish health and nutrition: Potential mechanisms, affecting factors, and future perspectives. *Aquaculture*, Volume 568, 739310, 2023.

WATERLAND, Robert A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1706S-1710S, 2006.

WENDELAAR BONGA, Sjoerd E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

Wu, P., Tang, L., Jiang, W., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S., Tang, S., Tang, W., Zhang, Y., Zhou, X., Feng, L. The relationship between dietary methionine and growth, digestion, absorption, and antioxidant status in intestinal and hepatopancreatic tissues of sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2017) 8:63, 2017.

Yada, Takashi, and Lluís Tort. "Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions." In *Fish physiology*, vol. 35, pp. 365-403. Academic Press, 2016.

ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C.; RISE, M.L.; HALL, J.R.; NASH, G.W.; GAMPERL, A.K. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, v.435, p.1-9, 2015.

CAPÍTULO 3

Sobre o efeito de triptofano em parâmetros fisiológicos de *Piaractus mesopotamicus* submetidos a estresse

RESUMO

O triptofano é um aminoácido essencial que serve como substrato para diversas substâncias bioativas importantes para o bem-estar. Ele afeta a maneira como os peixes lidam com o estresse, sendo capaz de modular respostas imunológicas. O presente estudo tem foco na avaliação das respostas fisiológicas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* submetidos a manejos estressores agudos após a ingestão de dietas suplementadas com triptofano (Trip), que constituíram os tratamentos: Tratamento Controle – 2 g de Trip kg⁻¹ de ração; Tratamento 4 g Trip kg⁻¹ de ração; Tratamento 6 g – 6 g de Trip kg⁻¹ de ração. Os peixes foram divididos em grupos que constituíram os manejos estressores: Grupo SE – sem estresse; Grupo EA – estresse agudo de exposição aérea durante 2 min; e Grupo LPS – injeção de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*). Os resultados mostraram que o cortisol circulante aumentou 1 h e 3 h após o manejo nos grupos EA e LPS, bem como as concentrações de glicose. A inclusão de triptofano (4 g e 6 g) atenuou a elevação de cortisol. A atividade respiratória dos leucócitos foi prejudicada após EA, sem ação do triptofano. A atividade da lisozima foi estimulada no tratamento 4 g após EA. Os estressores EA e LPS, bem como a suplementação de triptofano não afetaram a atividade do sistema complemento. Nos indicadores bioquímicos, a albumina foi maior nos grupos EA e LPS. A quantidade de glicogênio hepático foi reduzida pelo estresse agudo. Em síntese, o triptofano atenuou o efeito de ambos estressores, como também diminuiu as concentrações de glicose nos peixes estressados e estimulou a atividade da lisozima.

Palavras-Chaves

Estresse agudo, aminoácido, lipopolissacarídeo

ABSTRACT

Tryptophan is an essential amino acid that serves as substrate for several bioactive substances important for well-being. Furthermore, it affects the way they deal with stress, being able to modulate immune responses. The present study focuses on the evaluation of the physiological responses of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* submitted to acute stressors in view of the ingestion of diets supplemented with tryptophan. For this, commercial diets were supplemented with tryptophan at the following concentrations: Control Treatment – 2 g of Trip Kg⁻¹ of feed; Treatment 4 g Trip Kg⁻¹ of feed; Treatment 6 g – 6 g of Trip Kg⁻¹ feed. The experimental protocol also had groups of stressors: Group SE – without stress; Group EA – acute stress from air exposure for 2 min; and LPS Group – LPS injection *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection. The results showed that cortisol was elevated after 1 h in the EA and LPS group. The inclusion of tryptophan at 4 g and 6 g concentrations demonstrated to modulate cortisol. EA and LPS groups increased cortisol concentrations. Glucose concentration was higher in the EA group. Lysozyme activity was higher in the 4 g treatment 1h after the acute stressor. Complement system activity was lower in EA and LPS groups. In biochemical indicators, albumin was higher in the EA and LPS groups. Hepatic glycogen deposition was affected by acute stress. In summary, tryptophan attenuated the effect of both stressors, as well as decreased glucose concentrations in stressed fish, stimulated lysozyme activity and increased liver glycogen reserve.

Keywords

Acute stress, amino acid, lipopolysaccharides

1. Introdução

A produção aquícola está em processo de expansão à medida que a demanda mundial aumenta (Boyd *et al.*, 2022). Ao mesmo tempo, se destaca como uma atividade altamente competitiva (Siqueira, 2017; FAO, 2020) e promissora para suprir e garantir proteína de origem animal (Boyd *et al.*, 2022). Entretanto, a criação intensiva de peixes envolve muitos desafios (Martinez-Porchas e Martinez-Cordova, 2012), e faz com que os peixes passem por situações estressantes ao longo do ciclo produtivo, como alterações físico-químicas na água e manejos físicos que causam perturbações fisiológicas (Anderson *et al.*, 2019; Chowdhury e Saikia, 2020).

Barton e Iwama (1992) conceituaram o estresse advindo do manejo aquícola, como sendo o rompimento da homeostase fisiológica dos peixes, acarretando ameaça da saúde desses animais. Inicialmente, o estresse se caracteriza por respostas primárias com liberação de catecolaminas e corticosteroides (Tort, 2011). As respostas secundárias do estresse são o resultado da liberação de hormônios no sangue e nos tecidos, como comprometimento metabólico, mobilização de energia, alteração de respostas imunes e desequilíbrio hidromineral (Yada e Tort, 2016). As respostas terciárias são inibição do crescimento e redução do desempenho reprodutivo e imunológico (Schreck e Tort, 2012). Com isso, estudos a respeito dos mecanismos de defesa dos peixes cultivados e a compreensão de como nutrir e modular os componentes fisiológicos para enfrentar os desafios impostos pela produção têm sido alvo de pesquisadores em todo mundo (Dawood *et al.*, 2016; Ciji *et al.*, 2021).

A nutrição adequada é fundamental não apenas para atingir taxas de crescimento ideais (Mahdy *et al.*, 2022), mas também para manter a saúde dos peixes cultivados (Sealey e Gatlin, 2001). Além disso, a suplementação de dietas que estimulem a defesa dos animais cultivados, bem como nutrição e modulação dos componentes do sistema imunológico, vem sendo feita com vários aditivos, como ervas medicinais (Syahida *et al.*, 2015), vitaminas (Harsij *et al.*, 2020); nucleotídeos (Hossain *et al.*, 2020); minerais (Dawood *et al.*, 2021); probióticos (Hedayati *et al.*, 2022); aminoácidos (Hoseini *et al.*, 2020; Kaiser *et al.*, 2023), entre outros. Neste contexto, temos que os aminoácidos dietéticos são importantes para os peixes como substratos energéticos, para a síntese endógena de proteínas e

para regular as vias metabólicas (Hoseinie e Miriam, 2022). Em geral, vários aminoácidos estão envolvidos na imunocompetência e resistência a doenças em peixes (Kiron *et al.*, 2012). Dentre estes, o triptofano possui um amplo papel fisiológico, incluindo modulação da resposta ao estresse, do sistema antioxidante e das respostas imunes (Hoglund *et al.*, 2007; Hoseini *et al.*, 2019). O triptofano tem sido amplamente estudado com um aliado da prevenção ao estresse de manejo nas pisciculturas (Basic *et al.*, 2013; Gonzalez-Silveira *et al.*, 2018; Herrera *et al.*, 2020; Sharf *et al.*, 2023).

Com base no exposto, o presente trabalho investigou o efeito da inclusão de triptofano na dieta de juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estresse agudo por exposição aérea e a desafio com lipopolissacarídeo (LPS) em indicadores metabólicos, de estresse, da imunidade inata, bioquímicos e do sistema antioxidante.

2. Material e Métodos

O procedimento experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo n° 3959/22) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal, e foi realizado conforme os princípios éticos em experimentação animal segundo o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Aclimação e manejo dos peixes

O experimento foi realizado no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – FCAV, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus Jaboticabal. Foram utilizados 270 juvenis de pacu com peso médio de $85,2 \pm 12,31$ g e comprimento $13,5 \pm 2,37$ cm, fornecidos pelo Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em caixas de polietileno, com volume útil de 100 litros, em um sistema de fluxo contínuo de água e aeração constante. Durante 15 dias,

os peixes foram aclimatados às condições experimentais, recebendo ração comercial (32% PB e 3.200 kcal EB/kg). Neste período, o consumo de ração foi mensurado para a determinação do percentual de arraçoamento diário com base na biomassa.

2.2 Processamento das dietas experimentais

As dietas experimentais foram preparadas pela moagem de ração comercial extrusada NUTRIPISCIS TR 32 (32% PB e 3.200 Kcal EB/kg), para incorporação do triptofano. As dietas experimentais foram determinadas a partir da concentração inicial de triptofano presente na ração comercial, aproximadamente 2 g por kg de ração, sendo assim: Tratamento Controle: ração contendo 2 g/kg; Tratamento 4 g: ração enriquecida 2X (4 g de Triptofano/kg de ração) e Tratamento 6 g: ração enriquecida 3X (6 g de Triptofano/kg de ração). Em seguida, o alimento foi umedecido e passado por uma peletizadora. Os peletes foram secos em estufa a 40 °C por 24 h, resfriados e armazenados em sacos plásticos à 20°C.

2.3 Delineamento experimental

Após o período de aclimação, os peixes começaram a receber as dietas correspondentes aos três tratamentos dietários:

Tratamento Controle – ração comercial contendo 2 g de triptofano (de acordo com a especificação do fabricante);

Tratamento 4 g - ração enriquecida 2X a partir da ração comercial (4 g de triptofano/kg de ração);

Tratamento 6 g – ração enriquecida 3X a partir da ração comercial (6 g de triptofano /kg de ração).

Cada tratamento continha nove réplicas, sendo três réplicas para cada grupo estressor:

Grupo SE – sem estresse

Grupo EA – peixes submetidos ao estresse agudo de exposição aérea durante 2 minutos (suspensão ao ar de todos os peixes de cada réplica);

Grupo LPS – peixes submetidos a injeção intraperitoneal com solução de lipopolissacarídeo LPS (contendo $1.500 \mu\text{g kg}^{-1}$ de LPS de *Escherichia coli*).

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (10:00 e 16:00), durante 15 dias, até a saciedade aparente. Durante o período experimental, a temperatura ($27,64 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($5,6 \pm 0,14 \text{ mg/L}$) e pH ($7,2 \pm 0,38$) foram mensurados duas vezes na semana ao longo de todo experimento.

2.4 Amostragens e análises laboratoriais

Após 15 dias de alimentação experimental, e 24 h sem ingestão de alimentos, peixes de todas as caixas foram amostrados para caracterização das condições basais do experimento. Em seguida, os peixes dos respectivos grupos foram expostos ao agente estressor. A amostragem basal (inicial) foi composta por 27 peixes, sendo 9 de cada tratamento, enquanto as demais amostragens foram compostas por 6 peixes de cada tratamento/agente estressor (2 peixes de 3 réplicas, $n=6$). Em cada amostragem, os peixes foram anestesiados com solução de eugenol (200 mg mL^{-1}), e a coleta de sangue foi realizada via punção de vasos caudais com seringas sem anticoagulante, e o sangue foi adicionado em microtubos e tubos de vidro, e em seguida os peixes foram submetidos a pesagem e medição. Posteriormente, os peixes foram eutanasiados por seccionamento medular para remoção do fígado e fração do músculo (aproximadamente 2 cm). O fígado e a gordura foram pesados para determinação dos índices hepatossomático e gordura visceral. As amostras teciduais foram mantidas a -20°C para posterior análise de lipídeo hepático e muscular, glicogênio hepático e indicadores do sistema antioxidante.

2.4.1 Indicadores de estresse

A análise de cortisol foi realizada por ensaio imunoenzimático com o kit DRG® (Cortisol Elisa - Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Ref. EIA 1887, Springfield, Estados Unidos). A concentração de glicose foi determinada com kit comercial (Labtest® – Glicose Liquiform, Ref. 133, Minas Gerais, Brasil).

2.4.2 Indicadores de imunidade inata

No sangue total foi determinada a atividade respiratória dos leucócitos, seguindo a metodologia proposta por Anderson e Siwicki (1995) modificado para o pacu (Biller-Takahashi, et al., 2013). A atividade de lisozima foi determinada por ensaio proposto por Smolelis e Hartsell (1949) modificada por Zanuzzo et al. (2015), com base na lise de *Micrococcus lysodeikticus*, medida pela redução da absorbância da solução à 450 nm durante 10 minutos à cada 5 minutos. A atividade hemolítica do sistema complemento foi determinada de acordo com a metodologia modificada para pacu, proposta por Zanuzzo et al. (2015).

2.5 Indicadores Metabólicos

Para determinação das concentrações de triglicerídeo e colesterol, foi usado o método colorimétrico, por meio de kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante (Labtest® – Liquiform, referência 87 e 76, respectivamente). A determinação de lipídeo hepático e muscular seguiu método proposto por Bligh e Dyer (1959). O glicogênio hepático foi determinado de acordo com Perry *et al.*, (1998). Os índices somáticos foram mensurados de acordo com as fórmulas:

- $IHS = (\text{peso do fígado/peso do peixe}) * 100$
- $IGVS = (\text{peso da gordura visceral/peso do peixe}) * 100$

2.6 Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

A determinação da concentração de proteína seguiu a metodologia proposta por Bradford (1976), que a partir de amostras de proteínas acrescenta-se o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Ref. 27815, St Louis, MO, USA), e utiliza albumina bovina como padrão (Sigma-Aldrich, Ref. 4919-5G, St Louis, MO, USA). A leitura foi realizada à 595 nm, utilizando um leitor de microplacas (Biotek Epoch 2 Microplate Reader).

A concentração de glutathiona (GSH) seguiu a metodologia proposta por Beutler *et al.* (1963), usando o ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB – Reagente de Ellman (Sigma-Aldrich, Ref. D21820-5G, St Louis, MO, USA). A reação da GSH com DTNB gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela, avaliado pela absorbância a 405 nm (Biotek Epoch 2 Microplate Reader).

A atividade da glutathionas-transferase (GST) foi determinada de acordo com Keen *et al.* (1976). O substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reduz a glutathiona (GSH) para formar glutathiona-2,4-nitrobenzeno e a leitura da absorbância é feita a 340 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan Ascent 354). A atividade da GST é expressa em nmol por mg de proteína.

A atividade enzimática da catalase (CAT) seguiu a metodologia proposta por Aebi (1984), que consiste no consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela catalase, gerando água e oxigênio. A absorbância foi mensurada em espectrofotometria a 240nm (Biotek Epoch 2 Microplate Reader), durante 15 segundos por 5 minutos e expressa em $mmol\ minuto^{-1}\ mg\ proteína^{-1}$.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada seguindo a metodologia de McCord e Fridovich (1969), na qual determina a inibição da taxa de redução do citocromo C (Sigma-Aldrich, Ref. C2037, St Louis, MO, USA) pelo radical superóxido via sistema xantina/xantina oxidase, a 550 nm, 25°C em leitor de microplaca (Biotek Epoch 2 Microplate Reader). A atividade da SOD é expressa em $mg\ proteína^{-1}$, uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima que promove inibição de 50% da taxa de redução do citocromo c.

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Federici *et al.*, (2007), pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As concentrações de TBARS foram expressas em nmol de MDA $mg\ de\ proteína^{-1}$.

3. Análise estatística

O experimento foi desenvolvido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial 5x3x3 (cinco tempos de amostragem x 3 tratamentos dietário x 3 grupos de manejo). Os dados foram testados quanto a normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) e foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para comparação das médias foi utilizado o teste Tukey, com significância $p < 0,05$ pelo SAS 9.0.

4. Resultados

4.1. Indicadores de estresse

4.1.1 Concentração plasmática de cortisol (Fig. 1)

No Grupo EA, 1 h após o estressor, o cortisol aumentou em todos os tratamentos, com retorno a valores iniciais a partir de 3 h (tratamento 4 g $p=0,0001$; tratamento 6 g $p=0,0001$), sendo que o tratamento controle apresentou as maiores concentrações ($p=0,0001$). A inclusão de triptofano durante 15 dias reduziu o aumento do cortisol após 1 h, 3 h e 6 h do estressor agudo (tratamentos 4 g e 6 g ($p=0,0316$; $p=0,0023$; $p=0,0017$, respectivamente).

Os peixes do grupo LPS apresentaram aumento das concentrações de cortisol 1 h, 3 h e 6 h após a injeção em todos os tratamentos e recuperação dos valores iniciais às 24 h (controle $p=0,0001$; 4 g $p=0,0001$; 6 g $p=0,0007$). A alimentação com triptofano reduziu o aumento do cortisol 1 h após a inoculação, nos peixes que receberam 4 g e 6 g ($p=0,0001$).

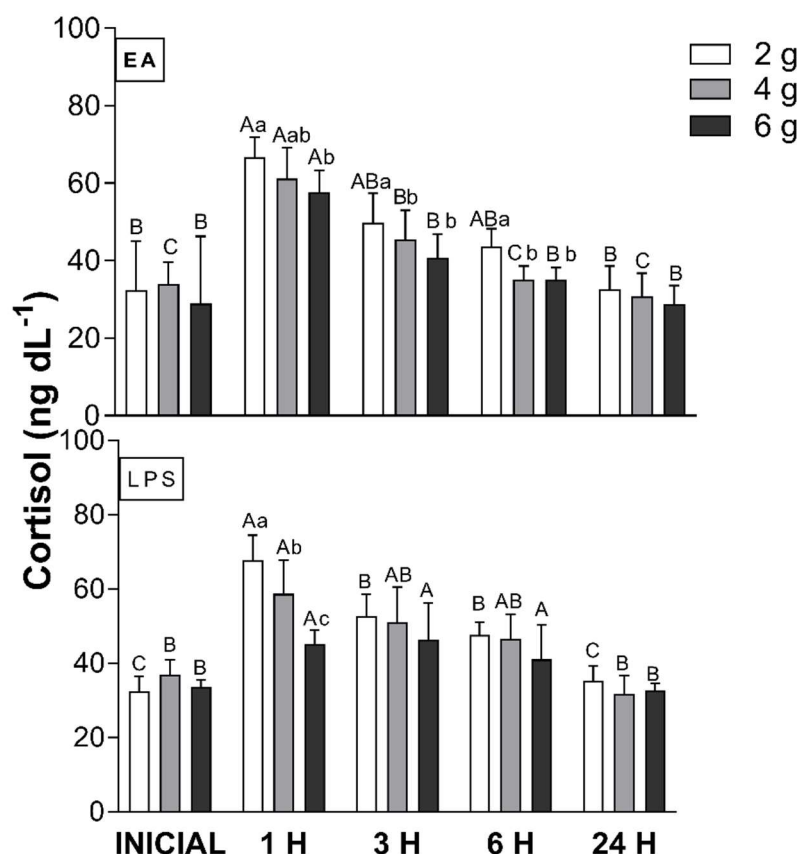


Figura 1. Concentrações plasmáticas de cortisol em pacus alimentados com dietas contendo Triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

4.1.2 Concentração plasmática de glicose (Fig. 2)

As concentrações plasmáticas de glicose no Grupo EA apresentaram pico de elevação 1 h e 3 h após o estressor em todos os tratamentos (controle $p=0,0006$; 4 g $p=0,0001$; 6 g $p=0,0001$, com retorno às concentrações basais após 6 h nos

peixes que receberam suplementação de triptofano e após 24 h nos peixes controle ($p=0,0004$).

No grupo LPS, a injeção de LPS aumentou as concentrações de glicose 1 h, 3 h e 6 h, em todos os tratamentos, com recuperação dos valores iniciais às 24 h (Controle $p=0,0006$; 4 g $p=0,0001$; 6 g $p=0,0023$).

Comparando os grupos, as concentrações de glicose foram maiores no grupo EA após o estressor ($p=0,0001$).

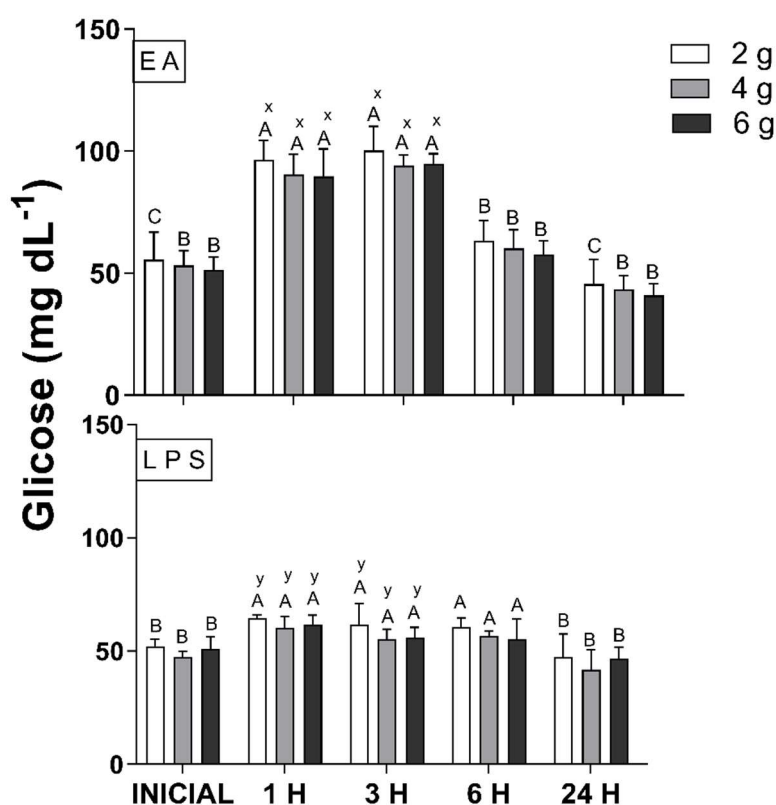


Figura 2. Concentrações plasmáticas de glicose em pacus alimentados com dietas contendo Triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4.2. Indicadores de imunidade inata

4.2.1 Atividade respiratória dos leucócitos (Fig. 3)

No grupo EA, a atividade respiratória dos leucócitos apresentou valores menores em todos os tratamentos dietários 1 h após o estresse (2 g $p=0,0105$; 4 g $p=0,0082$; 6 g $p=0,0005$), com retorno ao comportamento basal a partir de 3 h.

Entre os grupos, os peixes expostos ao estressor agudo foram os únicos que apresentaram redução da atividade respiratória dos leucócitos 1h após o estresse em níveis mais baixos que dos outros grupos ($p=0,0181$).

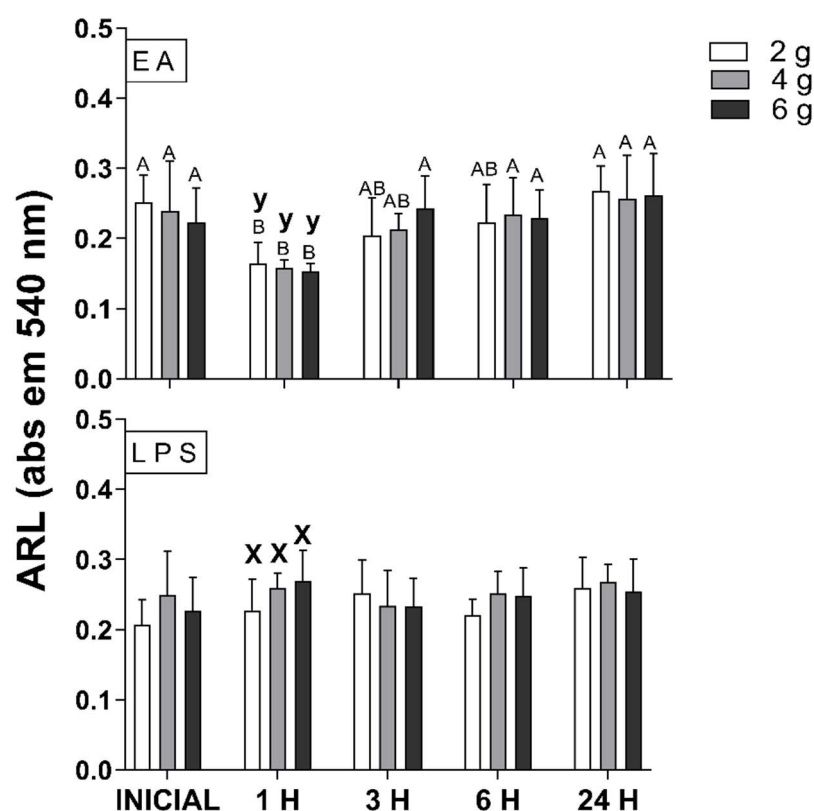


Figura 3. Atividade respiratória dos leucócitos em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4.2.2 Atividade de lisozima (Fig. 4)

A atividade da lisozima no grupo EA aumentou nos peixes que receberam 4 g de triptofano ($p=0,0001$), com retorno aos níveis iniciais a partir de 3 h. Nos peixes que receberam 2 g, a atividade diminuiu 1 h, 3 h e 6 h depois do estressor e retornou aos níveis iniciais às 24 h ($p= 0,0006$). Em relação ao grupo LPS, a atividade da lisozima foi menor nos peixes que receberam 6 g de triptofano ($p= 0,0048$). Após a injeção, este valor se elevou aos valores dos outros tratamentos, mas a partir de 3h a atividade foi reduzida em peixes de todos os tratamentos dietários ($p= 0,0002$).

Comparando os grupos, a maior atividade foi observada no grupo EA, 1 h após o estressor, no tratamento 4 g ($p=0,0001$).

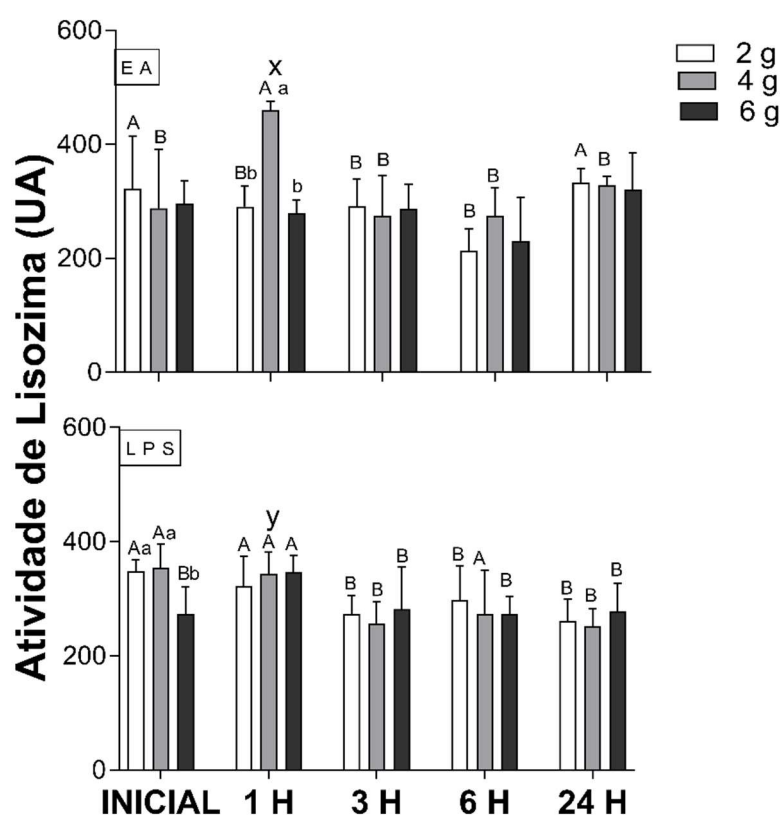


Figura 4. Atividade de lisozima em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4.2.3 Atividade hemolítica do sistema complemento (Fig. 5)

As dietas suplementadas com triptofano e os grupos de manejo não influenciaram a atividade do sistema complemento.

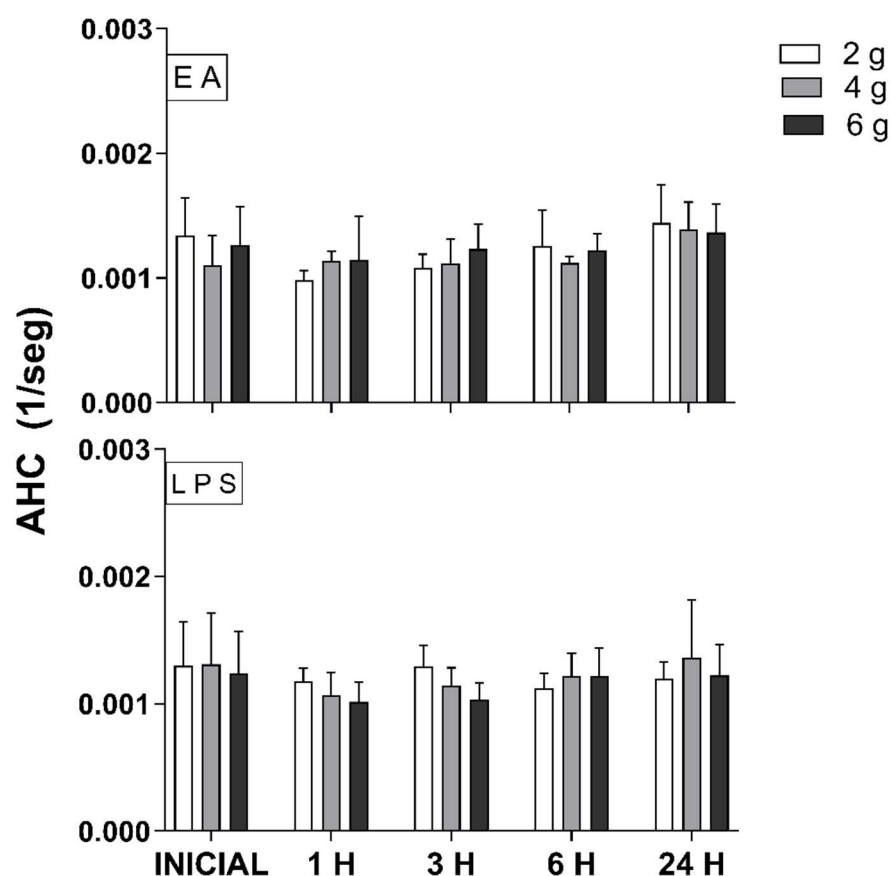


Figura 5. Atividade hemolítica do sistema complemento em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE, expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6). AHC: 1/tempo (segundos).

4.3 Indicadores metabólicos

4.3.1 Concentrações de colesterol e triglicerídeos (Fig. 6)

As concentrações de colesterol e triglicerídeos não apresentaram diferenças entre os tratamentos e entre os grupos SE, EA e LPS.

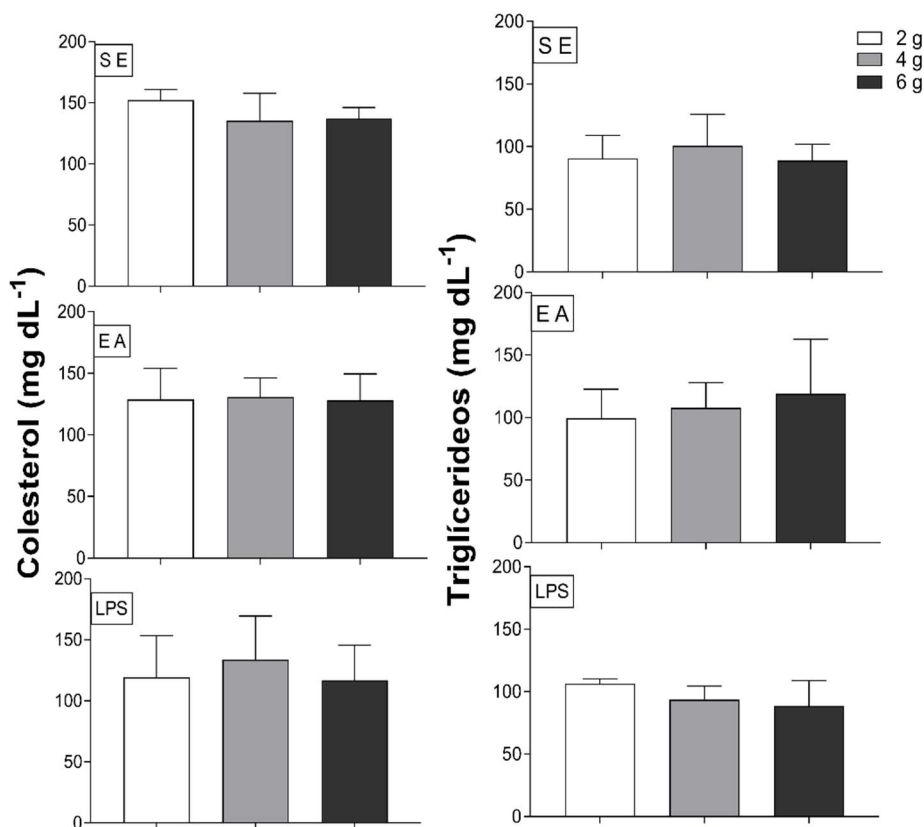


Figura 6. Concentrações de colesterol e triglicerídeos de pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE (amostragem inicial), estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

4.3.2 Concentrações de lipídeo hepático, lipídeo muscular e glicogênio hepático (Fig. 7)

As concentrações de glicogênio hepático diferiram entre os grupos, com diminuição após o estresse agudo em todos os tratamentos (controle $p=0,0040$; 4 g $p=0,0012$; 6 g $p=0,0047$).

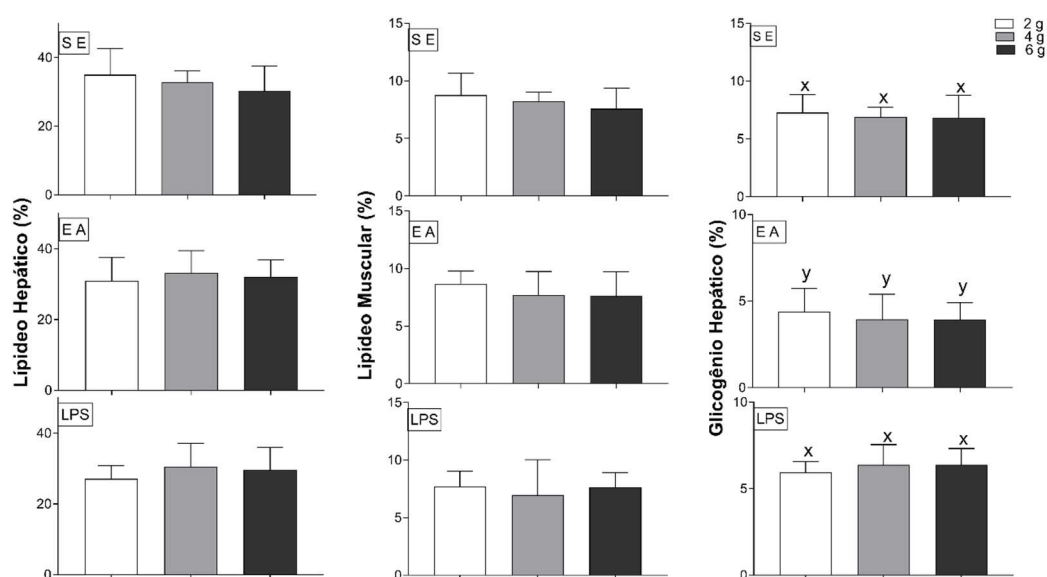


Figura 7. Concentrações de lipídeo hepático, lipídeo muscular e glicogênio hepático de pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE (amostragem inicial), estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

4.3.3 Índices Somáticos (Fig. 8)

Os grupos de manejo e alimentação com dietas suplementadas com triptofano, durante 15 dias, não influenciaram os índices hepatossomático e gordura visceral.

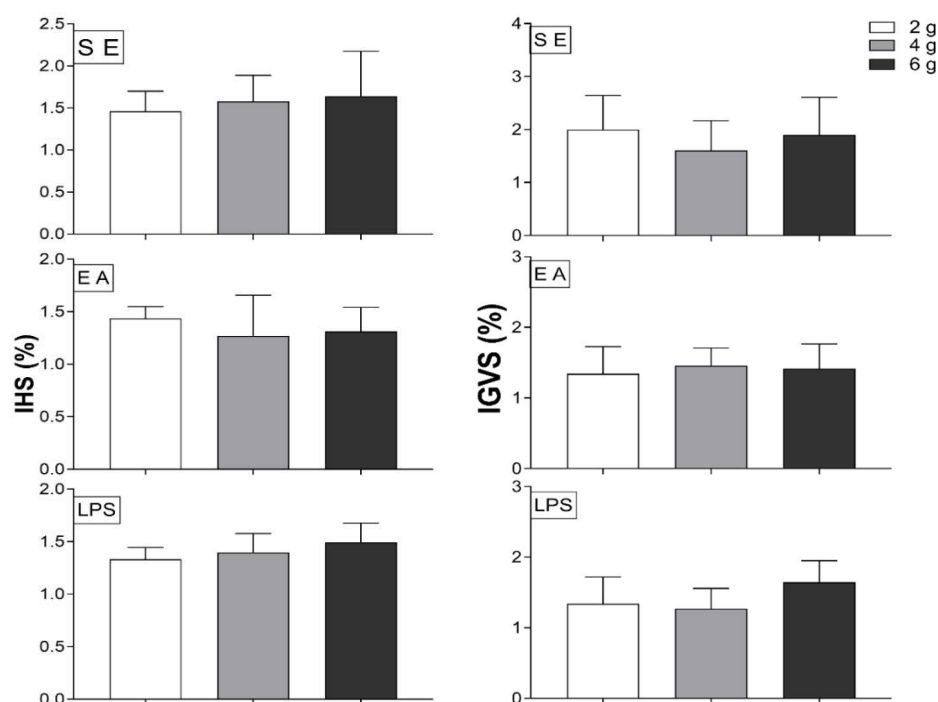


Figura 8. Índice Hepatosomático e Índice de Gordura Visceral de pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: sem estresse SE (amostragem inicial), expostos a estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS (amostragem 1h). Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

4.4. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

4.4.1 Concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) (Fig. 9)

No grupo EA, o tratamento com suplementação de 6 g apresentou maior concentração de glutathiona em relação aos tratamentos 2 g e 4 g ($p=0,0004$) após os 15 dias de alimentação. O estressor agudo diminuiu as concentrações de GSH em todos os tratamentos 1 h ($p=0,0002$), 3 h ($p=0,0010$), demonstrando perfil de retorno a partir de 6 h ($p=0,0018$). O tratamento 6 g mostrou maior concentração de GSH ao longo das amostragens ($p=0,0242$).

Em relação ao grupo LPS, após 15 dias de alimentação, o tratamento 6 g apresentou as maiores concentrações de GSH. Após injeção, na amostragem de 3 h, as concentrações diminuíram ($p=0,0044$), retornando aos valores basais na amostragem seguinte 6 h ($p=0,0019$). O tratamento 6 g apresentou maior concentração de GSH ao longo das amostragens ($p=0,0064$).

Entre os grupos de manejo, a injeção de LPS afetou negativamente as concentrações de GSH na amostragem de 3 h em relação ao grupo EA ($p=0,0004$).

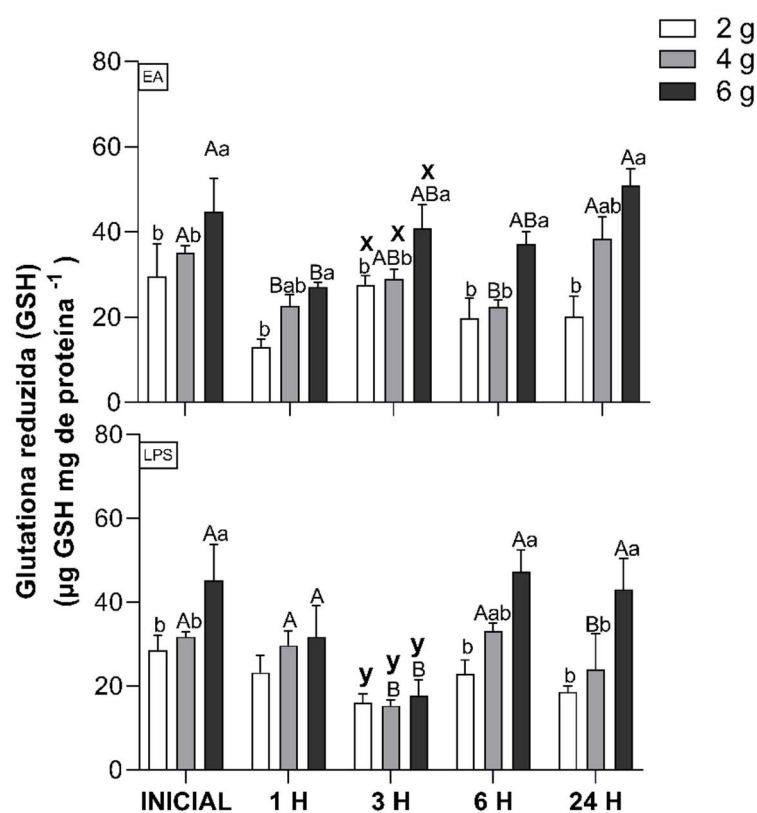


Figura 9. Atividade respiratória dos leucócitos em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4.4.2 Atividade hepática de glutathione s-transferase (GST) (Fig. 10)

A atividade de GST, no grupo EA, após 15 dias de alimentação com dietas suplementadas com triptofano, foi maior em relação ao tratamento controle ($p=0,0005$), sendo que o tratamento 6 g apresentou maior atividade ($p=0,0001$). Após o manejo, houve diminuição da atividade 1 h nos tratamentos 2 g e 6 g ($p=0,002$), com retorno ao comportamento inicial a partir de 6 h para o tratamento 6 g ($p=0,0001$), enquanto o tratamento controle não apresentou o mesmo efeito. O tratamento 6 g, após o manejo estressor, indicou maior atividade da GST ao longo das amostragens ($p=0,0001$).

Em relação ao grupo LPS, a injeção diminuiu a atividade da GST 3 h ($p=0,0080$) e 6 h ($p=0,0008$), retornando ao comportamento inicial 24 h após o manejo ($p=0,005$). A atividade da GST foi maior nos tratamentos suplementados com triptofano 1 h ($p=0,0010$) e 3 h ($p=0,00180$) após injeção com LPS.

Entre os grupos, EA apresentou maior atividade no tratamento 6 g, após a injeção 3 h ($p=0,005$) e 6 h ($p=0,003$). Enquanto no grupo LPS, este comportamento foi observado no tratamento 2 g e 4 g, 24 h após injeção ($p=0,0041$).

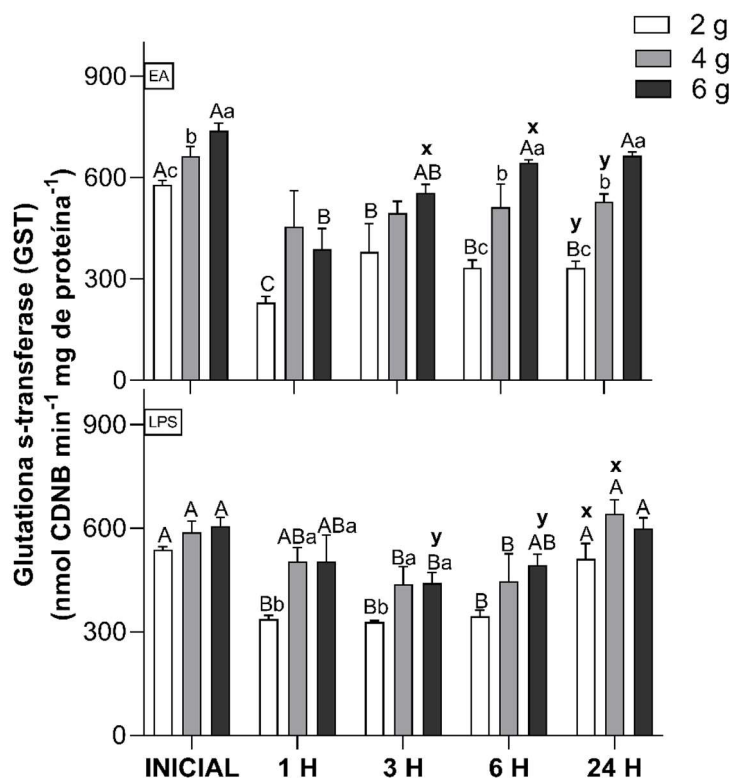


Figura 10. Atividade da glutathione s-transferase em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem e letras xyz indicam diferença entre os grupos EA e LPS. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

4.4.3 Atividade hepática da catalase (CAT) (Fig. 11)

A atividade da catalase, após 15 dias de suplementação com triptofano, foi maior nos tratamentos 4 g e 6 g, em comparação ao tratamento controle ($p=0,00741$). Semelhante a amostragem inicial, 1 h após o estresse agudo, os tratamentos 4 g e 6 g apresentaram maior atividade em relação ao controle ($p=0,00436$). O tratamento controle ao longo das amostragens demonstrou redução da atividade 1 h e 3 h após o estresse agudo ($p=0,00380$).

O grupo LPS mostrou diminuição na atividade da CAT após 1 h e 3 h em todos os tratamentos ($p=0,0032$), com retorno a partir de 6 h nos tratamentos 4 g e 6 g ($p=0,0001$), enquanto o tratamento controle não mostrou retorno a atividade inicial após 24 h.

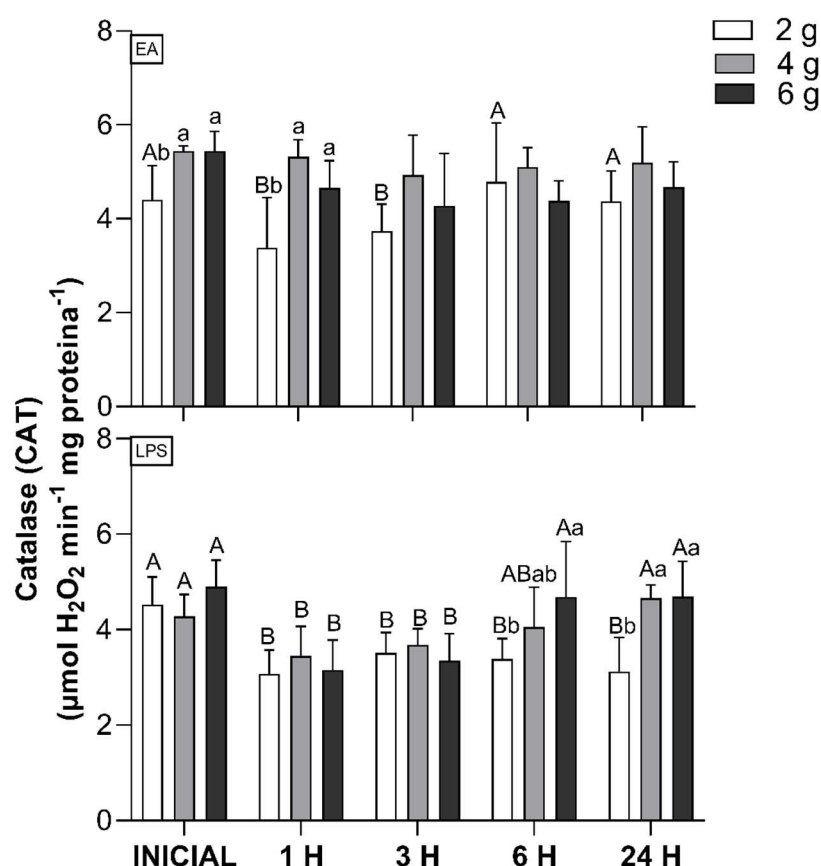


Figura 11. Atividade da catalase em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário, letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=6).

4.4.4 Atividade hepática de superóxido dismutase (SOD) (Fig. 12)

A atividade da SOD no grupo EA após 15 dias de alimentação foi maior no tratamento 4 g, em comparação ao tratamento controle e 6 g ($p=0,0173$). Após o estresse agudo o comportamento da CAT foi semelhante a amostragem anterior, com maior atividade no tratamento 4 g ($p=0,0190$).

No grupo LPS, após a injeção, a atividade do tratamento 4 g foi maior em relação ao tratamento controle e 6 g ($p=0,0346$).

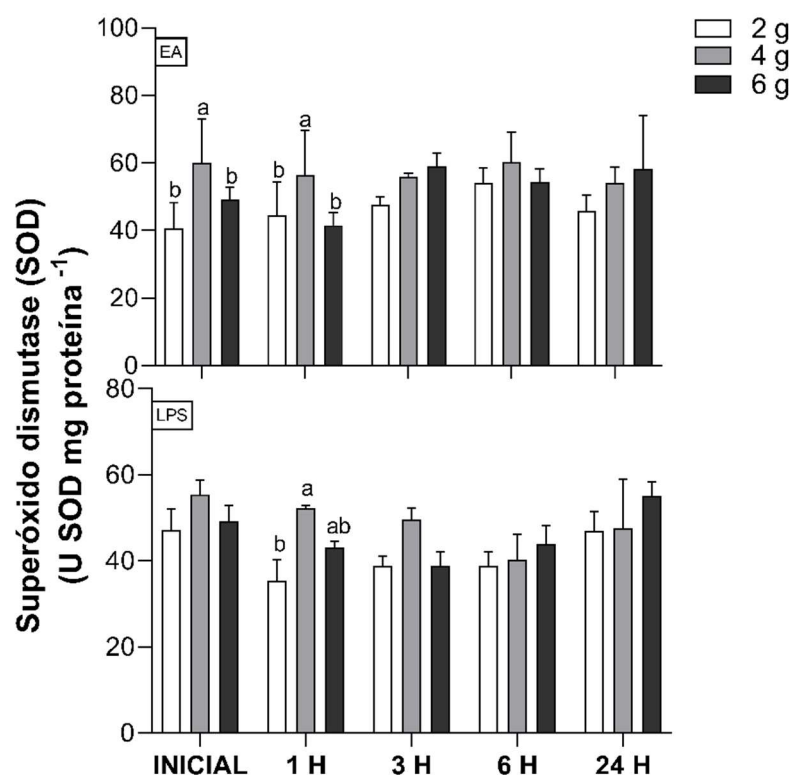


Figura 12. Atividade da catalase em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4.4.5 Peroxidação Lipídica (LPO) (Fig. 13)

A peroxidação lipídica no grupo EA foi maior no tratamento 2 g nas amostragens 1 h e 3 h, retornando aos valores iniciais a partir da amostragem 6 h ($p=0,00254$).

Em relação grupo LPS, a injeção aumentou a peroxidação lipídica 1 h ($p=0,00381$), com início de retorno aos valores iniciais na amostragem 3 h ($p=0,0001$).

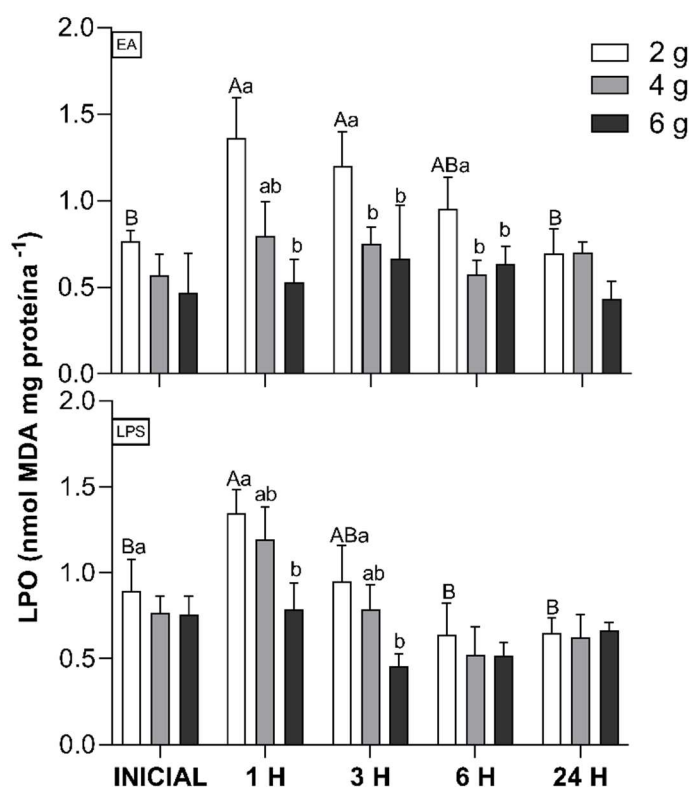


Figura 13. Peroxidação lipídica em pacus alimentados com dietas contendo triptofano (Controle 2 g, 4 g e 6 g) por 15 dias, nas condições de manejo: estressor agudo EA e inoculados com lipopolissacarídeo LPS, amostrados antes do manejo (inicial), 1, 3, 6 e 24 h. Letras maiúsculas indicam diferença entre as amostragens em cada tratamento dietário. Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos em cada amostragem. Ausência de símbolos indica não haver diferença estatística. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

5. Discussão

Para avaliar o efeito da inclusão do triptofano nas respostas metabólicas, de estresse, de imunidade inata e do sistema antioxidante, juvenis de pacu foram alimentados com dietas suplementadas com o aminoácido triptofano por 15 dias e, em seguida, expostos a dois manejos estressores: exposição aérea e inoculação com LPS, conhecidos por atuar no sistema imune. Como tanto as reações metabólicas desencadeadas durante o estresse como o sistema imune são sistemas que demandam alto custo energético e afetam os mecanismos de respiração celular, o sistema antioxidante hepático também foi monitorado.

O triptofano é um AA essencial de grande versatilidade funcional, além de sua participação na síntese de proteínas. Estudos mostram que níveis adequados deste AA são críticos para o crescimento, mas também modulam o bem-estar, comportamento, respostas de estresse e do sistema imune e antioxidante dos peixes (Hoseini et al., 2019).

Nossos resultados mostram que o triptofano, nas concentrações 4 g e 6 g, atenuou as concentrações de cortisol nos peixes que passaram por manejo estressantes (Grupos EA e LPS). Diversos trabalhos apresentam o mesmo resultado em outras espécies *Oncorhynchus mykiss* (Lepage et al., 2005), *Salmo trutta* (Hoglund et al., 2007), *Gadus morhua* (Basic et al., 2013), *Salmo salar* (Basic et al., 2013), *Oreochromis niloticus* (Prabu et al., 2020). Acredita-se que uma dieta com imunonutrientes reduza substancialmente os efeitos negativos causado por diferentes estressores (Gupta et al., 2021). Gonzales-Silveira et al. (2018) submeteram *Argyrosomus regius* a dois estressores comuns no manejo aquícola (exposição e perseguição), e observaram redução das concentrações de cortisol, com inclusão de 7 g kg⁻¹ ração. Aumentos nos níveis plasmáticos de glicose e cortisol são considerados os métodos mais confiáveis para diferenciar entre peixes não estressados e estressados (Rotllant e Tort, 1997), sendo os indicadores mais utilizados (Martínez-Porchas et al., 2009). Em nosso estudo, observamos que a glicemia não sofreu interferência das concentrações de triptofano, mas apenas do agente estressor. Wolkers et al. (2012), utilizando ração suplementada com diferentes níveis de triptofano, também demonstraram que não houveram diferenças significativas nas concentrações de glicose.

Em relação a imunidade inata, a atividade respiratória dos leucócitos não foi estimulada pela suplementação de triptofano, entretanto os estressores modularam as respostas, mais especificamente o grupo EA. Do mesmo modo, o estresse agudo de alta densidade teve efeito supressivo nas respostas da atividade respiratória dos leucócitos em *Dicentrarchus labrax* (Vazzana *et al.*, 2002). A atividade de explosão respiratória é resposta antimicrobiana de fagócitos (Secombes, 1996), que são mobilizados durante uma resposta aguda ao estresse (Tort, 2011).

A atividade da lisozima foi maior 1 h após o estressor agudo. Este comportamento foi observado no tratamento 4 g. Após o estresse agudo em truta, tanto o aumento quanto a supressão da atividade plasmática da lisozima foram relatados, dependendo do tipo, intensidade e duração do estressor (Fevolden *et al.*, 2003). Outros estudos avaliaram a influência da suplementação com triptofano na atividade de lisozima, como o *Labeo rohita* (Aktar *et al.*, 2013), *Acipenser persicus* (Hoseini *et al.*, 2016) e *Solea senegalensis* (Herrera *et al.*, 2016). A produção de lisozima está relacionada com o uso de imunoestimulantes na dieta (Gupta *et al.*, 2021), devido ao aumento de leucócitos que secretam a enzima ou ainda pelo aumento de lisozima secretada pelas células (Neuls *et al.*, 2021). Em nosso estudo, o agente estressor teve efeito imunossupressor na atividade hemolítica do sistema complemento. A modulação do sistema imunológico pelo estresse tem sido amplamente estudada (Eslamloo *et al.*, 2014; Magnini *et al.*, 2019; Adneh *et al.*, 2019).

Dentre os indicadores metabólicos, os estoques de glicogênio hepático foram afetados pelo estressor agudo. Barton e Iwama, (1991) descrevem que elevações nas catecolaminas e cortisol circulantes estimulam o aumento da glicogenólise. Além disso, estudos relatam a elevação do cortisol como sendo responsável pela glicogenólise hepática (Barton *et al.*, 1987; Vijayan *et al.*, 1994; Lyons *et al.*, 2019; Olsen *et al.*, 2002).

Em relação ao sistema antioxidante, após 15 dias de alimentação com dietas contendo triptofano, as concentrações de GSH, CAT e SOD foram maiores no tratamento 6 g, resultado semelhante ao encontrado por Hoseini *et al.* (2020) em juvenis de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* alimentados com 5 g de triptofano. O triptofano é um aminoácido essencial, que desempenha funções importantes no organismo dos peixes (Hoseini *et al.*, 2019), como sendo o precursor da serotonina,

um neurotransmissor responsável por regular o comportamento (Hoglund *et al.*, 2017), função cardiovascular (McDonald *et al.*, 2017) e osmorregulação (Kreke *et al.*, 2008). Além disso, o triptofano também é precursor da niacina (vitamina B3), necessária para produção de NADPH, coenzima envolvida na regeneração da GSH (Lee *et al.*, 2015). O aumento nas atividades enzimáticas da SOD e CAT por meio da inclusão de triptofano, pode ser entendido pela importância deste AA na produção de serotonina e melatonina, que atuam como antioxidantes (Cabanillas-Gamez *et al.*, 2020). Hacisevki e Baba (2018) sugerem que além de estimular a SOD e CAT, a melatonina reduz a produção de elétrons e, consequentemente, a geração de radicais livres, através do aumento da eficiência da cadeia transportadora de elétrons. Estudos mostram que a melatonina aumenta a atividade da SOD e CAT em diferentes tecidos e células (Garcia *et al.*, 2014).

Neste estudo, a GST apresentou comportamento semelhante ao da GSH, com maior atividade nos peixes que receberam o triptofano nas dietas. A GSH, por sua vez, é um cofator essencial para atividade da GST (Koner *et al.*, 2023). A glutatona atua como substrato para ação da GST, fornecendo um grupo sulfidril, que é transferido para compostos reativos, formando compostos solúveis em água e menos tóxicos (Bastos *et al.*, 2022). Em juvenis de *Megalobrama amblycephala*, Ji *et al.* (2019) demonstraram que a adição de 6 g de triptofano aumentou a atividade da GST. Nossos resultados sugerem que a inclusão de triptofano pode proteger os peixes contra o dano oxidativo. Os níveis de LPO após o EA mostram que o triptofano protegeu os peixes do dano oxidativo. Estes resultados, corroboram Resende *et al.* (2023) que relataram que, após exposição aérea durante 1 minuto, o robalo europeu *Dicentrarchus labrax* alimentando com triptofano na dieta apresentou níveis de LPO mais baixos no fígado. Ji *et al.* (2019) mostraram que mesmo a inclusão de baixas concentrações de triptofano, como 2 g, diminuiu significativamente o nível de MDA, que é o principal subproduto da LPO. Assim como os peixes da condição de EA, o grupo LPS promoveu maiores concentrações de LPO após a injeção. Zhang *et al.* (2023) mostraram que a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, quando alimentada com triptofano, apresentou dano oxidativo no fígado reduzido após injeção contendo LPS.

6. Conclusão

O estresse agudo e a injeção de LPS foram situações estressantes, porém a inclusão de triptofano (4 g e 6 g) atenuou a elevação de cortisol, como também atuou na modulação das respostas imunológicas, com estímulo da lisozima e da atividade do sistema complemento. Ainda, o triptofano melhorou o estado oxidativo em pacu estressado por exposição aérea e injetado com LPS.

11. Referências

ADINEH, Hossein et al. Biofloc technology improves growth, innate immune responses, oxidative status, and resistance to acute stress in common carp (*Cyprinus carpio*) under high stocking density. **Fish & shellfish immunology**, v. 95, p. 440-448, 2019.

AEHL, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. v. 105, n. 2, p. 121-126, 1984.

AKHTAR, Mohammad Shahbaz et al. Hemato-immunological responses of *Labeo rohita* juveniles to temperature and salinity stress: Effect of dietary L-tryptophan. **Isr. J. Aquac**, v. 65, p. 1-8, 2013.

ANDERSON, James L.; ASCHE, Frank; GARLOCK, Taryn. Economics of aquaculture policy and regulation. **Annual Review of Resource Economics**, v. 11, p. 101-123, 2019.

ARAGAO, C. et al. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). **Amino Acids**, v. 34, p. 143-148, 2008.

AZEREDO, Rita et al. Neuroendocrine and immune responses undertake different fates following tryptophan or methionine dietary treatment: tales from a teleost model. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1226, 2017.

BARTON, Bruce A.; SCHRECK, Carl B.; BARTON, Lesley D. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. **Diseases of aquatic organisms**, v. 2, n. 3, p. 173-185, 1987.

BASIC D, Kroghdal Å, Schjolden J, et al. Short-and longterm effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 388, 8–13, 2013.

BASIC D, Schjolden J, Kroghdal Å, et al. Changes in regional brain monoaminergic activity and temporary downregulation in stress response from dietary supplementation with L-tryptophan in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Br J Nutr* 109, 2166–2174, 2013.

BASTOS, Frederico F. et al. A typical enzyme activity for glutathione conjugation indicates exposure of pacu to pollutants. **Neotropical Ichthyology**, v. 20, 2022.

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

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian. Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n.08, p. 911-917.

BOYD, Claude E.; MCNEVIN, Aaron A.; DAVIS, Robert P. The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply. **Food security**, v. 14, n. 3, p. 805-827, 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical. Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.

CABANILLAS-GÁMEZ, Miguel et al. Tryptophan supplementation helps totoaba (*Totoaba macdonaldi*) juveniles to regain homeostasis in high-density culture conditions. **Fish physiology and biochemistry**, v. 46, p. 597-611, 2020.

CHANG, Y.M., Cao, D.C., Sun, X.W., Liang, L.Q. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. *Chin. J. Fish.*, 2, 71–75, 2006.

CIJI, Alexander; AKHTAR, Mohammad S. Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2190-2247, 2021.

COSTAS, Benjamín et al. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, v. 316, n. 1-4, p. 68-76, 2011.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 49, p. 275-285, 2016.

DAWOOD, Mahmoud AO et al. Selenium nanoparticles as a natural antioxidant and metabolic regulator in aquaculture: a review. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1364, 2021.

DE LA ROCA, E. et al. Daily activity rhythms and the stress-related response in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). **Physiology & behavior**, v. 173, p. 272-278, 2017.

EBENEEZAR, Sanal et al. Optimum dietary levels of lysine and methionine reduces the crude protein requirement and improves growth in Snubnose pompano (*Trachinotus blochii*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 290, p. 115370, 2022.

ESLAMLOO, Khalil et al. Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to recurrent acute stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, n. 1, p. 147-153, 2014.

FARIA, C. F. P. dos Reis Martinez, C. B., Takahashi, L. S., de Mello, M. M. M., Martins, T. P., & Urbinati, E. C. 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.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, 415-430, 2007.

FEVOLDEN, Svein-Erik; RØED, Knut H.; FJALESTAD, Kjersti. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness. **Aquaculture**, v. 216, n. 1-4, p. 67-76, 2003.

GARCÍA, Joaquín J. et al. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. **Journal of pineal research**, v. 56, n. 3, p. 225-237, 2014.

GONZALEZ-SILVERA, Daniel et al. Effects of the dietary tryptophan and aspartate on the immune response of meagre (*Argyrosomus regius*) after stress. **Fishes**, v. 3, n. 1, p. 6, 2018.

GUPTA, Akruti et al. Immunomodulation by dietary supplements: A preventive health strategy for sustainable aquaculture of tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 2364-2394, 2021.

HACIŞEVKI, Aysun; BABA, Burcu. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: a biochemical approach. **Melatonin molecular biology, clinical and pharmaceutical approaches**, v. 5, p. 59-85, 2018.

HARSIJ, Mohammad; KANANI, Hosna Gholipour; ADINEH, Hossein. Effects of antioxidant supplementation (nano-selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. **Aquaculture**, v. 521, p. 734942, 2020.

HE, Ju Yun et al. Effect of dietary l-methionine concentrations on growth performance, serum immune and antioxidative responses of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture research**, v. 48, n. 2, p. 665-674, 2017.

HEDAYATI, Seyed Aliakbar et al. Effect of dietary *Lactobacillus casei* on physiometabolic responses and liver histopathology in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to iron oxide nanoparticles. **Biological trace element research**, v. 200, n. 7, p. 3346-3354, 2022.

HERRERA, M. et al. Physiological and metabolic effects of a tryptophan-enriched diet to face up chronic stress in meagre (*Argyrosomus regius*). **Aquaculture**, v. 522, p. 735102, 2020.

HERRERA, Marcelino et al. Metabolic and Stress Responses in Senegalese Soles (*Solea senegalensis* Kaup) Fed Tryptophan Supplements: Effects of Concentration and Feeding Period. 2019.

HERRERA, Marcelino et al. Physiological short-term response to sudden salinity change in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, p. 1741-1751, 2012.

HÖGLUND E, Sørensen C, Bakke MJ, et al. (2007) Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. *Br J Nutr* 97, 786–789.

HOGGLUND, Erik et al. Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 786-789, 2007.

HOGGLUND, Erik et al. Dietary l-tryptophan leaves a lasting impression on the brain and the stress response. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 10, p. 1351-1357, 2017.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 3-24, 2019.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Effects of rearing density and dietary tryptophan supplementation on intestinal immune and antioxidant responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 528, p. 735537, 2020.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Roles of arginine in fish nutrition and health: insights for future researches. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 4, p. 2091-2108, 2020.

HOSEINI, Seyyed Morteza et al. Serum cortisol, glucose, thyroid hormones and non-specific immune responses of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* to exogenous tryptophan and acute stress. **Aquaculture**, v. 462, p. 17-23, 2016.

HOSEINI, S.M., Perez-Jimenez, A., Costas, B., Azeredo, R., Gesto, M. Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives for future studies. *Reviews in Aquaculture* (2019) 11, 3–24, 2019.

HOSEINI, Seyyed Morteza; REVERTER, Míriam. Efeitos promotores de saúde de aminoácidos em peixes. In: **Avanços biotecnológicos na gestão da saúde da aquicultura**. Cingapura: Springer Nature Cingapura, p. 493-533, 2022.

HOSSAIN, Md Sakhawat; KOSHIO, Shunsuke; KESTEMONT, Patrick. Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1028-1053, 2020.

Jl, Ke et al. Effects of dietary tryptophan levels on antioxidant status and immunity for juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) involved in Nrf2 and TOR signaling pathway. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 93, p. 474-483, 2019.

KAISER, Frederik et al. Dietary Supplementation with Chromium DL-Methionine Enhances Growth Performance of African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 2023, 2023.

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

KIRON, Viswanath. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.

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

KONER, D. et al. Functional expression, localization, and biochemical characterization of thioredoxin glutathione reductase from air-breathing magur catfish, *Clarias magur*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 230, p. 123126, 2023.

KOHYANI, Ahmad et al. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 431-440, 2012.

KREKE, Nicola; DIETRICH, Daniel R. Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. **Critical reviews in toxicology**, v. 38, n. 3, p. 215-247, 2008.

KUANG, Sheng-Yao et al. Effects of graded levels of dietary methionine hydroxy analogue on immune response and antioxidant status of immune organs in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 5, p. 629-636, 2012.

KUMAR S, Sahu NP, Pal AK, Choudhury D, Yengkokpam S, Mukherjee SC. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. *Fish Shellfish Immunol* 19:331–344, 2005.

LEE, Cheng-Sheng. *Dietary nutrients, additives and fish health*. 2015.

LEPAGE, Olivier et al. Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout. **Journal of pineal research**, v. 38, n. 4, p. 264-271, 2005.

LYONS, Kady; WYNNE-EDWARDS, Katherine E. Legacy environmental polychlorinated biphenyl contamination attenuates the acute stress response in a cartilaginous fish, the Round Stingray. **Stress**, v. 22, n. 3, p. 395-402, 2019.

MCDONALD, M. Danielle. An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 197, p. 19-31, 2017.

MACHADO, Marina et al. Dietary methionine improves the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status, inflammatory response, and disease resistance. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2672, 2018.

MAGNONI, Leonardo J. et al. Acute stress and an electrolyte-imbalanced diet, but not chronic hypoxia, increase oxidative stress and hamper innate immune status in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isogenic line. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 453, 2019.

MAHDY, Mohammed A. et al. Uso de leveduras na nutrição e imunoestimulação da aquicultura: uma revisão. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 5, pág. 59-65, 2022.

MARTINEZ-PORCHAS, Marcel; MARTINEZ-CORDOVA, Luis R. World aquaculture: environmental impacts and troubleshooting alternatives. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

MARTÍNEZ-PORCHAS, Marcel; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, Luis Rafael; RAMOS-ENRIQUEZ, Rogelio. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, p. 158-178, 2009.

MCCORD J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055, 1969.

MIR, Ishfaq Nazir et al. Synergistic effect of l-methionine and fucoidan rich extract in eliciting growth and non-specific immune response of *Labeo rohita* fingerlings against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 479, p. 396-403, 2017.

NEULS, Luciane et al. Efeitos imunomoduladores da *Yarrowia lipolytica* como aditivo alimentar na dieta da tilápia do Nilo. **Imunologia de Peixes e Mariscos**, v. 119, p. 272-279, 2021.

NOOR, Zohaib et al. Dietary supplementations of methionine improve growth performances, innate immunity, digestive enzymes, and antioxidant activities of rohu (*Labeo rohita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 451-464, 2021.

OLSEN, Rolf Erik et al. Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. **Fish physiology and biochemistry**, v. 26, p. 211-221, 2002.

PERRY, G. J.; GILLAN, F. T.; JOHNS, R. B. LIPID COMPOSITION OF A PROCHLOROPHYTE 1. **Journal of Phycology**, v. 14, n. 3, p. 369-371, 1978.

POHLENZ, Camilo; GATLIN III, Delbert M. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, v. 431, p. 111-117, 2014.

PRABU, Elangovan et al. Metabolic responses of juvenile GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to dietary L-tryptophan supplementation. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 1713-1723, 2020.

RAMESH, Mathan et al. Hematological, biochemical and enzymological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* induced by sublethal concentration of waterborne selenite exposure. **Chemico-biological interactions**, v. 207, p. 67-73, 2014.

RESENDE, Daniela et al. Stress response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed plant-based diets supplemented with swine blood hydrolysates. **Aquaculture Reports**, v. 30, p. 101600, 2023.

ROTLLANT, J.; TORT, L. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. **Journal of Fish Biology**, v. 51, n. 1, p. 21-28, 1997.

SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís. The concept of stress in fish. In: **Fish physiology**. Academic Press, 2016. p. 1-34.

SEALEY, Wendy M.; GATLIN III, Delbert M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops*♀ × *M. saxatilis*♂) but have limited effects on immune responses. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 4, p. 748-755, 2002.

SHARF, Yusra; KHAN, Mukhtar A. Dietary tryptophan requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth, hematological parameters, intestinal enzymes, non-specific immune response, and antioxidant capacity. **Aquaculture**, v. 562, p. 738745, 2023.

SIQUEIRA, Tagore Villarim de. *Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável*. 2017.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The determination of lysozyme. **Journal of bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949.

SYAHIDA ABDEL-GHANY, Heba M.; EL-SISY, Doaa M.; SALEM, Mohamed El-S. A comparative study of effects of curcumin and its nanoparticles on the growth, immunity and heat stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2523, 2023.

SYAHIDAH, A. et al. Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. 2015.

THOMAS, Jith K. et al. Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 130, p. 112-122, 2013.

TORT, Lluís. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

VARGAS-CHACOFF, Luis et al. Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different

environmental salinities and stocking densities. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 9, p. 1269-1278, 2011.

VAZZANA, M. et al. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. **Aquaculture**, v. 210, n. 1-4, p. 231-243, 2002.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; MOON, T. W. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 108, n. 3, p. 321-329, 1994.

WATERLAND, Robert A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1706S-1710S, 2006.

WOLKERS, C.P.B.; SERRA, M.; HOSHIBA, M.A.; URBINATI, E.C. 2012. Dietary L tryptophan alters aggression in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus*. *Fish Physiology Biochemistry*.38: 819-827, 2012.

YADA, Takashi, and Lluís Tort. "Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions." In *Fish physiology*, vol. 35, pp. 365-403. Academic Press, 2016.

ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C.; RISE, M.L.; HALL, J.R.; NASH, G.W.; GAMPERL, A.K. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, v.435, p.1-9, 2015.

ZHANG, Xin et al. Tryptophan can alleviate the inhibition in growth and immunity of tilapia (*GIFT Oreochromis spp.*) induced by high dietary soybean meal level. **Aquaculture Reports**, v. 31, p. 101646, 2023.