

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

ASPECTOS NA QUALIDADE DA CARNE E EXPRESSÃO DE GENES DE
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DESAFIADAS COM FUMONISINAS

BRUNO LALA SILVA

Trabalho de Tese apresentado como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor do Curso de Doutorado do Programa
de Pós-graduação em Zootecnia.

Botucatu, SP
Dezembro de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

ASPECTOS NA QUALIDADE DA CARNE E EXPRESSÃO DE GENES DE
TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DESAFIADAS COM FUMONISINAS

BRUNO LALA SILVA

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça
Coorientadora: Profa. Dra. Stefania Caroline Claudino da Silva

Trabalho de Tese apresentado como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor do Curso de Doutorado do Programa
de Pós-graduação em Zootecnia.

Botucatu, SP
Dezembro de 2019

L194a	LalaSilva, Bruno Aspectos na qualidade da carne e expressão de genes de tilápias-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) desafiadas com fumonisinas / Bruno LalaSilva. -- Botucatu, 2019 76 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: Roberto de Oliveira Roça Coorientadora: Stefania Caroline Claudino da Silva 1. Glutathione peroxidase. 2. <i>Fusarium</i> sp.. 3. Micotoxina. 4. Perfil de ácidos graxos. 5. Proteína do choque térmico. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA

BRUNO LALA SILVA, filho de Edir Francisco da Silva e Eloiza Ruth Peres Lala, nasceu em Presidente Prudente, São Paulo, no dia 07 de agosto de 1986. Em março de 2006, iniciou no Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, onde foi bolsista de Iniciação Científica, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Fundação Araucária, graduando-se em janeiro de 2011. Em abril de 2011, ingressou no Grupo de Estudos em Silagem e Feno (GESF), como Bolsista de Apoio Técnico do CNPq. Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Ulysses Cecato e co-orientação da Profa. Dra. Ana Maria Bridi, no Programa de Pós Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e conquistou o título de Mestre em fevereiro de 2015 na área de Pastagens e Forragicultura. Em agosto de 2016 ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu-SP, sob orientação do Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça e co-orientação da Profa. Dra. Stefania Caroline Claudino da Silva. Durante o curso de doutorado foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em julho de 2019, submeteu-se ao exame geral de qualificação. Em dezembro de 2019, submeteu-se a apresentação da tese de doutorado.

Just keep swimming

Dory

À Eloiza Ruth Lala,
Pelos trabalhos na madrugada,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Em poucas palavras é difícil agradecer a tudo o que aconteceu nestes anos, nos quase 1300 dias, cada momento tem o seu valor especial entre estudos, congressos, análises e confraternizações.

A Deus, pela nova descoberta em ser, e pelo desafio proporcionado.

À minha família, pelo apoio, carinho e incentivo.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (FMVZ – UNESP – Botucatu) pela oportunidade dos estudos e apoio acadêmico.

À Universidade Estadual de Maringá, pelo espaço cedido para realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pela bolsa de estudos PROC142355/2017-8

Ao Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça, pela acolhida, pelos ensinamentos, pela sabedoria, e pela paciência com os alunos.

À Prof. Dra. Stefania Caroline Claudino da Silva, pela co-orientação durante todo o projeto, por acreditar nesta pesquisa, e pela vontade em ajudar e motivar.

À Profa. Dra. Pricila Veiga dos Santos, pelo auxílio e apoio na utilização dos equipamentos durante o período.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ/UNESP de Botucatu, Cláudia, Ellen e Seila, pela prestação de serviços e pelo grande apoio na jornada.

Aos colegas de Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal, aos que estão e aos que já alçaram voos diferentes, Bruna Smaniotto, Carolina Santos, Evelyn Brito, Guilherme Sampaio, Janaina Oliveira, Letícia Borges, Luciana Mena, Nara Laiane

Delbem, Nataly Sobral e Renata Lomele, pelo compartilhar das experiências e vivências, pelos exemplos e conhecimentos divididos.

Aos amigos de Botucatu, Amanna, Aline, Caio, Carolina, Daniel, Evelyn, Gustavo, Ianê, Leonardo e Marina, pelo apoio durante o período, pelas conversas, pelas lutas e desafios que enfrentamos e por nossas conquistas presentes, e as que virão.

Aos amigos André, Bruno, Filipe e Lucas(s), pelo apoio durante todo o momento, pelas conversas de distração e por fazerem parte deste processo.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na formação do meu caráter pessoal e profissional, aos que me motivaram a continuar e aos que não o fizeram, e mesmo sem intenção, ajudaram.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

1	RESUMO.....	6
2	ABSTRACT	8
3	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	10
4	I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
5	1. Panorama geral da aquicultura e tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	11
6	2. Contaminação de alimentos por micotoxinas	11
7	3. Fumonisinas e seus efeitos biológicos	13
8	4. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes: espécies reativas de oxigênios,	
9	enzimas reparadoras e processo enzimático de reparação	15
10	4.1. Glutationa Peroxidase (GPX).....	17
11	4.2. Proteína do choque térmico (HSPs).....	18
12	5. Perfil de ácidos graxos.....	20
13	6. Objetivos	21
14	Referências Bibliográficas	22
15	II – DESAFIO COM FUMONISINA FB ₁ + FB ₂ ALTERA O PERFIL DE ÁCIDOS	
16	GRAXOS EM ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO (<i>Aquaculture Journal</i>)	32
17	Resumo.....	32
18	Abstract	33
19	1. Introdução	34
20	2. Material e Métodos	36
21	3. Resultados	40
22	4. Discussão	45
23	5. Conclusão.....	50
24	Referências.....	51
25	III – FUMONISINA ALTERA O EQUILÍBRIO REDOX EM JUVENIS DE TILÁPIA-	
26	DO-NILO (<i>Aquaculture Journal</i>).....	58
27	Resumo.....	58
28	Abstract	59
29	1. Introdução	59
30	2. Material e Métodos	61
31	3. Resultados.....	66
32	4. Discussão	68
33	5. Conclusão	71

1	Referências.....	72
2	IV - IMPLICAÇÕES	76

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi quantificar o desempenho, rendimento de filé, resíduo mineral fixo, proteína, lipídios e análise do perfil de ácidos graxos na carne, e avaliar a expressão gênica de glutathione peroxidase (GPX) e da proteína de choque térmico (HSP70) no fígado, em alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com níveis crescentes de fumonisina, 0 (FB0), 20 (FB20), 40 (FB40) e 60 (FB60) mg de fumonisina (FB) por quilo de ração. Foram utilizados 180 peixes da linhagem Tailandesa revertidos sexualmente, como peso inicial de aproximadamente 2,5g e distribuídos em três caixas de fibrocimento com volume de 900L cada, com sistema individual de renovação da água (25% ao dia), aeração constante e quatro hapas em cada tanque, totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos (FB0, FB20, FB40 e FB60) e três repetições. Em cada hapa foram alojados 15 peixes, que passaram por período de adaptação de 15 dias antes do início do experimento. A temperatura foi aferida duas vezes ao dia em cada tanque às 8h00 e 16h00. As variáveis oxigênio dissolvido e pH foram controladas pela manhã durante todo o experimento por meio de kit colorimétrico. A alimentação dos peixes foi realizada de forma manual e individual até saciedade aparente, três vezes ao dia, para evitar contaminação entre hapas. A expressão gênica foi realizada utilizando aparelho de PCR em tempo real e primers específicos. A qualidade foi avaliada por meio da composição química e o perfil dos ácidos graxos foi analisado por cromatografia gasosa. Aos 14 dias, fumonisinas reduziram apenas a expressão de HSP70 comparados ao controle. Porém, fumonisinas reduziram os níveis de HSP70 e aumentaram os níveis de GPX em animais de 28 dias, para os tratamentos FB40 e FB60. O ganho em peso diário aparente foi menor ($Y = 0,019x^2 - 0,124x + 0,325$; $R^2 = 0,928$) para peixes alimentados com dietas contendo FB em comparação ao grupo controle. O efeito negativo nas taxas de crescimento resultou em redução no rendimento de filé ($P < 0,001$). Proteína foi menor (FB60 = 15,38%) para a dose maior do que o controle ($P = 0,0003$). Os valores de umidade na carne foram maiores para o nível de FB20, com efeito quadrático de regressão ($R^2 = 0,688$), os valores para resíduo mineral fixo apresentaram efeito linear de regressão ($R^2 = 0,811$) e apresentaram efeito quadrático de regressão ($R^2 = 0,868$). Os ácidos graxos saturados totais foram maiores em peixes alimentados com FB60 ($37,13 \pm 0,99$) que qualquer outro tratamento. Os ácidos graxos monoinsaturados totais não variaram entre os tratamentos dietéticos, assim como o total de ômega 6 ($\omega 6$). Os ácidos graxos totais ômega3 ($\omega 3$) foram maiores nos peixes alimentados com FB40 ($4,99 \pm 0,15$) e FB60 ($5,20 \pm 0,13$) do que no FB20 ($4,36 \pm 0,03$) e

no tratamento controle ($4,43 \pm 0,18$). Os ácidos graxos poliinsaturados totais foram significativamente maiores nos peixes alimentados com FB40 e FB60. A fumonisina modula a expressão hepática de HSP70 e GPX em alevinos de tilápia-do-Nilo, piora o desempenho em alevinos de tilápias-do-Nilo e modifica o perfil de ácidos graxos, pois eleva a quantidade de ácidos graxos saturados e poliinsaturados, e reduz o nível de ácidos graxos monoinsaturados.

Palavras-chave: glutathione peroxidase, *Fusarium sp.*, micotoxina, perfil de ácidos graxos, proteína do choque térmico.

ABSTRACT

The objective of this research was to quantify the performance, fillet yield, fixed mineral residue, protein, lipids and fatty acid profile analysis in fish meat, and to evaluate the gene expression of glutathione peroxidase (GPX) and heat shock protein (HSP70) in the liver of Nile tilapia fingerlings fed increasing levels of fumonisin, 0 (FB0), 20 (FB20), 40 (FB40) and 60 (FB60) mg of fumonisin (FB) per kilo of feed. One hundred and eighty sexually reversed Thai fish were used, with an initial weight of approximately 2.5g and distributed in three fiber cement boxes with volume of 900L each, with individual water renewal system (25% per day), constant aeration and four hapas in each tank, totaling 12 experimental units with four treatments (FB0, FB20, FB40 and FB60) and three replications. In each hapa 15 fish were housed, which went through an adaptation period of 15 days before the beginning of the experiment. Temperature was measured twice a day in each tank at 8:00 and 16:00. Dissolved oxygen and pH variables were controlled in the morning throughout the experiment by colorimetric kit. Fish feeding was performed manually and individually until apparent satiation, three times a day, to avoid contamination between hapas. Gene expression was performed using real-time PCR apparatus and specific primers. Fish meat quality was assessed by chemical composition and fatty acid profile was analyzed by gas chromatography. At 14 days, fumonisins reduced only HSP70 expression compared to control. However, fumonisins reduced HSP70 levels and increased GPX levels in 28-day animals for FB40 and FB60 treatments. The apparent daily weight gain was lower ($Y = 0.019x^2 - 0.124x + 0.325$; $R^2 = 0.928$) for fish fed diets containing FB compared to the control group. The negative effect on growth rates resulted in reduction in fillet yield ($P < 0.001$). Protein was lower (FB60 = 15.38%) for the higher dose than the control ($P = 0.0003$). Meat moisture content was higher for FB20 level, with quadratic regression effect ($R^2 = 0.688$), values for fixed mineral residue had linear regression effect ($R^2 = 0.811$) and quadratic regression effect ($R^2 = 0.868$). Total saturated fatty acids were higher in fish fed FB60 (37.13 ± 0.99) than any other treatment. Total monounsaturated fatty acids did not vary between dietary treatments, as did the total omega 6 ($\omega 6$). Omega3 ($\omega 3$) total fatty acids were higher in fish fed with FB40 (4.99 ± 0.15) and FB60 (5.20 ± 0.13) than in FB20 (4.36 ± 0.03) and control treatment (4.43 ± 0.18). Total polyunsaturated fatty acids were significantly higher in fish fed with FB40 and FB60. Fumonisin modulates hepatic expression of HSP70 and GPX in Nile tilapia fingerlings, worsens Nile tilapia fingerlings performance and modifies

fatty acid profile as it increases the amount of saturated and polyunsaturated fatty acids, and reduces the level of monounsaturated fatty acids.

Keywords: Glutathione peroxidase, fatty acid profile, *Fusarium* sp., heat shock protein, mycotoxin.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nos últimos anos a qualidade sanitária de grãos destinados à alimentação animal e humana tem sido pesquisada para que se possa identificar a presença de fungos, com o intuito de aumentar a produtividade, reduzir prejuízos econômicos e melhorar a qualidade de vida da população mundial (JOBIM et al., 2001). O milho (*Zea mays*) possui grande participação na alimentação como matéria-prima básica na formulação de rações para tilápias, e a qualidade destes grãos depende, entre outros fatores, da correta conservação deste alimento (ABDEL-GHANY et al., 2019).

A micotoxina fumonisina é produzida durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (TURNER et al., 1999), e contamina em larga escala os grãos de milho (BORDINI et al., 2017; ROCHA, 2017). Estudos têm demonstrado que a fumonisina promove alterações no epitélio intestinal de suínos (OSWALD et al., 2003) causando fusão, atrofia e redução da altura das vilosidades intestinais (PIVA et al., 2005; GRENIER, 2012), e em casos mais severos, promove necrose na túnica média de artérias e veias na camada muscular do intestino de aves (JAVED et al., 2005). Danos ao epitélio intestinal têm sido frequentemente associados à redução de absorção de nutrientes (ANDRADE et al., 2010), e mudança no perfil nutricional na carcaça de animais (DIESTEL et al., 2012).

Em nível molecular, o consumo de fumonisina pode alterar o metabolismo lipídico por meio da desruptura da síntese de ceramida, iniciada pela condensação de serina e palmitoil-CoA, um modulador da atividade do complexo enzimático ácido graxo sintase (HORTON et al., 2002), além de alterações na expressão de genes em tilápias (CLAUDINO-SILVA et al., 2018). O bloqueio da rota pode ainda ocasionar acúmulo de esfinganina e gerar estresse oxidativo (WANG et al., 1991). Deste modo, é possível que, devido ao bloqueio na síntese de ceramida, o consumo de níveis crescentes de fumonisinas por alevinos de tilápia-do-Nilo altere o perfil de ácidos graxos na carcaça, além de modular a expressão das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, peroxidação lipídica e proteção celular.

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Panorama geral da aquicultura e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, sendo estimulada economicamente pela redução dos estoques pesqueiros naturais (MAURI et al., 2017). Assim, a contribuição da aquicultura para o fornecimento mundial de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos passou de 3,9% da produção total em peso em 1970 para 36% em 2006 (FAO/WHO, 2018).

Dentre as espécies mais exploradas na aquicultura, a tilápia-do-Nilo vem se destacando em criações intensivas, principalmente nas duas últimas décadas em virtude do seu rápido crescimento, facilidade na obtenção de larvas, precocidade, rusticidade e por possuir carne com boas características sensoriais com possibilidade de comercialização de filés sem espinhas intramusculares (BRABO et al., 2016).

De acordo com a Organização Mundial das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, em 2014 foram produzidos mais de 167 milhões de toneladas de pescado, com 73,8 milhões procedentes da aquicultura. Na América do Sul, o Brasil ocupa a segunda posição, com 561 mil toneladas de produção, ocupando a 13ª posição mundial dos maiores produtores de pescado (FAO/WHO, 2018).

No Brasil, o maior produtor nacional é o estado de Rondônia, mas comparando entre as regiões, o Nordeste brasileiro apresenta a maior produção e participação no mercado (26,8%), seguido pelas regiões Norte (25,7%), Sul (24,2%), Centro-Oeste (12,6%) e Sudeste (10,7%). Em 2017, a produção de Tilápia no país foi de 283.250 toneladas, faturando 1,6 bilhões de reais (PICKLER; VIEIRA FILHO, 2018; IBGE, 2019).

O interesse na criação de tilápia cresceu rapidamente na década de 1990, por causa da introdução da tecnologia de reversão sexual para produzir populações somente de machos (REIS et al., 2016). A possibilidade de produzir peixes para pesqueiros e indústrias de filetagem também contribuiu para o desenvolvimento da produção de tilápia no Brasil (GOMES et al., 2016; CARVALHO, 2018).

2. Contaminação de alimentos por micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos ativos produzidos de maneira específica para provocar atividades toxicológicas, não exigidos para crescimento ou reprodução de fungos (ANFOSSI et al., 2016; PEROMINGO et al., 2019). São moléculas

pequenas, estáveis e resistentes a altas temperaturas e às condições de processamento industrial, extremamente difíceis de remover dos alimentos, mantendo assim suas propriedades tóxicas (DIDWANIA; TRIVEDI, 2018). Em doses altas podem causar doenças e prejudicar a saúde, e em níveis crônicos podem reduzir a eficiência da reprodução dos animais (OLIVEIRA et al., 2015; PEREIRA; SANTOS, 2015).

A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas atinge mais de 25% da produção mundial de grãos, na maioria das vezes, causada por armazenamento incorreto da matéria-prima. Com prejuízo anual de mais de 5 bilhões de dólares, a problemática se concentra em primeiro lugar na saúde humana, pelo risco de ingestão de alimentos contaminados, e em segundo, na saúde e produção animal, devido à queda de produção em decorrência da queda na sanidade dos animais (BRETAS, 2018; NOGUEIRA et al., 2018; ZINEDINE; EL AKHDARI, 2019). A alternativa para isso poderia ser o melhoramento de plantas resistentes; porém, as seleções para a resistências à micotoxinas, além de apresentarem resultados ineficientes na produtividade, não produziram resultados significativos para a proteção dos grãos, pois não há níveis seguros de ingestão devido aos efeitos sinérgicos entre os tipos existentes (GARRIDO-RAMÍREZ et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018; SAVI et al., 2018).

A produção de micotoxinas por fungos é determinada geneticamente e relacionada com as vias metabólicas primárias, como o metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos; fatores ambientais favoráveis (composição e qualidade do substrato, temperatura e umidade) podem aumentar a ocorrência de alimentos contaminados (CHHONKER et al., 2018). Geralmente as micotoxinas em alimentos assumem padrão geográfico; espécies de *Aspergillus* são encontradas principalmente em regiões tropicais, e espécies de *Penicillium* e *Fusarium* em regiões de clima temperado (ZINEDINE; EL AKHDARI, 2019). Assim, a contaminação atinge níveis globais, principalmente pelo amplo comércio de grãos entre os países, e as commodities alimentícias são frequentemente contaminadas com mais de um tipo de micotoxina, já que as espécies de fungos produzem diferentes micotoxinas ao mesmo tempo (DIDWANIA; TRIVEDI, 2018; PEROMINGO et al., 2019).

O efeito tóxico das micotoxinas na saúde humana e animal depende do tipo da micotoxina, nível e duração da exposição, idade, genética, saúde e sexo do indivíduo exposto, e qualidade alimentar. Além disso, a deficiência de vitaminas, a desnutrição e doenças infecciosas são fatores que podem agravar as sequelas micotóxicas. Entre as

Fumonisinás são diésteres de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico e 2-amino-12-16-dimetilpoliidroxieicosanos, com o grupo hidroxila no C14 e C15 esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarboxílico (SORIANO; DRAGACCI, 2004). São altamente polares, solúveis em água e insolúveis em solventes apolares (PLEADIN et al., 2018; IZA et al., 2019). FB podem prejudicar as funções do sistema imunológico, causar edemas pulmonares, lesões no fígado e nos rins, levando o animal à morte, dependendo dos níveis de contaminação e tempo de exposição à toxina (BERTERO et al., 2018; BARAC, 2019).

A toxicidade da fumonisina pode afetar órgãos distintos em diferentes espécies; entretanto o fígado e rins parecem ser afetados de forma constante, sendo hepatóxica em ratos, camundongos, coelhos, macacos, suínos e equinos, e nefrotóxica em ratos, coelhos, perus, frangos, suínos e camundongos (ENONGENE et al., 2000; RIEDEL et al., 2016; QIAN et al., 2016). O consumo de elevadas concentrações de fumonisina pode causar leucoencefalomalácia em equinos (PLATTNER et al., 1990), e síndrome de edema pulmonar e hidrotórax em suínos (HARRISON et al., 1990).

Barbosa et al. (2013) reportaram a contaminação por fumonisina B1 em 98% das amostras de rações oriundas de fazendas de tilápias-do-Nilo no Rio de Janeiro. Esta incidência da micotoxina na dieta de peixes representa grande preocupação, devido aos prejuízos que pode causar. Em diferentes espécies de peixes a toxicidade da fumonisina é apontada como causa de prejuízo na produção (CLAUDINO-SILVA et al., 2018). Para tilápias, níveis superiores a 40mg de FB por quilo de ração pode reduzir o ganho de peso, piorar a conversão alimentar além de afetar o equilíbrio dos esfingolipídios intermediários (TUAN et al., 2013).

Em bagres de um e dois anos de idade, o consumo de dietas contaminadas com 20mg de FB por quilo de ração provocaram alterações hepáticas como necrose e aumento no volume de hepatócitos e infiltração de linfócitos (LUMBERTDACHA et al., 1995). Para trutas (*Oncorhynchus mykiss*), a associação entre FB1 e aflatoxina B1 foi apontada como possível promotor de tumores hepáticos (CARLSON et al., 2001). Já em carpas (*Cyprinus carpio*), dietas contaminadas com fumonisina promoveu maior incidência de lesões dermatológicas bacterianas, além do aumento na contagem de eritrócitos e plaquetas, aumento nas concentrações de creatinina e bilirrubina, e aumento da atividade enzimática de aspartato e alanina aminotransferase (PEPELJNJAK et al., 2002). Outro estudo realizado

em carpas atribuiu às fumonisina efeito neurotóxico, por gerar vacuolização, degeneração e necrose de células neurais (KOVAČIĆ et al., 2009).

O nível de contaminação de rações de tilápias-do-Nilo aumenta a cada ano, perfazendo até 98% (BARBOSA et al., 2013). Devido ao seu papel carcinogênico, e por afetar a síntese de esfingolipídios e seus metabólitos intermediários, é provável que o consumo de fumonisina por estes animais possa alterar características moleculares, produtivas e nutricionais (CLAUDINO-SILVA et al., 2018). Até o presente momento, não há relatos na literatura de estudos que demonstrem a expressão de genes relacionado ao estresse oxidativo e perfil de ácidos graxos em alevinos de tilápia-do-Nilo desafiados com fumonisina, justificando o mérito da pesquisa.

4. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes: espécies reativas de oxigênios, enzimas reparadoras e processo enzimático de reparação

No metabolismo celular normal e em eventos patológicos são formados radicais livres, e quando em excesso, podem danificar a célula. Para combater esse dano, também conhecido como oxidação, o organismo mobiliza seu complexo sistema de proteção antioxidante (MACHADO et al., 2009), que atua como agente de defesa contra os radicais livres (Figura 2).

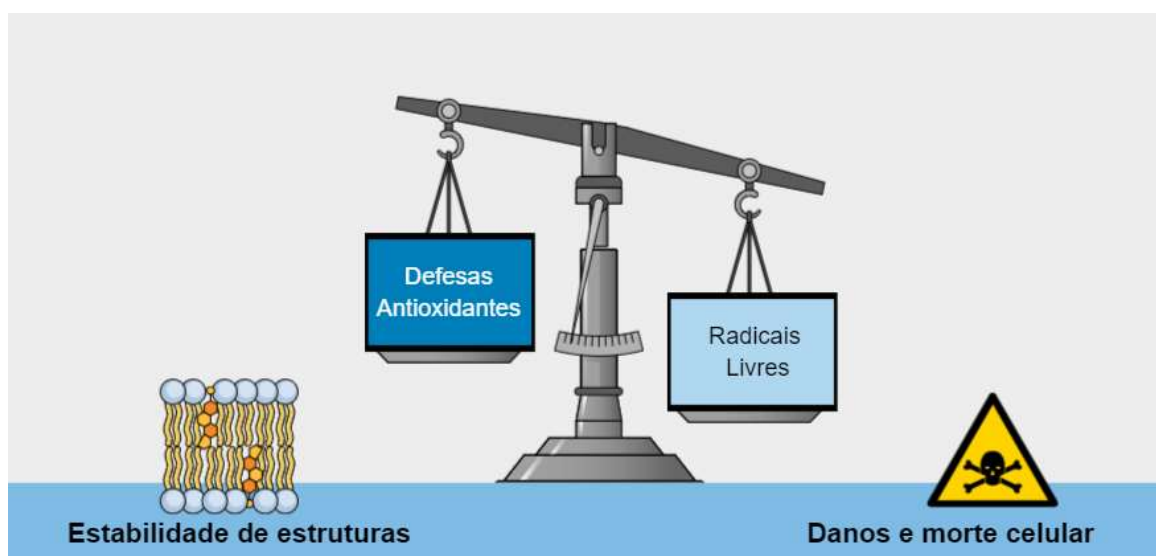


Figura 2. O desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado de estresse oxidativo. Quanto maior o desbalanço, com maior

quantidade de espécies reativas de oxigênio, maior a ocorrência de morte celular programada (apoptose) (MACHADO et al., 2009).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, produzindo radicais livres de forma natural ou por disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS podem provocar sérios danos, reagindo com enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos (DNA), danificando-os (NELSON; COX, 2014). Quando a produção de radicais de oxigênio é exacerbada, as defesas celulares são sobrecarregadas e a célula é danificada. Em circunstâncias normais, os níveis de produtos com oxigênio reduzido são baixos o suficiente para serem efetivamente removidos pelos mecanismos naturais de defesa da célula, as enzimas do estresse oxidativo, que formam a primeira linha de defesa antioxidante contra ROS (Figura 3) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

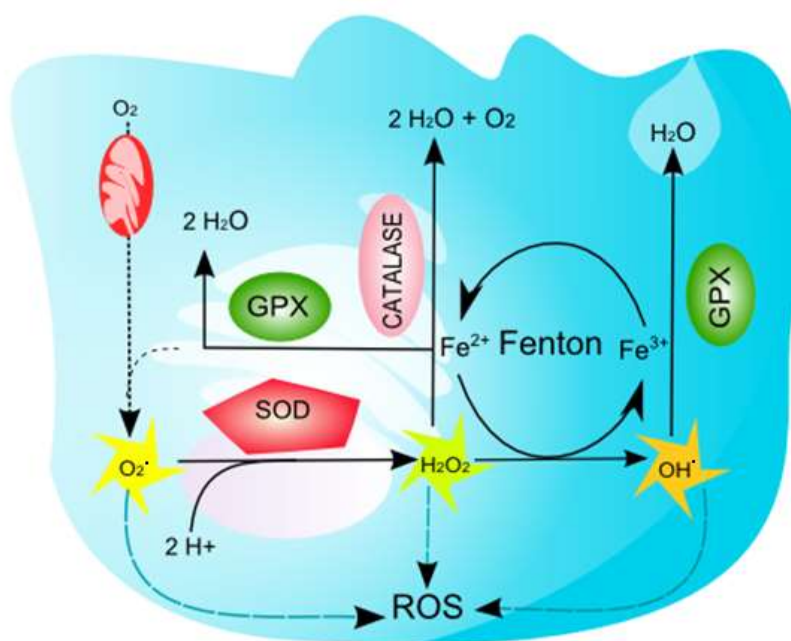


Figura 3. Em mitocôndrias que respiram ativamente, de 0,1 até 4% do oxigênio utilizado na respiração formam $O_2^{\bullet-}$ (superóxido) mais do que suficiente para ter efeitos letais, a não ser que o radical livre seja rapidamente descartado. Para impedir o dano oxidativo induzido pelo $O_2^{\bullet-}$, as células têm a enzima superóxido-dismutase (SOD), que catalisa a reação. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) assim gerado torna-se inofensivo pela ação da catalase (CAT) e da glutatona-peroxidase (GPX), e esta última também agindo contra peróxidos orgânicos. Se a

quantidade de H_2O_2 estiver acima da capacidade de catalização das enzimas, esta molécula se liga a outra de Fe^{2+} (reação de Fenton) e forma o radical hidroxila ($OH^\bullet$), que causa dano celular (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

De modo geral, a interconexão entre sistemas de sinalização de segundos mensageiros é muito comum, apesar de complexa. Estudos reportaram que a intoxicação por fumonisina pode afetar a taxa de ganho de peso (LEDOUX et al., 1992; WEIBKING et al., 1993; LUMLERDACHA et al., 1995; LAZZARI, 1997), além de aumentar o estresse oxidativo (BERNABUCCI et al., 2011). É provável que estas alterações do estado oxidativo estejam relacionadas com mudanças nos padrões de sinalização, e consequentemente, de expressão dos genes relacionados ao combate de ROS, como a glutathiona peroxidase (GPX), e as proteínas de choque térmico, popularmente chamadas de HSPs.

4.1. Glutathiona Peroxidase (GPX)

A GPX foi descoberta inicialmente em eritrócitos de mamíferos (MILLS, 1957). Depois foi encontrada em eritrócitos humanos (AWASTHI et al., 1975), pulmão (CHIU et al., 1976) e fígado de ratos (NAKAMURA et al., 1974), músculo de camundongos (TAPPEL et al., 1982) e peixes (NAKANO et al., 1992). A redução de hidroperóxidos possui ação importante na prevenção de danos oxidativos em tecidos (TOSHIRO et al., 1994). Duas classes distintas desta enzima são conhecidas, a GPX selênio dependente (EC 1.11.1.9) e a GPX selênio independente (EC 2.5.1.18), cada qual possui maior especificidade por determinado substrato (DAUN; ÅKESSON, 2004).

A GPX selênio dependente é capaz de reduzir peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos orgânicos, é tetramérica e possui um átomo de selênio na forma de selenocisteína em cada subunidade. Já a GPX selênio independente está apta a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, exceto o peróxido de hidrogênio, e em substituição à selenocisteína possui um resíduo de tirosina no sítio catalítico (NELSO; COX, 2014; CHAFIK et al., 2019). A atividade da GPX selênio dependente parece ter correlação positiva com a ingestão dietética deste mineral e, consequentemente, níveis inadequados de selênio no organismo podem levar a redução na atividade desta enzima, causando prejuízo na função de degradação de peróxido de hidrogênio (HOLOYSKA et al., 2003); este último em altos

níveis estão relacionados com a auto oxidação de membranas celulares, prejuízos à função imune e danos ao DNA (DE VEGA et al. 2018).

Nos tecidos musculares a maior quantidade de mioglobina e maior conteúdo de mitocôndrias caracterizam as fibras vermelhas (oxidativas), que usam principalmente ácidos graxos como substratos (RAMANATHAN et al., 2019). Por outro lado, as fibras brancas, chamadas de glicolíticas utilizam o glicogênio como fonte de energia principal (DAUN; ÅKESSON, 2004). Localizada nas mitocôndrias e no citosol das células musculares, a maior atividade da GPX nas fibras vermelhas pode ser correlacionada com a função de impedir a oxidação nestas células que estão sob metabolismo aeróbico (CHAN et al., 1994).

4.2. Proteína do choque térmico (HSPs)

As HSPs são um grupo de proteínas cujos níveis celulares aumentam em resposta ao estresse químico, físico e ambiental, para limitar as consequências do dano, facilitar a recuperação celular, e auxiliar no reparo ou direcionamento de proteínas para a degradação (LUENGO et al., 2018).

Em condições normais, as HSPs, em particular a família 70 kDa (HSP70), funcionam como proteínas chaperonas assegurando a conformação apropriada das proteínas recém-sintetizadas (KIM et al., 2018). Além disso as HSP70s são altamente conservadas em quase todos os organismos e evitam a desnaturação de outras proteínas sob estresse fisiológico (ZUANAZZI et al., 2019).

As chaperonas da classe HSP70 também são necessárias para a translocação de proteínas codificadas nucleares do citoplasma para a mitocôndria. Como duas membranas precisam ser cruzadas para alcançar a matriz, existem dois complexos translocadores: membrana externa de transporte e membrana interna de transporte. Para o transporte, as proteínas são desdobradas no citoplasma e protegidas por HSP70 (ASEA; KAUR, 2018).

A membrana externa de transporte reconhece a sequência de sinal carregada positivamente no N terminal da proteína e com a ajuda do potencial de membrana, envolve as cadeias por meio dos poros centrais dos dois complexos. Dentro da membrana interna de transporte, outras moléculas de HSP70 se ligam e puxam a cadeia completamente para dentro da matriz. Tal como com a importação para o retículo endoplasmático, o sinal peptídico é removido proteoliticamente por uma peptidase de sinal durante a translocação (NELSON; COX, 2014; LUENGO et al., 2018).

A regulação da expressão da HSP70 está relacionada a doenças gastrointestinais, neurológicas e neurodegenerativas, renais, cardiovasculares, desordens no sistema circulatório, incluindo regulação do sistema imune, além do uso em terapias para o tratamento de doenças humanas (ASEA; KAUR, 2018). Em animais, pesquisas com HSP70 reportaram aumento da expressão em abelhas (*Apis mellifera*) quando expostas a acaricidas (SILVA-ZACARIN et al., 2006), aumento em ostras (*Crassostrea gigas*) expostas a toxinas (MELLO et al., 2013), aumento em mexilhões (*Mytilus sp.*) expostos a contaminantes orgânicos (JONSSON et al., 2006), variações em tilápia-de-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) submetidas as diferentes densidades (DINI et al., 2006), aumento em tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) expostas a inseticidas (ANSOAR-RODRÍGUEZ et al., 2016) e aumento da expressão em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a íons metálicos, como cobalto, cobre, zinco e prata (SÖYÜT et al., 2012).

Estes trabalhos demonstram que a expressão da HSP70 pode ser indicador do estado de estresse a que os animais foram submetidos. Intensas variações sazonais alteram a expressão dessa proteína, principalmente quando os peixes são expostos a altas temperaturas (JESUS et al., 2013). Ainda, quando desafiados com poluentes xenobióticos, a HSP70 apresentou efeito crioprotetor no cérebro de peixes durante o estresse induzido (EKAMBARAM; NARAYANAN, 2017).

A insuficiência do sistema antioxidante de defesa primário causa o aumento de proteínas intracelulares danificadas. Devido ao estresse no animal, a HSP70 é produzida pelo organismo, protegendo-o contra possíveis danos celulares. A eliminação do excesso destas proteínas intracelulares danificadas pode ser feita por intermédio das chaperonas ou proteínas de estresse, que interagem com enzimas do sistema ubiquitina-proteossoma, revertendo as proteínas danificadas a aminoácidos livres (MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2018).

Com isso, estudos têm abordado a HSP70 como biomarcador de estresse em peixes, reportando efeitos provocado pelo calor e o aumento dos níveis de cortisol circulante (BASU et al., 2001) e o efeito da hipóxia (LÜCKSTÄDT et al., 2004), sendo capazes de sinalizar possíveis alterações expressas nos organismos expostos à diversidades ambientais onde estão inseridos, por meio da expressão de seu gene e consequente ativação da proteína, podendo ser aumentada ou diminuída de acordo com a situação do organismo. Assim, pesquisas com

tilápia-do-Nilo sobre a expressão do gene HSP70 são importantes pelas alterações no desempenho dos animais provocadas pelo estresse.

5. Perfil de ácidos graxos

O aumento da exigência dos consumidores pela qualidade dos produtos alimentares exige que as organizações desenvolvam instrumentos com maior eficiência na segurança, diferenciação e agregação de valor aos seus produtos (GARCIA et al., 2018) pois procuram obter informações detalhadas sobre a origem e a qualidade dos alimentos fornecidos aos animais (DIAS et al., 2018; SPENCE et al., 2018; SMULDERS et al., 2019). O consumo de gordura de origem animal é frequentemente relacionado com problemas de saúde, com destaque aos problemas cardíacos (BRIDI, 2014; TANAKA, 2016; PRATA; MARQUES, 2017; VAZ et al., 2018). Entretanto, estudos realizados demonstram que alguns isômeros de ácidos graxos podem ter efeitos benéficos, evidenciando desta maneira a necessidade de pesquisas que avaliem os efeitos dos ácidos graxos isoladamente (LIMA et al., 2018; MELO et al., 2018) e tem havido interesse crescente nas maneiras de manipular a composição de ácidos graxos da carne, modificando a dieta do animal.

Maiores proporções de ômega 3 na dieta em humanos é importante para evitar o aparecimento de doenças coronarianas, neurológicas, autoimunes, câncer de mama, de próstata e de cólon e artrite reumatoide (FAO/WHO, 2008; DAS, 2017). Porém, há poucos trabalhos disponíveis que possibilitam caracterizar a carne de peixe contaminadas com micotoxinas. O perfil de ácidos graxos tem relevante importância na determinação das propriedades físicas, químicas e sensoriais dos alimentos, e os lipídios nos óleos de sementes são principalmente compostos por triglicerídeos que contêm ácido linoleico e ácido oleico (VAN SOEST, 1994).

A alteração no perfil de ácidos graxos é interessante sob o ponto de vista de diminuir os riscos de doenças coronárias, visto que os ácidos de cadeia média (láurico, mirístico e palmítico) são hipercolesterolêmicos (WILLIAMS, 2000). Em produtos de origem animal, como o pescado, podem ser encontrados compostos benéficos à saúde, dentre os quais se destaca o CLA, que apresenta propriedades anticarcinogênicas e repartidor de nutrientes (MCGUIRE e MCGUIRE, 2000).

Em humanos, ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o linoleico (18:2n-6, AL) e o alfa-linolênico (18:3n-3, AAL) são considerados essenciais, pois sua síntese ocorre

em baixas quantidades sendo necessária sua ingestão na alimentação (YOU DIM, MARTIN e JOSEPH, 2000). São de extrema importância para proteínas de membrana, envolvendo processos como diferenciação e proliferação celular (SLATER et al., 1996), para o funcionamento de algumas enzimas (SAITO et al., 1994), neurotransmissores (SRINIVASARAO et al., 1997; DAS, 2017) e para a manutenção das propriedades físicas da membrana (EHRINGER et al., 1990; LIU et al., 2017).

6. Objetivos

O objetivo deste estudo foi verificar se a fumonisina, quando ingerida pela tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), causa alterações na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo (GPX) e proteção contra danos celulares (HSP70), e se modifica a qualidade da carne e o perfil de ácidos graxos no filé.

As hipóteses foram:

- 1) O consumo de dieta contaminada por fumonisina modula a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e proteção celular.
- 2) Por competir com o sítio de ligação e inibir a síntese de ceramida, os animais consumindo dietas com inclusão de fumonisina terão maior quantidade de ácidos graxos saturados.
- 3) O desempenho dos animais contaminados com fumonisina é menor do que os animais sem contaminação.

Os capítulos 2, intitulado “Desafio com fumonisina FB1 + FB2 altera o perfil de ácidos graxos em alevinos de tilápia-do-Nilo”, e 3, intitulado “Fumonisina altera o equilíbrio redox em alevinos de tilápia-do-Nilo” estão redigidos de acordo com as normas para publicação no do periódico Aquaculture Journal - <https://www.journals.elsevier.com/aquaculture>, disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/aquaculture/0044-8486/guide-for-authors>>.

Referências Bibliográficas

- ABDEL-GHANY, H. M. et al. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of thermal biology**, v. 79, p. 50-55, 2019.
- ALIZADEH, A. M. et al. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 13, n. 6, p. 2625-2628, 2012.
- ANDRADE, E. C. et al. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Revista de APS**, v. 13, n. 2, p. 231-240, 2010.
- ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. Mycotoxin detection. **Current opinion in biotechnology**, v. 37, p. 120-126, 2016.
- ANSOAR-RODRÍGUEZ, Y. et al. Liver alterations in *Oreochromis niloticus* (Pisces) induced by insecticide imidacloprid: histopathology and heat shock protein in situ localization. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, n. 12, p. 881-887, 2016.
- ASEA, Alexzander AA; KAUR, Punit (Ed.). **HSP70 in Human Diseases and Disorders**. Springer, 2018. 403 p.
- AWASTHI, Y. C.; BEUTLER, E.; SRIVASTAVA, S. K. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 13, p. 5144-5149, 1975.
- BARAC, A. Mycotoxins and Human Disease. In: **Clinically Relevant Mycoses**. Springer, Cham, 2019. p. 213-225.
- BARBOSA, T. S. et al. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **International Aquatic Research**, v. 5, n. 1, p. 3, 2013.
- BASU, N. et al. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **General and comparative endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 97-105, 2001.
- BERNABUCCI, U. et al. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 3, p. 684-691, 2011.

BERTERO, Alessia et al. Fusarium molds and mycotoxins: Potential species-specific effects. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 244, 2018.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 11, p. 743-745, 1988.

BORDINI, J. G. et al. Impact of industrial dry-milling on fumonisin redistribution in non-transgenic corn in Brazil. **Food chemistry**, v. 220, p. 438-443, 2017.

BRABO, M. F. et al. Current scenario of fish production in the world, Brazil and Pará State: emphasis on aquaculture. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.

BRETAS, A. A. Inclusión of mycotoxin adsorbents for piglets. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 80-95, 2018.

BRIDI, A. M. Consumo de carne bovina e saúde humana: convergências e divergências. **Bovinocultura de Corte: desafios e tecnologias**. 2. ed. Salvador: EDUFBA, 2014.

CARLSON, D.B. et al. Fumonisin B1 Promotes Aflatoxin B1 and N-Methyl-N9-nitronitrosoguanidine initiated liver tumors in rainbow trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 172, 29–36, 2001.

CARVALHO, K. D. O turismo rural como alternativa para o desenvolvimento das comunidades de Itamatatuiá e Santa Maria em Alcântara, Maranhão (Brasil). **Revista de Turismo Contemporâneo**, v. 6, n. 1, 2018.

CHAFIK, A. et al. Characterization of an interesting selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) protecting cells against environmental stress: The *Camelus dromedarius* erythrocytes Se-GPx. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101000, 2019.

CHAN, K. M.; DECKER, E. A.; FEUSTMAN, C. Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 403-426, 1994.

CHHONKER, S. K. et al. An Overview of Mycotoxins in Human Health with Emphasis on Development and Progression of Liver Cancer. **Clinical Oncology**, v. 3, p. 1408, 2018.

CHIU, D. T.; STULTS, F. H.; TAPPEL, A. L. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 445, n. 3, p. 558-566, 1976.

CLAUDINO-SILVA, S. C. et al. Challenge with fumonisins B1 and B2 changes IGF-1 and GHR mRNA expression in liver of Nile tilapia fingerlings. **World Mycotoxin Journal**, v. 11, n. 2, p. 237-245, 2018.

DAS, U. N. Molecular Mechanisms behind the beneficial activity of polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease and related conditions. **Neuroprotective Effects of Phytochemicals in Neurological Disorders**, p. 359, 2017.

DAUN, C.; ÅKESSON, B. Glutathione peroxidase activity, and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. **Meat science**, v. 66, n. 4, p. 801-807, 2004.

DE VEGA, R. G. et al. Protective effect of selenium supplementation following oxidative stress mediated by glucose on retinal pigment epithelium. **Metallomics**, v. 10, n. 1, p. 83-92, 2018.

DIAS, A. G. et al. Percepção de consumidores sobre produtos de origem caprina na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 1, n. 1, p. 99-114, 2018.

DIDWANIA, N.; TRIVEDI, P. C. Mycotoxins: A review of toxicity, metabolism and biological approaches to counteract the production in food. **MR International Journal of Engineering & Technology**, v. 6, n. 2, p. 38-42, 2018.

DIESTEL, C.; SANTOS, M.; ROMI, M. Tratamento nutricional nas doenças inflamatórias intestinais. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 11, n. 4, 2012.

DINI, L. et al. Expression of stress proteins 70 in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during confinement and crowding stress. **Italian Journal of Zoology**, v. 73, n. 2, p. 117-124, 2006.

EHRINGER, W. et al. A comparison of the effects of linolenic (18: 3 Ω 3) and docosahexaenoic (22: 6 Ω 3) acids on phospholipid bilayers. **Chemistry and physics of lipids**, v. 54, n. 2, p. 79-88, 1990.

EKAMBARAM, P.; NARAYANAN, M. Upregulation of HSP70 extends Cytoprotection to fish brain under xenobiotic stress. **Journal of Fisheries Sciences. com**, v. 11, n. 1, p. 11, 2017.

ENONGENE, E. N. et al. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B1. **Food and chemical toxicology**, v. 38, n. 9, p. 793-799, 2000.

FAO/WHO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome, 2018. 227p. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>>. Acesso em: 10 abr, 2019.

GARCIA, S. F. A. et al. Quais os sinais de carne macia e saborosa? Análise dos atributos da carne bovina que, no momento da compra, melhor sinalizam os benefícios mais desejados pelo consumidor. **Revista Brasileira de Marketing**, v. 17, n. 4, p. 487-501, 2018.

GARRIDO-RAMÍREZ, E. R. et al. Identification of fungi and mycotoxins associated to coffee beans (*Coffea L.*) in Chiapas, Mexico. **Agroproductividad**, v. 11, n. 12, 2018.

GOMES, V. D. S. et al. Caracterização sumária dos empreendimentos tipo pesque-pague em cidades do Rio Grande do Norte. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 18, n. 4, 2016.

GONÇALVES, K. D. M. et al. Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil. **Food control**, v. 93, p. 260-264, 2018.

GRENIER, B. et al. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 10, p. 1465-1473, 2012.

HARRISON, L. R. et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125-1131, 2002.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa pecuária municipal. IBGE, 2019. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

IZA, I. et al. Procedure for reducing contaminants in vegetable protein matter. **U.S. Patent Application**, n. 15/775,177, 31 jan. 2019.

JAVED, T. et al. Comparative pathologic changes in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or purified fumonisin B1 and moniliformin. **Mycopathologia**, v. 159, n. 4, p. 553-564, 2005.

JESUS, T. F.; INÁCIO, A.; COELHO, A. M. Different levels of hsp70 and hsc70 mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. **Genetics and molecular biology**, v. 36, n. 1, p. 061-069, 2013.

JOBIM, C.C.; GONÇALVES, G.D.; SANTOS, G.T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. **Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas**, v. 1, p. 242-261, 2001.

JONSSON, H. et al. Expression of cytoskeletal proteins, cross-reacting with anti-CYP1A, in *Mytilus* sp. exposed to organic contaminants. **Aquatic toxicology**, v. 78, p. S42-S48, 2006.

KIM, J. Y. et al. The 70-kDa heat shock protein (Hsp70) as a therapeutic target for stroke. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 22, n. 3, p. 191-199, 2018.

KOVAČIĆ, S. et al. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio* L.). **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 60, n. 4, p. 419-425, 2009.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2ª ed. Curitiba: Paranaset. 1997. 134p.

LEDOUX, D. R. et al. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 330-333, 1992.

LIMA, R. N. et al. Importância do ácido linoleico conjugado (CLA) em produtos de origem animal. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 4, p. 1307-1331, 2018.

LIU, L. et al. Human fetal intestinal epithelial cells metabolize and incorporate branched chain fatty acids in a structure specific manner. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 116, p. 32-39, 2017.

LÜCKSTÄDT, C. et al. Stress protein Hsp70 response of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus 1758) to induced hypoxia and recovery. **Verhandlungen der Gesellschaft für Ichthyologie**, v. 2004, p. 4, 2004.

LUENGO, Tania Morán; MAYER, Matthias P.; RÜDIGER, Stefan GD. The Hsp70–Hsp90 Chaperone Cascade in Protein Folding. **Trends in cell biology**, 2018.

LUMLERTDACHA, S. et al. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, n. 2-3, p. 201-218, 1995.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MAURI, G. N. et al. A aquicultura em comunidades tradicionais: ameaças, oportunidades e dificuldades. **Brazilian Journal of Production Engineering-BJPE**, v. 3, n. 1, p. 48-56, 2017.

MCGUIRE, M. A.; MCGUIRE, M. K. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. E-Suppl, p. 1-8, 2000.

MELLO, D. F. et al. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* and its toxin (saxitoxin) on the functional activity and gene expression of *Crassostrea gigas* hemocytes. **Harmful Algae**, v. 26, p. 45-51, 2013.

MELO, M. T. P. et al. Fatty acid composition of cheese and milk of cows fed with banana peel. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 3, p. 965-974, 2018.

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **Journal of Biological Chemistry**, v. 229, n. 1, p. 189-197, 1957.

MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C. S. HSP70 as a Biomarker: an Excellent Tool in Environmental Contamination Analysis—a Review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 8, p. 264, 2018.

NAKAMURA, W.; HOSODA, S.; HAYASHI, K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 358, n. 2, p. 251-261, 1974.

NAKANO, T.; SATO, M.; TAKEUCHI, M. Glutathione peroxidase of fish. **Journal of food science**, v. 57, n. 5, p. 1116-1119, 1992.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NOGUEIRA, M. et al. Natural contamination with mycotoxins produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* in malting barley in Argentina. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 78, 2018.

OLIVEIRA, F. et al. Principais micotoxinas que afetam a produção de alimentos. **RAMVI, Getúlio Vargas**, v. 2, n. 33, p. 2358-2243, 2015.

OSWALD, I. P. et al. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 10, p. 5870-5874, 2003.

PEPELJNJAK, S. et al. Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio* L.) on feed amended with fumonisin B 1. **Mycopathologia**, v. 156, n. 2, p. 139-145, 2003.

PEREIRA, K. C.; SANTOS, C. F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 4, 2015.

PEROMINGO, B. et al. Diffusion of mycotoxins and secondary metabolites in dry-cured meat products. **Food Control**, v. 101, p. 144-150, 2019.

PICKLER, E.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Desenvolvimento e potencial da tilapicultura no Brasil. **Brazilian Review of Economics & Agribusiness/Revista de Economia e Agronegócio**, v. 16, n. 2, 2018.

PIVA, A. et al. Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B1 when fed to weanling piglets. **Journal of animal science**, v. 83, n. 8, p. 1939-1947, 2005.

PLATTNER, R. D. et al. A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, v. 82, n. 6, p. 698-702, 1990.

PLEADIN, J. et al. The effect of thermal processing on the reduction of maize fumonisin content. In: **11th International Scientific and Professional Conference With Food to Health**. 2018.

PRATA, P. M.; MARQUES, P. H. Saúde e Alimentação no Trabalho. **Vertentes e Desafios da Segurança**, p. 119, 2017.

QIAN, G. et al. Sequential dietary exposure to aflatoxin B1 and fumonisin B1 in F344 rats increases liver preneoplastic changes indicative of a synergistic interaction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 95, p. 188-195, 2016.

RAMANATHAN, R. et al. Mitochondrial functionality and beef colour: A review of recent research. **South African Journal of Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 9-19, 2019.

REIS, V. R.; DE ALMEIDA, F. L.; PIFERRER, F. Produção de populações monossexo em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.1, p.22-28, 2016.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. FO; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

RIEDEL, S. et al. Differential modulation of the lipid metabolism as a model for cellular resistance to fumonisin B1–induced cytotoxic effects in vitro. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 109, p. 39-51, 2016.

ROCHA, L. O. et al. Association between FUM expression and fumonisin contamination in maize from silking to harvest. **Crop protection**, v. 94, p. 77-82, 2017.

SAITO, H. et al. Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationships with 1-octanol/water partition coefficients. **Chemosphere**, v. 26, n. 5, p. 1015-1028, 1993.

SAVI, G. D. et al. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 270, p. 5-13, 2018.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. et al. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2012. p. 696-703.

SLATER, S. J. et al. Polyunsaturation in cell membranes and lipid bilayers and its effects on membrane proteins. **Lipids**, v. 31, n. 1, p. S189-S192, 1996.

SMULDERS, F. J. M.; RIETJENS, I. M. C. M; ROSE, M. D. Chemical hazards in foods of animal origin and the associated risks for public health: elementary considerations. In: **Chemical hazards in foods of animal origin**. Wageningen Academic Publishers, 2019. p. 99-117.

SORIANO, J. M.; DRAGACCI, S. Occurrence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, n. 10, p. 985-1000, 2004.

SÖYÜT, H. et al. Changes in carbonic anhydrase activity and gene expression of Hsp70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle after exposure to some metals. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 36, n. 5, p. 499-508, 2012.

SPENCE, M. et al. Exploring consumer purchase intentions towards traceable minced beef and beef steak using the theory of planned behavior. **Food control**, v. 91, p. 138-

SRINIVASARAO, P. et al. Influence of dietary fat on the activities of subcellular membrane-bound enzymes from different regions of rat brain. **Neurochemistry international**, v. 31, n. 6, p. 789-794, 1997.

SUN, Y. I.; OBERLEY, Larry W.; LI, Ying. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500, 1988.

TANAKA, N. M. Saúde quântica no tratamento da obesidade. **Revista Saúde Quântica**, v. 5, n. 5, p. 128-141, 2016.

TAPPEL, M. E.; CHAUDIERE, J.; TAPPEL, A. L. Glutathione peroxidase activities of animal tissues. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 945-949, 1982.

TOSHIRO, A. et al. Glutathione peroxidase activity in tissues of chickens supplemented with dietary selenium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107, n. 1, p. 245-248, 1994.

TUAN, N. A. et al. Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different concentrations of moniliformin or fumonisin B1. **Aquaculture**, v. 217, n. 1-4, p. 515-528, 2003.

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1-2, p. 81-93, 1999.

URBANEK, Kinga Anna et al. Deoxynivalenol as potential modulator of human steroidogenesis. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 12, p. 1450-1459, 2018.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell. 1994. 476p.

VAZ, D. S. S. et al. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 2, 2018.

VISCONTI, A. et al. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR—measurements and testing projects. **Natural toxins**, v. 3, n. 4, p. 269-274, 1995.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.

WEIBKING, T. S. et al. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v. 72, n. 3, p. 456-466, 1993.

WILLIAMS, C.M. Dietary fatty acids and human health. **Annales de Zootechnie**, v.49, p.165-180, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat & fatty acids. **From the joint FAO/WHO expert consultation on fats and fatty acids in human nutrition**, p. 10-14, 2008.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, n. 4-5, p. 383-399, 2000.

ZINEDINE, A.; EL AKHDARI, S. Food Safety and Climate Change: Case of Mycotoxins. In: **Handbook of Research on Global Environmental Changes and Human Health**. IGI Global, 2019. p. 74-97.

ZUANAZZI, J. S. G. et al. Anoxia stress and effect on flesh quality and gene expression of tilapia. **Food Science Technology**, Campinas, v. 39, n. 1, p. 195-202, mar. 2019.

II – DESAFIO COM FUMONISINA FB₁ + FB₂ ALTERA O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO (*Aquaculture Journal*)

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734546>

Resumo

A toxicidade da fumonisina (FB) tem sido considerada para diferentes espécies de peixes por causar desequilíbrio entre as bases esfingóides e prejudicar vários processos celulares, como a diferenciação celular e o crescimento. A hipótese de que o FB altera o desempenho e modifica o perfil de ácidos graxos no músculo de alevinos de tilápia-do-Nilo foi testada. Foram utilizados 180 peixes distribuídos em quatro tratamentos, controle (sem adição de FB), 20 (FB20), 40 (FB40) e 60 (FB60) mg / kg de FB para quantificar o desempenho, rendimento de músculo (filé) após o abate, resíduo mineral fixo, proteína, lipídios e análise do perfil de ácidos graxos. O ganho em peso diário aparente foi menor ($Y = 0,019x^2 - 0,124x + 0,325$; $R^2 = 0,928$) para peixes alimentados com dietas contendo FB em comparação ao grupo controle. O efeito negativo nas taxas de crescimento resultou em redução no rendimento de filé ($P < 0,001$). Proteína foi menor (FB60 = 15,38%) para a dose maior do que o controle ($P = 0,0003$). A umidade foi maior para o nível de FB20, com efeito quadrático de regressão ($R^2 = 0,688$), os valores para resíduo mineral fixo apresentaram efeito linear de regressão ($R^2 = 0,811$) e apresentaram efeito quadrático de regressão ($R^2 = 0,868$). Os ácidos graxos saturados totais foram maiores em peixes alimentados com FB60 ($37,13 \pm 0,99$) que qualquer outro tratamento. Os ácidos graxos monoinsaturados totais não variaram entre os tratamentos dietéticos, assim como o total de ômega 6 ($\omega 6$). Os ácidos graxos totais ômega 3 ($\omega 3$) foram maiores nos peixes alimentados com FB40 ($4,99 \pm 0,15$) e FB60 ($5,20 \pm 0,13$) do que no FB20 ($4,36 \pm 0,03$) e no tratamento controle ($4,43 \pm 0,18$). Os ácidos graxos poliinsaturados totais foram significativamente maiores nos peixes alimentados com FB40

(33,70 ± 1,01) e FB60 (33,73 ± 0,29). A fumonisina piora o desempenho em alevinos de tilápias-do-Nilo e modifica o perfil de ácidos graxos, pois eleva a quantidade de ácidos graxos saturados e poliinsaturados, e reduz o nível de ácidos graxos monoinsaturados.

Palavras-chave: *Fusarium moniliforme*, lipidogênese, *Oreochromis niloticus*, toxicidade.

Abstract

The toxicity of fumonisin (FB) has been proposed for different fish species because it causes imbalance between the sphingoid bases and impairs several cellular processes, such as cell differentiation and growth. In this study, we tested the hypothesis that FB changes performance and modifies the fatty acid profile in the muscle of Nile tilapia fingerlings. A total of 180 fish were distributed in four treatments: control treatment (without addition of FB), 20 (FB20), 40 (FB40) and 60 (FB60) mg/kg FB) in order to measure performance, muscle yield, mineral residue, protein, total lipids and fatty acid content. The apparent daily gain was lower ($Y = 0.019x^2 - 0.124x + 0.325$; $R^2 = 0.928$) for fish fed diets containing FB compared to the control group. The negative effect on growth rates resulted in a reduction in fillet yield ($P < 0.001$). Crude protein was statistically lower (FB60 = 15.38%) for the higher dose than for the control group ($P = 0.0003$). The moisture was higher for the FB20 level, with quadratic regression effect ($R^2 = 0.688$), the ashes had a linear regression effect ($R^2 = 0.811$) and showed a quadratic regression effect ($R^2 = 0.868$). Total saturated fatty acids were higher in fish fed with FB60 (37.13 ± 0.99) diet than for any other treatment. Total monounsaturated fatty acids did not vary between dietary treatments, as did total omega 6 ($\omega 6$). Total omega 3 fatty acids ($\omega 3$) were significantly higher in fish fed with FB40 (4.99 ± 0.15) and FB60 (5.20 ± 0.13) diets than for FB20 (4.36 ± 0.03) and the control treatment (4.43 ± 0.18). Total polyunsaturated fatty acids were significantly higher in fish fed with FB40 (33.70 ± 1.01) and FB60 (33.73 ± 0.29) diets. Therefore, fumonisin worsens

performance in Nile tilapia fingerlings and modifies their fatty acid profile, as it increases the amount of saturated and polyunsaturated fatty acids and decreases the level of monounsaturated fatty acids.

Keywords: *Fusarium sp.*, lipidogenesis, *Oreochromis niloticus*, toxicity.

1. Introdução

A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas alcança mais de 25% da produção mundial de grãos (Zinedine e El Akhdari, 2019). No Brasil, a contaminação por FB1 em rações de fazendas de tilápias atinge mais de 97% das amostras (Barbosa et al., 2013). Este valor é preocupante, pois a fumonisina é conhecida por causar danos aos animais e prejuízos a produção (Bretas, 2018). As fumonisinas são micotoxinas produzidos por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*, contaminante comum do milho. Em nível metabólico, a ação das fumonisinas FB na redução da síntese de ceramidas converge no acúmulo de bases esfingoides, como demonstrado por Wang et al. (1991).

A esfingosina, uma dessas bases acumulativas, tem como precursor estrutural a molécula de palmitoil-CoA, que de forma semelhante ao citrato, possui ação inibitória da atividade da acetil-CoA carboxilase, uma enzima chave na síntese de malonil-CoA. Este, por sua vez, é doador de carbono para o complexo multienzimático da ácido-graxo-sintase, essencial para a síntese de ácidos graxos nas células (Nelson e Cox., 2014). O desequilíbrio entre as bases esfingoides tem sido considerado responsável por um efeito secundário das fumonisinas em vários processos celulares, como diferenciação e crescimento celular (Claudino-Silva et al., 2019), apoptose (Claudino-Silva et al., 2018a), estresse oxidativo (Domijan e Abramov, 2011) e hipometilação do DNA (Chuturgoon et al., 2014).

Em animais, a fumonisina têm sido associada a diversas doenças em animais como leucoencefalomalácia equina, imunossupressão em ratos, edema pulmonar suíno, toxicidade hepática e renal e câncer hepático em camundongos, além de carcinoma esofágico humano em alguns países africanos e populações chinesas (Harrison et al., 1990; Kellerman et al., 1990; Gelderblom et al., 1997). A toxicidade da fumonisina, em particular para peixes, foi testada em diferentes espécies. Em bagres pesando aproximadamente 1,2 e 31 g, o consumo de dietas contaminadas com 20, 80, 320 ou 720 mg FB / kg de dieta levou a anormalidades hepáticas como aumento do volume de hepatócitos, infiltração de linfócitos e hepatócitos necróticos (Lumlertdacha et al., 1995).

Em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a aflatoxina B1 teve seu efeito carcinogênico hepático potencializado por sua associação com a fumonisina B1 (Carlson et al., 2001). Um estudo com carpa (*Cyprinus carpio*) atribuiu o efeito neurotóxico à fumonisina por vacuolização, degeneração e necrose de neurônios (Kovačić et al., 2009). Em tilápia (*Oreochromis niloticus*), Tuan et al. (2003) observaram que níveis de FB superiores a 40 mg / kg de dieta poderiam reduzir o ganho de peso, piorar a conversão alimentar e afetar diretamente o equilíbrio dos intermediários esfingolipídicos. No entanto, não foram encontrados relatos sobre o efeito das fumonisinas na composição de ácidos graxos na carne de quaisquer animais.

O presente estudo foi desenvolvido sob a hipótese de que a fumonisina altera a composição química e o perfil de ácidos graxos no músculo de alevinos de tilápia-do-Nilo. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da adição de diferentes níveis de fumonisina na dieta de alevinos de tilápias de 1 a 14 dias e de 15 a 28 dias sobre a composição química (proteína, umidade, matéria mineral, lipídios totais) e perfil de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poliinsaturados).

2. Material e Métodos

2.1 Delineamento experimental

Os procedimentos adotados neste experimento obedeceram ao Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, *campus* de Botucatu (CEUA - FMVZ - UNESP, protocolo número 0016/2017). O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM), localizado em Maringá-PR, Brasil. Um total de 180 alevinos machos, invertidos sexualmente, do grupo GIFT $\times$ Thai, com peso médio de $2,64 \pm 0,06$ g, foram utilizados no experimento.

Os peixes foram distribuídos em três tanques de fibrocimento com volume útil de 900 L cada, com sistema individual de restauração de água (15% / dia) e aeração constante por meio de rocha porosa acoplada a um ventilador de ar central. Quatro tanques-rede (hapas) foram inseridos em cada tanque, totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos e três repetições. Cada hapa líquida tinha um volume individual de 225 L, que abrigava 15 peixes, totalizando 15 L por peixe. Os peixes passaram por período de aclimação de 15 dias antes do início do experimento.

2.2 Controle ambiental

A temperatura foi medida duas vezes ao dia em cada tanque, às 09h00 e às 17h00. A renovação da água foi realizada individualmente em cada tanque a uma taxa de 5% por dia com aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a ventilador central. As variáveis oxigênio dissolvido e pH foram medidas pela manhã durante todo o período experimental com kit individual.

2.3 Dietas experimentais

Quatro dietas isocalóricas (aproximadamente 3.000 kcal de energia digestível / kg de dieta) e isoprotéicas (aproximadamente 33% de proteína bruta) foram formuladas (Tab. 1), variando apenas na inclusão de diferentes níveis de fumonisina B1 (6,06 mg toxina / g de meio) + fumonisina B2 (1,35 mg de toxina / g de meio). O meio de crescimento do FB foi obtido e avaliado pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As dietas foram formuladas considerando a concentração de FB1 + FB2, totalizando uma concentração de 7,41mg toxina / g de meio.

Tab. 1 – Composição das dietas experimentais para alevinos de tilápia-do-Nilo desafiados com fumonisina (FB).

<i>Ingrediente (%)</i>	<i>Dieta experimental</i>			
	Controle	20 mg FB/kg	40 mg FB/kg	60 mg FB/kg
Soja	53,7	53,7	53,7	53,7
Milho	31,0	31,0	31,0	31,0
Gluten de milho 60	8,2	8,2	8,2	8,2
Óleo de soja	2,0	2,0	2,0	2,0
Amido de milho	1,0	1,0	1,0	1,0
DL-methionina	0,01	0,01	0,01	0,01
Calcário calcítico	0,1	0,1	0,1	0,1
Fosfato Bicálcico	2,9	2,9	2,9	2,9
Vitamina C ¹	0,06	0,06	0,06	0,06
Suplemento vitamínico e mineral ²	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal comum	0,5	0,5	0,5	0,5
BHT (antioxidante) ³	0,03	0,03	0,03	0,03
Fumonisina B1+B2	-	0,002	0,004	0,006
TOTAL	100	100	100	100
<i>Composição química da dieta (%)⁴</i>				

Proteína	33,62	33,60	33,61	33,61
Matéria seca	89,52	89,51	89,50	89,52
Gordura	4,33	4,33	4,30	4,29
Resíduo mineral	5,79	5,75	5,76	5,78

¹Vitamina C: sais de cálcio L-ácido ascórbico 2-fosfato, 42% ingrediente ativo; ² Suplemento vitamínico e mineral: Composição/kg de produto: vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ácido fólico = 1.200 mg; vit. B5 = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotin = 48 mg; colina = 65.000 mg; vit. B3 = 24.000 mg; Fe = 10.000 mg; Cu = 600 mg; Mn = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; e Se = 20 mg; ³Hidroxitolueno butilado (Antioxidante); ⁴ Composição com base na matéria natural.

Quatro grupos experimentais foram formados: GRUPO 1 - dieta controle, com 0 mg de inclusão de CE / kg de dieta; GRUPO 2 - 20 mg FB / kg; GRUPO 3 - 40 mg FB / kg; e GRUPO 4 - 60 mg de inclusão de CE / kg. Concentrações de fumonisina na dieta foram confirmadas por análises laboratoriais. A dieta foi peletizada, seca em estufa a 55°C por 48 h e desintegrada em moinho manual. As partículas foram classificadas de acordo com seu tamanho (1 a 2 mm) e fornecidas manualmente três vezes ao dia para a saciedade aparente.

2.4 Desempenho

Para determinar o ganho de peso médio diário, todos os peixes foram pesados no primeiro, no 14º e no 28º dia de tratamento. A diferença entre o peso inicial e final dentro de cada tratamento foi feita para determinar o ganho por período e depois dividida pelo período, 14 ou 28 dias, para determinar o ganho diário aparente. Para determinar o consumo médio de ração, o recipiente contendo as dietas experimentais foi pesado semanalmente, e a diferença entre os pesos inicial e final foi registrada. Os valores obtidos foram considerados

após a dedução da mortalidade. A eficiência alimentar foi calculada como a razão entre o ganho médio de peso dos animais e o consumo médio de ração.

2.5 Abate e avaliações

Para as avaliações da composição química e dos perfis de ácidos graxos, os peixes foram anestesiados, eutanasiados e eviscerados (Gontijo et al., 2003). As avaliações da composição química foram realizadas para umidade (39.1.02), proteína (método de Kjeldahl-micro, 39.1.19), e resíduo mineral fixo (39.1.09) (AOAC, 2012).

Os lipídeos totais das dietas e dos peixes foram extraídos por meio da técnica de extração a frio (Bligh e Dyer, 1959) e posteriormente a transesterificação de triglicerídeos (Hartman e Lago, 1973). Os ésteres metílicos foram analisados por amostrador automático de cromatografia gasosa (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, EUA) equipado com detector de ionização de chama a 240°C e coluna capilar de sílica fundida (100m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,20µm, Restek 2560). Ácidos graxos foram identificados com base no tempo de retenção dos padrões de ácidos graxos das amostras (Sigma, FAME Mix, C4-C24) e o cálculo das áreas de pico mg/g desses ácidos graxos em mg/g de lipídios totais foi realizada em relação ao padrão interno, o metil tricosanoato (Sigma).

2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados usando o procedimento REG (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

3. Resultados

3.1 Controle Ambiental

Nos primeiros 14 dias de experimento, foram observadas mortalidades, variando de 24,88% para a dieta com 60 mg/Kg, 31,08% para 40 mg/Kg e 6,25% para 20 mg/Kg e tratamento controle. Após esse período, não houve mortalidade. Os valores médios para pH e oxigênio dissolvido foram $7,0 \pm 0,3$ e $7,5 \pm 0,2$ mg/L, respectivamente. A temperatura média em tanques durante o período experimental foi de $24,5 \pm 3,8$ °C, sem diferenças entre tanques e tratamentos.

3.2. Desempenho

O ganho em peso diário aparente de alevinos de tilápia alimentados com níveis crescentes de FB1 + B2, por 28 dias, é mostrado na Fig. 1. O ganho em peso diário aparente foi menor para peixes alimentados com FB1 + FB2 comparados ao controle; no entanto, nenhuma diferença foi obtida entre os níveis de FBs ($P < 0,0001$). Da mesma forma, o efeito negativo nas taxas de crescimento resultou em uma redução no rendimento de filés (Fig 2) ($P < 0,001$). Não houve diferença no consumo de ração.

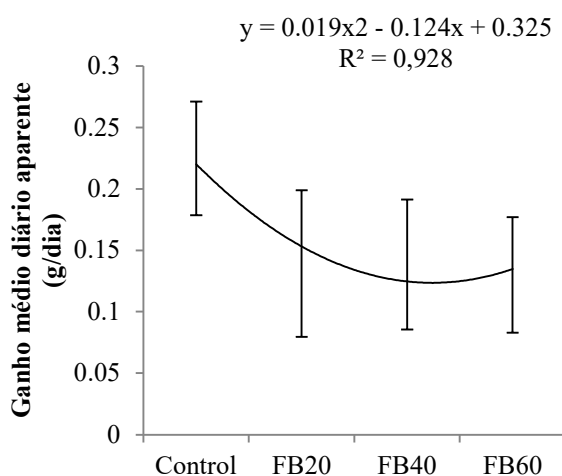


Fig. 1. Ganho em peso aparente diário de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com níveis crescentes de fumonisina B1 + B2

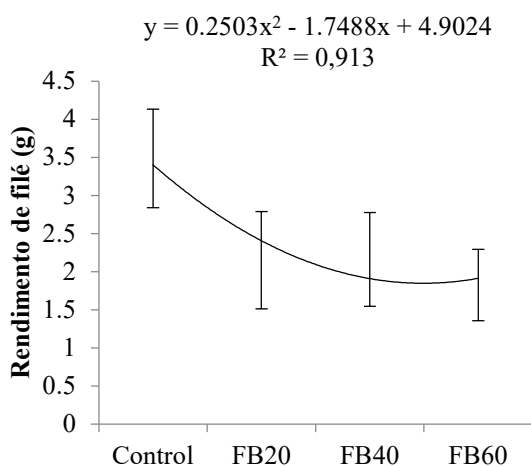


Fig. 2. Rendimento de file de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentadas com níveis crescentes de fumonisina B1 + B2.

3.3. Composição química

A composição química do músculo de alevinos de tilápia alimentados com níveis crescentes de FB1 + FB2, por 28 dias, é mostrada na Tabela 2. Os níveis de proteína em alevinos tratados com a dose mais alta de fumonisina (FB60) foram menores que o controle e outras concentrações de fumonisina (FB20 e FB40), com efeito de regressão quadrática ($Y = -0,507x^2 + 1,912x + 16,13$; $R^2 = 0,646$). A umidade foi maior para o nível de FB20, com efeito quadrático de regressão ($Y = -8,682x^2 + 20,06x + 68,03$; $R^2 = 0,688$). As taxas de resíduo mineral mostraram-se nível dependentes da dose, com efeito linear de regressão ($Y = 0,205x + 1,465$; $R^2 = 0,811$). Os valores de lipídios totais em alevinos tratados com a fumonisina (FB20, FB40 e FB60) foi menor que o controle, com efeito quadrático de regressão ($Y = 0,140x^2 - 0,806x + 1,796$; $R^2 = 0,868$).

Tab. 2. Composição química do músculo de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentadas com níveis de FB1 + FB2

	Proteína (%)	Umidade (%)	Resíduo mineral (%)	Lipídeos totais (%)
Controle	17,82±0,63	80,53±0,26	1.76±0.09	1.36±0.093
FB20	17,07±0,20	80,36±0,22	1.69±0.20	1.02±0.172
FB40	18,16±0,25	80,20±0,24	2.17±0.04	0.67±0.008
FB60	15,38±0,54	80,76±0,56	2.28±0.10	1.04±0.069
CV%	2,61	0,42	6,41	10,1
<i>P</i> valor	0,0003	0,0750	0,0004	0,0003

Valores representam média ± desvio padrão.

3.4. Perfil de ácidos graxos

Não houve diferença ($P=0,0863$) entre o perfil de ácidos graxos das dietas fornecidas aos animais para os quatro tratamentos (Tabela 3). O perfil de ácidos graxos do músculo de alevinos de tilápia alimentados com níveis crescentes de FB1 + FB2, por 28 dias, é mostrado na Tabela 4. Ácidos graxos saturados ($P<0,0001$) e poliinsaturados ($P<0,001$) totais foram maiores em peixes alimentados com FB60 que qualquer outro tratamento. Os ácidos graxos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) obtiveram maiores valores nos tratamentos com fumonisina ($P<0,0001$ e $P<0,01$, respectivamente). Os ácidos graxos monoinsaturados totais não variaram entre os tratamentos dietéticos ($P=0,0874$), mas os menores valores para o ácido oleico (C18:1) foram encontrados nos tratamentos FB40 e FB60 quando comparados aos tratamentos FB20 e controle ($P<0,001$). Especificamente, os valores para ácido araquidônico (C20:4n6) não diferiram ($P=0.0783$), porém para seus precursores, C18:2 e C18:3, o tratamento FB60 apresentou os menores valores ($P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente). EPA e DHA apresentaram maiores valores em peixes alimentados com

fumonisinias quando comparados tratamento controle ($P < 0.0001$). Similarmente, os valores para ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) totais foram maiores nos peixes alimentados com FB40 e FB60 ($P < 0,001$).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (AG) (mg/100g) das dietas experimentais¹.

AG Saturado			AG Monoinsaturados		
C10:0	0,0068	± 0,0046	C14:1	0,0008	± 0,0015
C12:0	0,0692	± 0,2190	C15:1	0,0017	± 0,0026
C13:0	0,0067	± 0,0073	C16:1	0,1928	± 0,2301
C14:0	0,1085	± 0,0059	C17:1	0,0354	± 0,0116
C15:0	0,0307	± 0,0047	C18:1	23,3378	± 1,2475
C16:0	14,2161	± 0,8653	C20:1	0,2126	± 0,1594
C17:0	0,1182	± 0,0633	C22:1	0,2196	± 0,0861
C18:0	2,3013	± 2,0373	C24:1	0,0709	± 0,0286
C20:0	4,5530	± 14,0079			
C21:0	0,4171	± 0,1488			
C22:0	0,3076	± 0,1006			
C24:0	0,0085	± 0,0091			
AG Omega 6			AG Omega 3		
C18:2n6	0,7869	± 0,4823	C18:3n3	5,6317	± 1,6857
C18:3n6	46,6433	± 14,7764	C20:2n3	0,3045	± 0,1172
C20:3n6	0,0315	± 0,0135	C20:3n3	0,1045	± 0,0446
C20:4n6	0,0011	± 0,0027	C20:5n3	0,0291	± 0,0102
C22:2n6	0,0810	± 0,0552	C22:6n3	0,0323	± 0,0150
Total PUFA ²					
	ω6 + ω3	53,6462 ±	14,2101		

¹Valores médios de todos os tratamentos ± desvio padrão em análises de triplicata. ²Ácido Graxo Poliinsaturado. $P=0,0863$

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos (PAG) (mg/100g) do músculo de alevinos de tilápia-do-Nilo, desafiadas com níveis de fumonisina FB1 + FB2.

PAG	Controle			FB20			FB40			FB60		
Saturados												
C10:0 ^γ	0,008	±	0,001	0,008	±	0,001	0,009	±	0,002	0,011	±	0,002
C12:0*	0,03	±	0,006	0,03	±	0,003	0,026	±	0,006	0,02	±	0,003
C13:0 ^γ	0,005	±	0,001	0,004	±	0,001	0,005	±	0,013	0,01	±	0,002
C14:0 ^α	0,82	±	0,009	0,81	±	0,023	0,9	±	0,018	0,87	±	0,052
C15:0 ^γ	0,74	±	0,042	0,25	±	0,005	0,27	±	0,009	0,35	±	0,038
C16:0 ^γ	21,87	±	0,011	22,55	±	0,064	22,52	±	0,029	22,33	±	0,023
C17:0 ^γ	0,47	±	0,035	0,45	±	0,027	0,53	±	0,012	0,63	±	0,046
C18:0 ^α	7,72	±	0,291	8,62	±	0,161	8,35	±	0,511	8,81	±	0,027
C20:0 ^α	0,3	±	0,023	0,26	±	0,009	0,3	±	0,013	0,29	±	0,021
C21:0 ^γ	1,09	±	0,015	1,12	±	0,005	1,17	±	0,029	1,19	±	0,002
C22:0 ^γ	1,58	±	0,024	1,45	±	0,022	1,54	±	0,036	1,66	±	0,018
C24:0 ^γ	0,02	±	0,003	0,02	±	0,005	0,04	±	0,013	0,07	±	0,003
Total ^γ	34,65	±	0,34	35,57	±	0,59	35,66	±	0,81	36,24	±	0,99
Monoinsaturados												
C14:1 ^γ	0,25	±	0,012	0,05	±	0,004	0,05	±	0,003	0,07	±	0,005
C15:1 ^γ	0,06	±	0,006	0,06	±	0,007	0,08	±	0,008	0,09	±	0,008
C16:1 ^γ	2,03	±	0,066	2,08	±	0,004	2,06	±	0,031	1,92	±	0,028
C17:1 ^γ	0,79	±	0,136	0,89	±	0,009	1,32	±	0,043	1,22	±	0,104
C18:1 ^β	24,48	±	0,127	23,21	±	0,187	22,2	±	0,137	22,04	±	0,195
C20:1 ^β	1,23	±	0,043	1,28	±	0,045	1,24	±	0,047	1,16	±	0,078
C22:1 ^γ	1,6	±	0,024	1,56	±	0,024	1,65	±	0,031	1,7	±	0,031
C24:1 ^γ	0,11	±	0,003	0,11	±	0,003	0,11	±	0,004	0,13	±	0,004
Total*	30,55	±	0,628	29,24	±	0,674	29,01	±	0,732	28,33	±	0,737
ω6 PAG												
C18:2n6 ^γ	0,8	±	0,109	0,77	±	0,071	0,65	±	0,035	0,61	±	0,039
C18:3n6 ^α	21,93	±	0,238	20,69	±	0,139	20,95	±	0,142	20,64	±	0,049
C20:3n6 ^α	0,21	±	0,011	0,21	±	0,007	0,2	±	0,005	0,2	±	0,008
C20:4n6*	7,33	±	0,411	7,63	±	0,325	7,89	±	0,387	7,96	±	0,359
C22:2n6 ^α	0,1	±	0,008	0,09	±	0,004	0,1	±	0,015	0,09	±	0,004
ω3 PAG												
C18:3n3*	1,58	±	0,06	1,64	±	0,047	1,62	±	0,048	1,59	±	0,086
C20:2n3 ^β	0,09	±	0,007	0,11	±	0,009	0,1	±	0,009	0,1	±	0,024

C20:3n3*	0,06	±	0,004	0,05	±	0,004	0,06	±	0,002	0,07	±	0,005
C20:5n3 ^γ	0,56	±	0,005	0,58	±	0,006	0,65	±	0,005	0,73	±	0,003
C22:6n3 ^γ	2,14	±	0,112	3,42	±	0,085	3,41	±	0,072	3,44	±	0,038
Total PUFA ¹ §	34,8	±	0,007	35,19	±	0,008	35,33	±	0,003	35,43	±	0,005

Valores representam média ± desvio padrão em análises de triplicatas; *não significativo; ^aP<0,01; ^βP<0,001; ^γP<0,0001, ¹Poliinsaturados.

4. Discussão

4.1. Desempenho e composição química

No presente estudo, os diferentes níveis de fumonisina na dieta reduziram o ganho em peso diário comparado ao tratamento controle. Este resultado era esperado, pois FB reduz a expressão de IGF e IGH, hormônios responsáveis pelo crescimento (Claudino-Silva, 2018b).

Níveis de IGF-1, GH e seu receptores são associados as taxas de crescimento corporal (Duncan et al., 2015; Cooper-Prado et al., 2018). Maiores níveis destes hormônios são associados à síntese proteica e deposição de lipídeos na forma de triacilglicerol, enquanto níveis reduzidos se relacionam ao catabolismo destas macromoléculas. Neste estudo, o teor de proteína e de lipídeos nos animais que receberam dietas com FB foram inferiores ao controle. Consequentemente, os valores de resíduo mineral fixo aumentaram, haja visto que a menor deposição tecidual em proteína e gordura afetam o balanço entre tecido muscular e estrutura óssea.

4.2. Ácidos graxos saturados

O aumento da exigência dos consumidores pela qualidade dos produtos alimentares conduz ao desenvolvimento de melhorias na rastreabilidade, principalmente com relação a qualidade e composição dos alimentos fornecidos aos animais. (Garcia et al., 2018; Smulders

et al., 2019). A alteração no perfil de ácidos graxos por meio da alimentação é interessante sob o ponto de vista de diminuir os riscos de doenças coronárias em humanos, visto que os ácidos de cadeia média (láurico, mirístico e palmítico) são hipercolesterolêmicos (Palomer et al., 2018). Apesar de conhecidamente maléficos, em peixes, estes ácidos graxos podem trazer benefícios, pois podem ser alongados e dessaturados transformando-os em ácidos graxos poliinsaturados (Ioan-Facsinay e Kloppenburg, 2018; Kris-Etherton et al., 2018).

O processo de síntese de ácidos graxos em células animais começa com a formação do intermediário malonil-CoA de três carbonos pela ação da enzima acetil-CoA-carboxilase. A molécula de malonil é alongada pela enzima ácido graxo sintase por meio da acilação (introdução de um grupo acila em um composto orgânico) até a formação do ácido palmítico, um ácido graxo de dezesseis carbonos que é então alongado para formar ácidos graxos de cadeia longa, ou liberado da enzima (Nelson e Cox, 2014).

Sabe-se que as fumonisinas alteram o equilíbrio das bases esfingoides (esfinganina e esfingosina) pela inibição competitiva da enzima ceramida sintase (Wang et al., 1991). O acúmulo de esfinganina pode promover mudanças nas concentrações do ácido palmítico, seu precursor natural, pois este é precursor estrutural da molécula de esfinganina (Fig. 3). No presente estudo, os valores para ácido palmítico (C16:0) foram maiores em peixes alimentados com fumonisina comparado ao controle. O excesso de ácido palmítico é conhecido por ser inibidor natural do complexo de ácido graxo sintase e aumenta os níveis de ceramida no organismo (Palomer et al., 2018). Gelderblom et al., 1996 avaliaram o efeito de dois níveis de fumonisina (150 e 50 μ M) na capacidade de incorporação de ácido palmítico em hepatócitos de rato, e provaram que as fumonisinas inibem a incorporação deste ácido. Esses mesmos autores sugerem que esse é o provável mecanismo de ação pelo qual as fumonisinas afetam o perfil dos ácidos graxos.

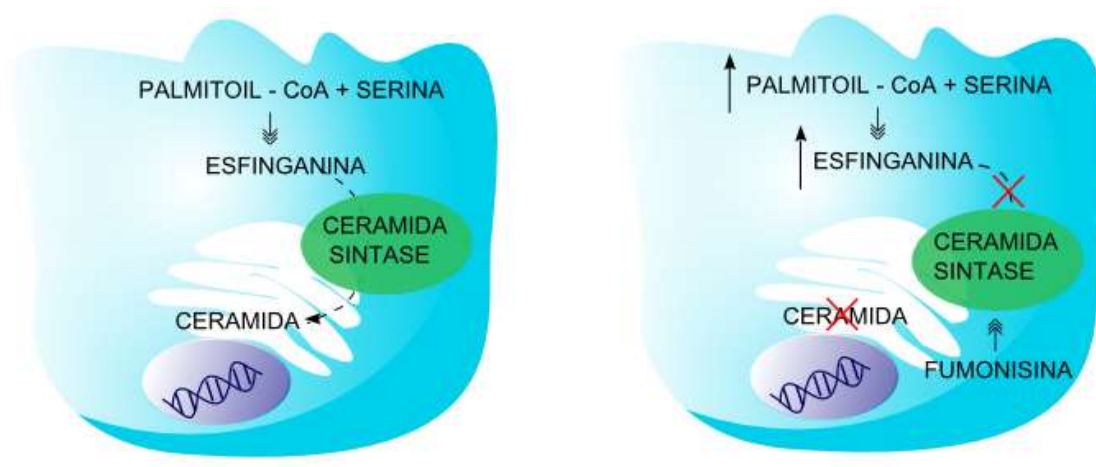


Fig 3. Influência da fumonisina (FB) na síntese de ceramida e no acúmulo de palmitoil-CoA. A FB age na célula competindo pelo sítio de ligação inibindo a ação da esfingosina e esfinganina, precursores de ceramida, e consequentemente, modificando a biossíntese de ácidos graxos.

Para os tratamentos com fumonisina neste trabalho, evidenciamos que a quantidade de lipídeos no músculo dos animais reduziu, porém o valor global de ácidos graxos saturados aumentou, com destaque para o ácido palmítico e o ácido esteárico (C18:0). Estes ácidos graxos são responsáveis pela resistência à insulina, além de prejudicar a captação de glicose pelo fígado. Ainda, dietas com altos níveis de ácido esteárico reduzem o gasto energético e consequentemente aumenta a adiposidade (Van den Berg et al., 2010). Portanto, a composição de ácidos graxos na dieta é mais importante para verificação de parâmetros metabólicos do que a quantidade global de ácidos graxos na dieta.

Embora o ácido esteárico seja convertido em ácido oleico por desidrogenação (Bonamone et al., 1988), alguns pesquisadores apontam para a possível relação entre C18:0 e efeitos trombogênicos, pois os AGS são transportados por proteínas plasmáticas instáveis, como a albumina, o que aumenta o risco de permanecer livre na corrente sanguínea (Hoak, 1994). A redução dos ácidos graxos monoinsaturados, observada neste trabalho, sugere que

a fumonisina é capaz de impedir a biossíntese destes ácidos, o que pode ser explicado pelo acúmulo de palmitoil-CoA na célula e possível alteração na peroxidação lipídica, principalmente para C16:0 e C18:0.

4.3 Ácidos graxos monoinsaturados (MUFA)

Os níveis séricos de ácidos graxos monoinsaturados estão diretamente relacionados com as concentrações e o tamanho das partículas de lipoproteínas, e consequentemente, com seu metabolismo em nível celular. Nesta classe de ácidos graxos, o ácido oleico (C18:1) é o representante mais expressivo, responsável por alterar a composição e catabolismo de lipoproteínas além induzir apoptose em células tumorais (Carrillo et al., 2012). Em nosso estudo, os valores para C18:1 foram menores nos tratamentos FB40 e FB60, comparados aos tratamentos FB20 e controle. Estes valores baixos podem ter levado a redução da proteção cardiovascular nos peixes, além de efeitos diretos na colesterolemia e possível aumento nas plaquetas, o que reduz o tempo de coagulação e aumenta o estado pró-trombótico, característico de doenças vasculares (Carluccio et al., 2007). Ainda, os valores globais de ácidos graxos monoinsaturados foram menores nos tratamentos com fumonisina comparados ao controle. Por estarem diretamente correlacionados com a concentração de insulina no plasma pela ação da esteroil-CoA-desaturase-1, os ácidos graxos monoinsaturados representam importante regulador das concentrações de triacilgliceróis (Bouwens et al., 2010).

4.4 Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)

O alongamento dos ácidos graxos araquidônico (20:4n6) e eicosapentaenoico (20:5n3, EPA) geralmente ocorre às mesmas taxas no fígado (Garcia et al., 1990), e isso

acontece quando um aceptor específico, *1-acil-2-sn-glicero-3-fosfolina*, é utilizado (Lands, 1992). Assim, a acilação de ácidos específicos de 22 carbonos em lipídios membranares não é apenas dependente de especificidades para o processo anabólico, mas também necessários para a retroconversão em ácidos graxos de 20 carbonos.

Apesar do organismo alongar ácidos graxos ao adicionar duas unidades de carbono, ele não é capaz de introduzir duplas ligações na porção final (após o carbono 9) destes ácidos (Koolman e Roehm, 2005). O 20:4n6 pode ser suplementado pela dieta, ou então ser substituído pelos seus precursores, ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) (Champe et al., 2008). Em nosso estudo, os valores destes precursores nos animais consumindo a dieta com fumonisina foram menores comparados ao grupo controle. Não houve diferença estatística para os valores do 20:4n6, isto sugere que o organismo do animal manteve a retroconversão deste ácido aos níveis necessários para o metabolismo regular, por meio da redução na quantidade de ácidos graxos com 22 carbonos nos peixes alimentados com FB.

Em nosso estudo, os valores de EPA foram maiores para as dietas com fumonisinas quando comparadas com os tratamentos controle, com efeito de regressão quadrática ($R^2=0,99$). É possível que estes resultados sejam decorrentes de maior retroconversão para o EPA do que para o 20:4n6 nos tratamentos com fumonisina. Apesar da resposta distinta, estes dois ácidos graxos são sinergicamente importantes, pois o EPA possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias utilizadas no combate aos radicais livres, e o 20:4n6 é utilizado para sintetizar eicosanoides, responsáveis pela regulação do processo inflamatório, processo imune e atuam como mensageiros do sistema nervoso central (Wei e Gronert, 2018). A desregulação de eicosanoides pode afetar o sistema cardiovascular, a pressão

arterial, a artrite e quantidade de triglicerídeos no organismo (Debeuf et al., 2018; Suárez et al., 2018).

Frequentemente o ácido graxo docosahexaenoico (22:6n3, DHA) é considerado o produto do metabolismo do linoleato (Qiu, 2003; Chen et al., 2018). No entanto, o DHA favorece a fluidez celular e possui efeitos benéficos quanto a saúde cerebral, pulmonar, ocular e cardiovascular, encefalopatias, além de controlar a pressão arterial e proteger o endotélio e regular o processo inflamatório (Lauritzen et al., 2016; Mayurasakorn et al., 2016; Yin et al., 2018). Do mesmo modo, o EPA possui ação anti-inflamatória, pois auxilia nas reações enzimáticas responsáveis pela produção de prostaglandinas E3. Em nosso estudo, os valores para DHA e EPA foram maiores nos tratamentos com fumonisina comparados com o grupo controle. Gelderblom et al. (2002) observaram níveis maiores de DHA e EPA na porção de fosfatidilcolina de hepatócitos de ratos alimentados com 10mg FB / kg de ração, corroborando os resultados observados neste estudo. Isto evidencia que as células dos animais foram danificadas pela ação da fumonisina, e foi necessário a maior síntese destes ácidos como mecanismo alternativo para recuperar o organismo do dano. Este é o primeiro estudo envolvendo a ação de fumonisina sobre o perfil de ácidos graxos em tilápias, entretanto, ainda existem questões a serem elucidadas sobre os mecanismos relativos à biossíntese lipídica e balanço final entre ácidos graxos de tilápias.

5. Conclusão

A fumonisina piora o desempenho em alevinos de tilápias-do-Nilo e modifica o perfil de ácidos graxos, pois eleva a quantidade de ácidos graxos saturados e poliinsaturados, e reduz o nível de ácidos graxos monoinsaturados.

Referências

- AOAC, 2012. Official Methods of Analysis of AOAC International (19 ed.): AOAC International.
- Barbosa, T.S., Pereyra, C.M., Soleiro, C.A., Dias, E.O., Oliveira, A.A., Keller, K.M., Silva, P.P.O., Cavaglieri, L.R., Rosa, C.A.R., 2013. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Int. Aquat. Res.* 5, 3. <https://link.springer.com/article/10.1186/2008-6970-5-3>
- Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917. <https://doi.org/10.1139/y59-099>
- Bonamone, A., Grundy, S.M., 1988. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New Engl. J. Med.* 318, 1244±1248. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805123181905>
- Bouwens M, Grootte Bromhaar M, Jansen J, Müller M, Afman LA., 2010. Postprandial dietary lipid-specific effects on human peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 208-217. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.28586>
- Bretas, A. A., 2018. Inclusión of mycotoxin adsorbents for piglets. *Ces. Med. Vet. Zootec.* 13, 80-95. <http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.13.1.6>
- Carlson, D.B.; Williams, D.E.; Spitsbergen, J.M.; Ross, P.F.; Bacon, C.W.; Meredith, F.I., Riley, R.T., 2001. Fumonisin B1 Promotes Aflatoxin B1 and N-Methyl-N9-nitronitrosoguanidine Initiated Liver Tumors in Rainbow Trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 29–36. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9129>
- Carluccio, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., Caterina, R., 2007. Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1225-1234. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600305>

Carrillo, C., Alonso-Torre, S.R., 2012. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. *Nutr. Hosp.* 27, 1860-1865. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6010>

Chen, C., Guan, W., Xie, Q., Chen, G., He, X., Zhang, H., ... & Pan, Q. (2018). n-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Bioconverting LNA to DHA is relatively efficient and the LC-PUFA biosynthetic pathway is substrate limited in juvenile fish. *Aquaculture*, 495, 513-522. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.023>

Chuturgoon, A., Phulukdaree, A., Moodley, D., 2014. Fumonisin B1 induces global DNA hypomethylation in HepG2 cells—An alternative mechanism of action. *Toxicology*, 315, 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.11.004>

Claudino-Silva, S.C., Lala, B., Mora, N.H., Schamber, C.R., Nascimento, C.S., Pereira, V.V., Gasparino, E., 2018a. Fumonisin B1+ B2 changes the expression of genes in apoptosis balance in Nile tilapia fingerlings. *Aquaculture* 488, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.020>.

Claudino-Silva, S.C., Lala, B., Mora, N.H.A.P., Schamber, C.R., Nascimento, C.S., Pereira, V.V., Gasparino, E., 2018b. Challenge with fumonisins B1 and B2 changes IGF-1 and GHR mRNA expression in liver of Nile tilapia fingerlings. *World Mycotoxin J.* 11 (2), 237-245. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2208>.

Claudino-Silva, S.C., Lala, B., Carniato, C., Schamberd, C. R., Nascimento, C. S., Braccini, G. L., Porto, C., Roldi, G., Tanamati, F., Gasparino, E., 2019. Fumonisin affects performance and modulates the gene expression of IGF-1 and GHR in Nile tilapia fingerlings and juveniles. *Aquaculture*. 507, 233-237. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.027>

Cooper-Prado, M. J., Rubio, I., Long, N. M., Davis, M. P., Spicer, L. J., Wettemann, R. P., 2018. Case Study: Effects of body weight gain and bovine somatotropin treatment of postpartum beef cows on concentrations of IGF-1, insulin, and glucose in blood plasma;

luteal activity; and calf growth. *The Professional Animal Scientist*, 34, 513-521.
<https://doi.org/10.15232/pas.2018-01746>

Debeuf, N., Lambrecht, B. N., 2018. Eicosanoid control over antigen presenting cells in asthma. *Frontiers in immunology*, 9. <https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02006>

Domijan, A.M., Abramov, A.Y., 2011. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis—implication to mechanism of cell toxicity. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(6), 897-904.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.03.003>

Duncan, C. A., Jetzt, A. E., Cohick, W. S., John-Alder, H. B., 2015. Nutritional modulation of IGF-1 in relation to growth and body condition in *Sceloporus lizards*. *General and comparative endocrinology*, 216, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.009>

Garcia, M.C., Sprecher, H., Rosenthal, M.D., 1990. Chain elongation of polyunsaturated fatty acids by vascular endothelial cells: studies with arachidonate analogues. *Lipids*, 25(4), 211-215. <https://doi.org/10.1007/BF02535749>

Garcia, S.F.A., Carvalho, D.T.D., Miranda, C.D.S., Bosco, B.R.M., 2018. Quais os Sinais de Carne Macia e Saborosa? Análise dos Atributos da Carne Bovina que, no Momento da Compra, Melhor Sinalizam os Benefícios mais Desejados pelo Consumidor. *Rev. Bras. Market.* 17, 487-501. DOI: 10.5585/remark.v17i4.3758

Gelderblom, W.C.A., Smuts, C.M., Abel, S., Snyman, S.D., Cawood, M.E., Van der Westhuizen, L., Swanevelder, S., 1996. Effect of fumonisin B1 on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 34, 361-369. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(96\)00107-X](https://doi.org/10.1016/0278-6915(96)00107-X)

Gelderblom, W.C.A., Smuts, C.M., Abel, S., Snyman, S.D., Van der Westhuizen, L., Huber, W.W., Swanevelder, S., 1997. Effect of fumonisin B1 on the levels and fatty acid

composition of selected lipids in rat liver in vivo. Food Chem. Toxicol. 35, 647-656.
[https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00036-7)

Gelderblom, W.C.A., Moritz, W., Swanevelder, S., Smuts, C.M., Abel, S., 2002. Lipids and $\Delta 6$ -desaturase activity alterations in rat liver microsomal membranes induced by fumonisin B1. Lipids, 37(9), 869-877. Último acesso: 25/04/2019.
<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1007/s11745-002-0973-4>

Gontijo A.M.M.C., Barreto R.E., Speit G., Reyes V.A.V., Volpato G.L., Salvadori D.M.F., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. Mutat. Res. 534, 165–172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0)

Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., Cole, J.R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2, 217-221.
<https://doi.org/10.1177/104063879000200312>

Hartman, L., Lago, R. C., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Pract. 22, 475-476.

Hoak, J.C., 1994. Stearic acid, clotting, and thrombosis. Am. J. Clin. Nutr. 60, 1050S-1053S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/60.6.1050S>

Ioan-Facsinay, A., Kloppenburg, M., 2018. Bioactive lipids in osteoarthritis: risk or benefit?. Curr. Opin. Rheumatol., 30(1), 108-113.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000463>

Kellerman, T.S., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C., Cawood, M., Coetzer, J.A., 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. Onderstepoort J. Vet. Res. 57, 269-275. <http://hdl.handle.net/2263/41861>

Kovačić, S.; Pepeljnjak, S.; Petrincec, Z.; Klarić, M.S., 2009. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio* L.). Arh. Hig. Rada Toksikol. 60, 419-426. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1974>

Kris-Etherton, P. M., Petersen, K., Van Horn, L., 2018. Convincing evidence supports reducing saturated fat to decrease cardiovascular disease risk. BMJ Nutr. Prev. Healt., 2018, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjnp-2018-000009>

Lands, W.E., 1992. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. FASEB J. 6, 2530-2536. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.8.1592205>

Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L., Ciappolino, V., Agostoni, C., 2016. DHA effects in brain development and function. Nutrients, 8(1), 6. <https://doi.org/10.3390/nu8010006>

Lumlerdacha, S., Lovell, R.T., Shelbyb, R.A., Lenz, S.D., Kemppainen, B.W., 1995. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. Aquaculture 130, 201-218, 1995. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00219-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00219-E)

Mayurasakorn, K., Niatetskaya, Z. V., Sosunov, S. A., Williams, J. J., Zirpoli, H., Vlasakov, I., Deckelbaum, R.J., Ten, V. S., 2016. DHA but not EPA emulsions preserve neurological and mitochondrial function after brain hypoxia-ischemia in neonatal mice. PLoS One, 11(8), e0160870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160870>

Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. Principípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 1328 p.

Palomer, X., Pizarro-Delgado, J., Barroso, E., & Vázquez-Carrera, M., 2018. Palmitic and oleic acid: the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. Trends in Endocrinology & Metabolism, 29(3), 178-190. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>

Qiu, X., 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 68(2), 181-186. [https://doi.org/10.1016/S0952-3278\(02\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0952-3278(02)00268-5)

Smulders, F.J., Rietjens, I.M., Rose, M.D., 2019. Chemical hazards in foods of animal origin and the associated risks for public health: elementary considerations. In *Chemical hazards in foods of animal origin*. Wageningen Academic Publishers. pp 99-117. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3>

Suárez, H., Francisco, A., Beirão, L., Block, J., Saccol, A., Pardo-Carrasco, S., 2018. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. *Boletim do Instituto de Pesca*, 28(1), 101-110. Último acesso: 25/04/2019. https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/Suarez_mahecha

Tuan N.A., Manning, B.B., Lovell, R.T., Rottinghaus, G.E., 2003. Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different concentrations of moniliformin or fumonisin B1. *Aquaculture*, 217, 515-528. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00268-5)

Van den Berg, S.A., Guigas, B., Bijland, S., Ouwens, M., Voshol, P.J., Frants, R.R., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Van Dijk, K.W., 2010. High levels of dietary stearate promote adiposity and deteriorate hepatic insulin sensitivity. *Nutr. Metab.* 7:24, 2010. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-24>

Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., Merrill, A.H., 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.*, 266(22), 14486-14490. <http://www.jbc.org/content/266/22/14486.full.pdf>

Wei, J., Gronert, K., 2018. Eicosanoid and Specialized Proresolving Mediator Regulation of Lymphoid Cells. *Trends Bioch. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.007>

Yin, Y., Li, E., Sun, G., Yan, H. Q., Foley, L. M., Andrzejczuk, L. A., Attarwala, I.Y, Hitchens, T.K., Kiselyov, K., Dixon, C.E., Sun, D., 2018. Effects of DHA on hippocampal autophagy and lysosome function after traumatic brain injury. *Mol. Neurbiol.* 55(3), 2454-2470. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0504-8>

Zinedine, A., El Akhdari, S., 2019. Food Safety and Climate Change: Case of Mycotoxins. In: *Handbook of Research on Global Environmental Changes and Human Health*. IGI Global. p. 74-97.

III – FUMONISINA ALTERA O EQUILÍBRIO REDOX EM JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO (*Aquaculture Journal*)

Resumo

Fumonisinás são metabólitos secundários de fungos do gênero *Fusarium*, e sua ingestão está associada a doenças hepáticas em diferentes animais. Neste estudo, a hipótese de que fumonisinás alteram a expressão de genes relacionado ao equilíbrio redox em alevinos de tilápia-do-Nilo foi testada. Foram utilizados 180 animais distribuídos em quatro tratamentos, controle (sem adição de FB), 20 (FB20), 40 (FB40) e 60 (FB60) mg / kg de FB), para avaliar a expressão de mRNA de glutathione peroxidase (GPX) e proteína do choque térmico (HSP70) no fígado. Houve efeito de período ($P=0,0067$) e tratamento ($P<0,0001$) para GPX, reduzidos aos 14 dias e aumentado aos 28 dias de exposição, mostrando ser tempo-dose-dependente. De igual modo, houve efeito de período ($P<0,0001$) e tratamento ($P<0,0001$), bem como sua interação para a expressão gênica de HSP70, porém, com aumento aos 14 dias e redução aos 30 dias, mostrando-se inversamente proporcional à GPX. O desafio com FB em alevinos de tilápia-do-Nilo modula a expressão dos genes envolvidos no equilíbrio redox GPX e HSP70, sendo inicialmente aumentada a expressão de HSP70 com retroalimentação negativa para GPX, e esta por sua vez promove resposta de retroalimentação negativa para HSP70 em maior tempo de desafio.

Palavras-chave: estresse oxidativo, *Fusarium sp.*, micotoxina, *Oreochromis niloticus*

Abstract

Fumonisin are secondary metabolites of *Fusarium* fungi, and their ingestion is associated with liver disease in different animals. In this study, the hypothesis that fumonisins alter redox balance-related gene expression in Nile tilapia fingerlings was tested. We used 180 animals distributed in four treatments, control (without addition of FB), 20 (FB20), 40 (FB40) and 60 (FB60) mg / kg of FB) to evaluate Glutathione peroxidase (GPX) mRNA expression. and heat shock protein (HSP70) in the liver. There was a period effect ($P = 0.0067$) and treatment ($P < 0.0001$) for GPX, reduced at 14 days and increased at 30 days of exposure, showing to be time-dose dependent. Similarly, there was period ($P < 0.0001$) and treatment ($P < 0.0001$) effects, as well as their interaction for HSP70 gene expression, however, with increase at 14 days and reduction at 30 days, showing inversely proportional to GPX. The challenge with FB in Nile tilapia fingerlings modulates the expression of the genes involved in GPX and HSP70 redox equilibrium, and the expression of HSP70 with GPX positive feedback is initially increased, and this in turn promotes negative feedback response to HSP70 in a longer time of challenge.

Keywords: *Fusarium* sp., micotoxin, *Oreochromis niloticus*, oxidative stress

1. Introdução

Fumonisin (FB) são micotoxinas produzidas por fungos das espécies *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* durante seu metabolismo secundário (Turner et al., 1999) e comumente encontradas no milho, ingrediente utilizado em grande parte das dietas animais. A estrutura química destas micotoxinas foi demonstrada pela primeira vez por Bezuidenhout et al. (1988). Atualmente, 28 formas análogas de FB são conhecidas e agrupadas em quatro grupos, denominados séries A, B, C e P (Rheeder et al., 2002). As

toxinas da série B são as variantes mais comumente encontradas, e são subdivididas em fumonisinas B1, B2 e B3 (Visconti et al., 1995); a B1 é geralmente encontrada numa proporção de 70% do total de fumonisinas detectadas, seguidas pelas formas B2 e B3 (Rheeder et al., 2002).

Uma das teorias mais bem aceitas sobre a toxicidade das FB está diretamente relacionada ao metabolismo dos esfingolípídios (Dellafiora et al., 2018; Szabó et al., 2019). Devido a semelhança estrutural com precursores de ceramidas, FB desempenham inibição competitiva pelo sítio ativo da enzima ceramida sintase, comprometendo a produção de ceramida intracelular (Wang et al., 1991). Outra teoria sobre a citotoxicidade das FB relaciona-se a indução de estresse oxidativo (Towner et al., 2003), que é classicamente definido como o desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e anti-oxidantes, resultando no aumento geral dos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Valko et al., 2007). Um indicativo de que esta micotoxinas pode causar estresse oxidativo é a avaliação da modulação direta dos mecanismos de defesas antioxidantes (Leal et al., 1999), como glutathionas e proteínas da família HSP (heat shock protein).

A glutathiona peroxidase (GPX), por exemplo, atua oxidando a glutathiona reduzida (GSH) ou ainda na redução de hidroperóxidos de ácidos graxos. Já as HSPs, um grupo de proteínas funcionalmente relacionadas ao dobramento e desdobramento de outras proteínas, têm sua expressão aumentada quando as células são expostas a temperaturas elevadas ou a outras formas de estresse (De Maio, 1999). Até o momento pouco se sabe sobre a toxicidade de fumonisinas sobre o estresse oxidativo em tilápias-do-Nilo. Deste modo, objetivamos com esta pesquisa avaliar o efeito de diferentes níveis de fumonisina sobre a expressão gênica de HSP70 e GPX em alevinos de tilápia-do-Nilo. Para isso, um ensaio considerando os efeitos dos níveis (20; 40 e 60mg/kg de ração) e tempo de consumo (14 e 28 dias) foi realizado.

2. Material e Métodos

Delineamento Experimental

O manejo e os procedimentos com os animais foram aprovados e conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal determinados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (CEUA – FMVZ – UNESP, protocolo 0016/2017).

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM – PR), onde 180 peixes revertidos sexualmente da linhagem Tailandesa, como peso inicial de aproximadamente 2,5g, foram utilizados. Os peixes foram distribuídos em três caixas de fibrocimento com volume de 900L cada, com sistema individual de renovação da água (25% ao dia) e aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador central. Cada tanque foi dividido em quatro hapas, totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos e três repetições. Cada hapa teve volume individual de 250L onde foram alojados 15 peixes. Os peixes passaram por período de adaptação de 15 dias antes do início do experimento.

Controle Ambiental

Duas vezes ao dia, a temperatura foi aferida em cada tanque às 09h00 e às 17h00. As variáveis oxigênio dissolvido e pH foram controladas pela manhã durante todo o experimento por meio de kit colorimétrico. A renovação da água foi realizada em cada tanque individualmente à taxa de 5% por dia com aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a ventilador central.

A temperatura foi medida duas vezes ao dia em cada tanque, às 09h00 e às 17h00. A renovação da água foi realizada individualmente em cada tanque a uma taxa de 5% por dia com aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a ventilador central. As variáveis oxigênio dissolvido e pH foram medidas pela manhã durante todo o período experimental com kit individual.

Dietas Experimentais e Manejo dos Animais

As amostras de fumonisinas B1 + B2 foram adquiridas do Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria. O meio de crescimento foi obtido e avaliado no LAMIC com base no fungo *Fusarium verticillioides*, cepa MRC 826. As dietas foram elaboradas considerando a concentração de FB1 + FB2 indicadas em laudo fornecido pelo LAMIC, totalizando a concentração de 7,41mg de fumonisina/g de meio de cultura (6,06mg de FB1 + 1,35mg FB2/g de meio).

Foram elaboradas três dietas isocalóricas (aproximadamente 3000 kcal de energia digestível por kg de dieta) e isoprotéicas (aproximadamente 33% de proteína bruta), variando apenas quanto à inclusão de diferentes níveis de fumonisina, divididos nos seguintes grupos: Grupo 1 – FB0, grupo controle da dieta, com inclusão de 0,0 mg de fumonisina/kg de ração na dieta; Grupo 2 – FB20, 20 mg de fumonisina/kg (16,36 mg de FB1 + 3,64 mg de FB2); Grupo 3 – FB40, 40 mg de fumonisina/kg (32,71 mg de FB1 + 7,29 mg de FB2); e Grupo 4 – FB60, inclusão de 60 mg de fumonisina/kg de ração na dieta (49,07 mg FB1 + 10,93 mg FB2).

Tabela 1- Composição percentual e química das dietas experimentais

<i>Ingrediente (%)</i>	<i>Dieta experimental</i>			
	Controle	20 mg FB/kg	40 mg FB/kg	60 mg FB/kg
Soja	53,7	53,7	53,7	53,7
Milho	31,0	31,0	31,0	31,0
Gluten de milho 60	8,2	8,2	8,2	8,2
Óleo de soja	2,0	2,0	2,0	2,0
Amido de milho	1,0	1,0	1,0	1,0
DL-methionina	0,01	0,01	0,01	0,01
Calcário calcítico	0,1	0,1	0,1	0,1
Fosfato Bicálcico	2,9	2,9	2,9	2,9
Vitamina C ¹	0,06	0,06	0,06	0,06
Suplemento vitamínico e mineral ²	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal comum	0,5	0,5	0,5	0,5
BHT (antioxidante) ³	0,03	0,03	0,03	0,03
Fumonisina B1+B2	-	0,002	0,004	0,006
TOTAL	100	100	100	100
<i>Composição química da dieta (%)⁴</i>				
Proteína	33,62	33,60	33,61	33,61
Matéria seca	89,52	89,51	89,50	89,52
Gordura	4,33	4,33	4,30	4,29
Resíduo mineral	5,79	5,75	5,76	5,78

¹ Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo; ² Suplemento mineral e vitamínico: Composição/kg de produto: Vit. A=1.200.000 UI; vit. D3=200.000 UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ácido fólico=1.200 mg; pantotenato de cálcio=12.000 mg; vit. C=48.000 mg; biotina=48 mg; colina=65.000 mg; ácido nicotínico=24.000 mg; Fe=10.000 mg; Cu=600 mg; Mn=4.000 mg; Zn=6.000 mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg; ³ Butil-Hidroxi-tolueno (Antioxidante); ⁴Composição com base na matéria natural.

As dietas foram peletizadas, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48 horas, desintegradas em moedor manual e as partículas classificadas de acordo com a granulometria

(1 a 2mm). Após prontas, as dietas foram novamente avaliadas para a confirmação dos níveis de fumonisinas adicionados. O teor de fumonisina real da dieta foi avaliado antes do fornecimento aos animais por meio de análise micotoxicológica fornecida pelo LAMIC. As dietas foram fornecidas manualmente aos peixes, três vezes/dia, até saciedade aparente dos peixes.

Expressão Gênica

Para análise de expressão gênica, amostras de fígado de seis animais de cada tratamento, previamente anestesiados (Gontijo et al., 2003), foram coletadas aos 14 e 28 dias de experimento, e armazenados em RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brasil) a -80°C até a extração de RNA total.

O RNA total foi extraído de amostras de fígado (35mg) usando Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os materiais utilizados para extração foram previamente tratados com RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), um inibidor de RNase. A concentração do RNA total foi medida em aparelho espectrofotômetro a um comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio (10%) e visualizado sob luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para remover possível contaminação com DNA genômico.

Para a síntese de cDNA foi utilizado kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Em tubo estéril e RNA free foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) 50µM oligo (dT) 20 e 1µL de tampão de anelamento (annealing buffer). A reação foi incubada por

5 minutos a 65°C e então colocadas sobre o gelo por 1 minuto. Foi adicionado em seguida 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III e inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C para que ocorra a síntese do DNA complementar. A reação foi incubada por 5 minutos a 85°C e imediatamente colocada sob o gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o corante fluorescente SYBR Green (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA).

Os *primers* utilizados para avaliação dos genes glutathione peroxidase – GSHpx e HSP70 foram desenhados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov utilizando o site www.idtdna.com (Tabela 2). Três controles endógenos obtidos de Yang et al. (2013) foram testados: UBCE (enzima conjugadora de ubiquitina - XM_003460024), EF1A (fator de elongação 1α - AB075952) e B-ACT (β actina - XM_003455949). Destes controles, B-ACT foi selecionado, pois apresentou melhor eficiência (entre 90 e 110%) e não variou estatisticamente entre os tratamentos.

Tabela 2 – Sequência de *primers* utilizados para reações de PCR em tempo real

Primer	Sequência	Amplicon (bp)
GSHpx Tilapia – F	5' CAACCAGGGACTACTCAAG 3'	75
GSHpx Tilapia – R	5' GCACACCCAAAATAACGAGAC 3'	
HSP70 Tilapia – F	5' AGGACATCAGCCAGAACAAG 3'	145
HSP70 Tilapia– R	5' CTGGTGATGGAGGTGTAGAAG 3'	
B-ACT – F	5'TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG3'	217
B-ACT – R	5'TGTTGGCTTTGGGGTTCA3'	

Todas as reações foram realizadas para o volume final de 12,5 µL e em duplicatas. As curvas de dissociação foram analisadas para a verificação de qualquer presença de dímeros de *primers* ou produtos não específicos.

Análise estatística

Para avaliar a expressão relativa, os dados provenientes da análise de PCR em tempo real foram transformados utilizando-se $2^{-\Delta CT}$, como demonstrado por Livak & Schmittgen, (2001). Os dados de expressão gênica foram avaliados usando o procedimento REG (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA).

3. Resultados

Controle Ambiental

A temperatura média em tanques durante o período experimental foi de $24,5 \pm 3,8^{\circ}\text{C}$, sem diferenças estatísticas entre tanques e tratamentos. Os valores médios para pH e oxigênio dissolvido foram $7,0 \pm 0,3$ e $7,5 \pm 0,2 \text{ mg / L}$, respectivamente. Nos primeiros 14 dias de experimento, foram observadas mortalidades, variando de 24,88% para a dieta com 60 mg/Kg, 31,08% para 40 mg/Kg e 6,25% para 20 mg/Kg e tratamento controle. Após esse período, não houve mortalidade.

Expressão gênica

Para GPX, foi observado efeito de período ($P=0,0067$) e tratamento ($P<0,0001$), bem como sua interação (Fig. 1). Aos 14 dias de tratamento com fumonisina os níveis de GPX foram significativamente reduzidos comparados ao controle, enquanto aos 28 dias a

expressão do gene foi aumentada. A interação entre período e tratamento evidenciou que a expressão de GPX em tilápias desafiadas com FB é tempo-dose dependente.

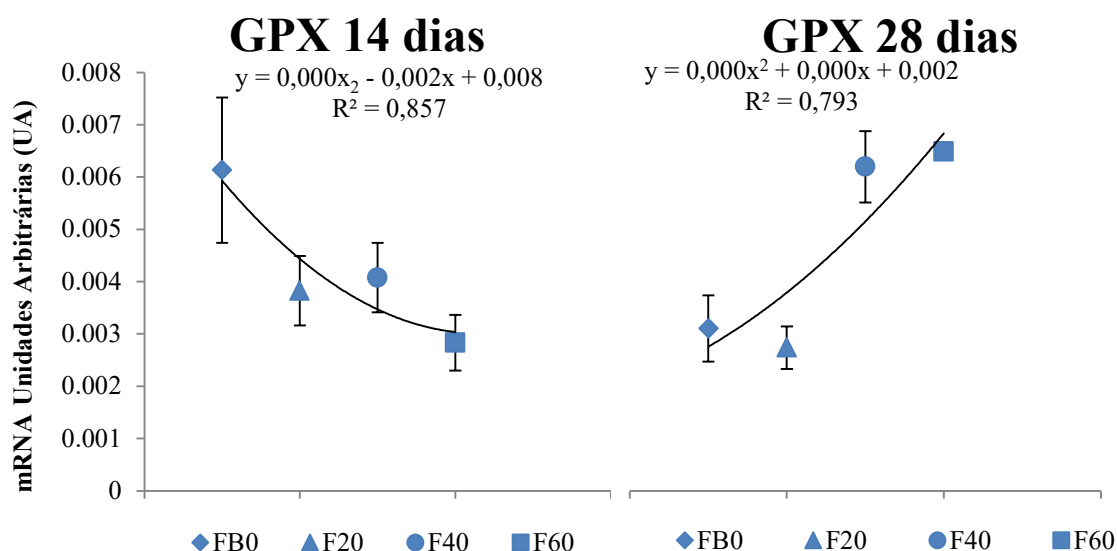


Fig 1. Expressão do gene GPX aos 14 e 28 dias para os tratamentos com inclusão de fumonisina, 0 (FB0), 20 (FB20), 40 (FB40) e 60 (FB60) mg/kg de ração. Os valores de mRNA são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Semelhantemente ao observado para GPX, a expressão gênica de HSP70 apresentou efeito de período ($P < 0,0001$) e tratamento ($P < 0,0001$), bem como sua interação (Fig. 2). Aos 14 dias de tratamento os níveis de HSP70 foram significativamente aumentados, enquanto aos 28 dias a expressão do gene foi reduzida. A interação entre período e tratamento evidenciou que a expressão de HSP70 em tilápias desafiadas com FB, assim como a expressão de GPX, é tempo-dose dependente, entretanto a expressão destes genes se mostrou inversamente proporcional.

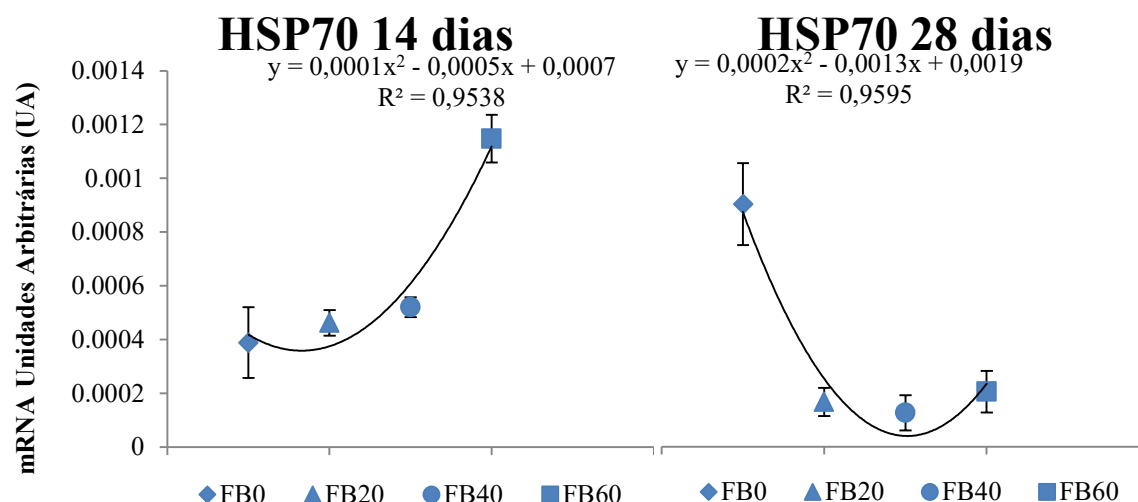


Fig 2. Expressão do gene HSP70 aos 14 e 28 dias para os tratamentos com inclusão de fumonisina, 0 (FB0), 20 (FB20), 40 (FB40) e 60 (FB60) mg/kg de ração. Os valores de mRNA são expressos em unidades arbitrárias (UA).

4. Discussão

Os animais possuem o sistema de proteção antioxidante complexo, como mecanismo de defesa contra os radicais livres, formados constantemente no metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos e, quando em excesso, podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas. Este excesso, causado pelo desequilíbrio entre o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado de estresse oxidativo (Nelson e Cox, 2014).

Um número variado de situações é capaz de causar estresse oxidativo celular por meio da geração de ROS e produtos da peroxidação lipídica alterando, desta forma, o equilíbrio redox e vias de transdução de sinal celular (Bhattacharjee, 2019). O organismo que possui ROS é danificado e busca a estabilidade energética; assim, retira energia proveniente dos lipídios, carboidratos e proteínas, para manter-se em equilíbrio; cerca de 1%

a 3% deste processo não chega ao final, fazendo com que essas espécies reativas ataquem a célula, causando apoptose, danos aos tecidos e alterações na expressão de genes (Barbosa et al., 2019). Dentre estas diversas alterações, o aumento da expressão de HSP70 tem sido sugerido como resposta primária ao estresse oxidativo causado pela FB (Kócsó et al., 2018; Khan et al., 2018; Galvano et al., 2002).

A chaperona HSP70 tem um papel essencial tanto na degradação de proteínas mal dobradas por meio do sistema ubiquitina-proteossomo, quanto no direcionamento e funcionamento adequado de diversas proteínas, como receptoras de membrana celular, ativadores e inibidores de transcrição, reguladores do ciclo celular, supressores de tumor e moduladores de crescimento por meio de ubiquitinação simples (Fernández-Fernández et al., 2017). Assim, é possível hipotetizar que o desafio por fumonisinas pode causar estresse oxidativo e aumentar a concentração de proteínas danificadas pela ação dos ROS, o que geraria, em curto prazo, aumento da expressão desta chaperona como ferramenta de defesa.

Neste trabalho, observamos aumento da expressão de HSP70 aos 14 dias de exposição à FB e este aumento foi diretamente proporcional aos níveis de fumonisina. Estes resultados corroboram com o observado por Rumora et al. (2007), que verificaram aumento significativo da expressão HSP70 no rim de ratos desafiados com 0,5 mg FB/kg por 7 dias. Kócsó et al. (2018) observaram que a exposição à fumonisina B1 por 5 dias (50ug/kg) aumentou a expressão de HSP70 no pulmão e rim de ratos, entretanto este curto período de exposição não foi suficiente para aumentar significativamente a atividade de GPX, evidenciando que a resposta primária ao estresse causado pela fumonisina envolve a ação primária de HSP70, como sugerem os nossos dados aos 14 dias de exposição.

Em longo prazo, entretanto, a ativação de outras vias de combate ao estresse oxidativo parecem ter mais efeito, e parecem ser ativadas em resposta ao aumento de HSP70

(Khan et al., 2018). Neste trabalho, observamos redução da expressão de HSP70 aos 28 dias de exposição à FB e esta redução foi inversamente proporcional aos níveis de fumonisina e de GPX, que aumentou significativamente aos 28 dias de exposição.

A glutathiona peroxidase é uma enzima responsável pelo combate indireto dos peróxidos, e faz parte do sistema de defesa antioxidante enzimático celular. Sua atividade depende diretamente da glutathiona reduzida (GSH), que é oxidada em glutathiona oxidada (GSSG) após uma cascata de regeneração de moléculas antioxidantes (Fig. 3A) (Flohe, 1971).

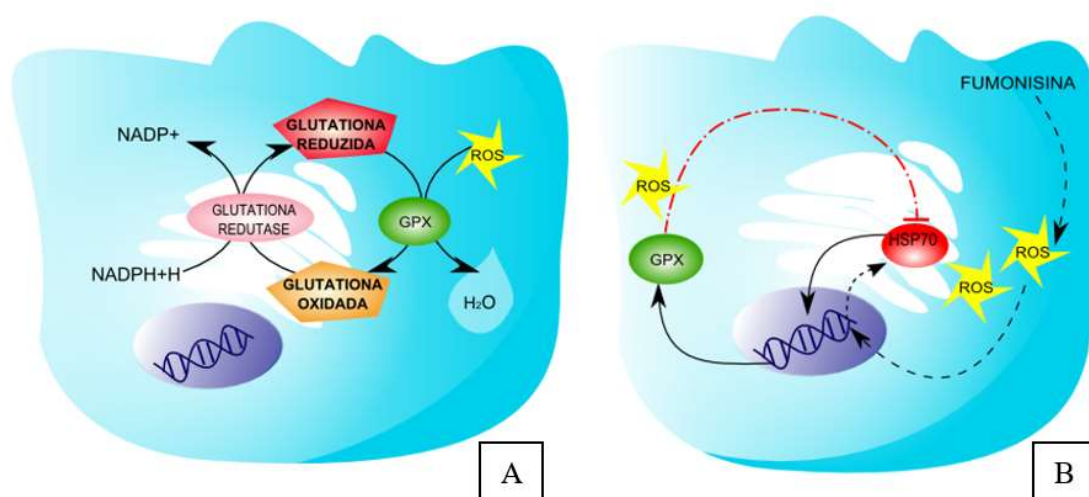


Fig 3. A) Modelo esquemático da ação da enzima GPX sobre o radical livre. Nas mitocôndrias, o radical livre H_2O_2 é convertido a H_2O por meio da molécula de glutathiona reduzida (GSH) por meio da ação da GPX. A manutenção dos níveis adequados de GSH é feita por meio da enzima glutathiona redutase (GR), que utiliza o equivalente redutor NADPH como doador de elétron (Nelson e Cox, 2014). B) Hipótese de ação primária e secundária de fumonisina sobre moléculas envolvidas no estresse oxidativo. Inicialmente o estresse oxidativo causado pelo desafio por fumonisina promove aumento de HSP70. Em longo prazo o aumento de HSP70 juntamente com a produção de ROS continuada estimula a expressão de GPX. Aumento de GPX promove retroalimentação negativa sobre a expressão de HSP70.

Rumora et al. (2007) demonstraram que FB1 altera o equilíbrio redox celular, o que leva à ativação específica do tecido e à expressão de moléculas de sinalização sensíveis ao redox, em especial glutathionas. Estes autores evidenciaram aumento de 24% nas concentrações de GSH no fígado de ratos tratados com FB1 por 7 dias, entretanto, este aumento não foi evidenciado em 2 dias de exposição evidenciando que a expressão de glutathiona induzida por fumonisina é tempo dependente, como sugerem nossos dados.

A modulação co-dependente entre HSP70 e o sistema glutathiona já havia sido previamente relatada por Rokutan et al. (1996) por meio da sub-regulação de HSP70 mediada pela depleção de glutathiona. Quando avaliados sinergicamente nossos dados e a literatura, é possível propor um mecanismo de defesa ao desafio com FB envolvendo GPX e HSP70 como demonstrado na Fig. 3B.

Em nosso estudo, quando avaliados de forma conjunta, a expressão de HSP70 diminuiu e a expressão de GPX aumentou conforme o tempo de desafio aumentou, corroborando a hipótese de que a resposta ao desafio por fumonisinas em tilápia envolve resposta direta de HSP70 com modulação por GPX e, que esta resposta, é tempo-dose dependente. Não foram encontrados na literatura, entretanto, estudos que evidenciem esta relação HSP70-GPX em maior tempo de estresse, independente da fonte causadora, havendo necessidade de novos estudos.

5. Conclusão

O desafio com FB em alevinos de tilápia-do-Nilo afeta a expressão dos genes envolvidos no equilíbrio redox HSP70 e GPX, sendo inicialmente aumentada a expressão de HSP70 com retroalimentação positiva para GPX, e esta por sua vez promove resposta de retroalimentação negativa para HSP70 em maior tempo de desafio.

Referências

- Barbosa, G. O., Silva, J. A., Siqueira-Berti, A., Nishan, U., Rosa-Ribeiro, R., Oliveira, S. B., Bruni-Cardoso, A., 2019. Castration-induced prostate epithelial cell apoptosis results from targeted oxidative stress attack of M1142-macrophages. *Journal of cellular physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.28544>
- Bhattacharjee, S., 2019. ROS and Oxidative Stress: Origin and Implication. In *Reactive Oxygen Species in Plant Biology* (pp. 1-31). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3941-3_1
- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F., Spiteller, G., Vlegaar, R., 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (11), 743-745. <https://doi.org/10.1039/C39880000743>
- Dellafiora, L., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2018). Mechanisms of Fumonisin B1 Toxicity: A Computational Perspective beyond the Ceramide Synthases Inhibition. *Chemical research in toxicology*, 31(11), 1203-1212. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00188>
- De Maio, A., 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock (Augusta, Ga.)*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1097/00024382-199901000-00001>
- Fernández-Fernández, M. R., Gragera, M., Ochoa-Ibarrola, L., Quintana-Gallardo, L., Valpuesta, J. M., 2017. Hsp70—a master regulator in protein degradation. *FEBS letters*, 591(17), 2648-2660. <https://doi.org/10.1007/BF01487101>
- Flohe, L., 1971. Die glutathionperoxidase: enzymologie und biologische aspekte. *Klinische Wochenschrift*, 49(12), 669-683. <https://doi.org/10.1007/BF01487101>

Galvano, F., Campisi, A., Russo, A., Galvano, G., Palumbo, M., Renis, Barcellona, M. M. L., Perez-Polo, J. R., Vanella, A., 2002. DNA damage in astrocytes exposed to fumonisin B1. *Neurochemical research*, 27(4), 345-351. <https://doi.org/10.1023/A:1014971515377>

Gontijo A.M.M.C., Barreto R.E., Speit G., Reyes V.A.V., Volpato G.L., Salvadori D.M.F., 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat. Res.* 534, 165–172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0)

Khan, R. B., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A. A., 2018. Fumonisin B1 induces oxidative stress in oesophageal (SNO) cancer cells. *Toxicon*, 141, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.12.041>

Kócsó, D. J., Szabó-Fodor, J., Mézes, M., Balogh, K., Ferenczi, S., Szabó, A., Kovács, M., 2018. Fumonisin B1 exposure increases Hsp70 expression in the lung and kidney of rats without inducing significant oxidative stress. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(3), 394-407. <https://doi.org/10.1556/004.2018.036>

Leal, M., Shimada, A., Ruíz, F., de Mejía, E. G., 1999. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicology Letters*, 109(1-2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00062-4)

Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 1328 p.

Rheeder, J. P., Marasas, W. F., Vismer, H. F., 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2101-2105. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2101-2105.2002>

Rokutan, K., Hirakawa, T., Teshima, S., Honda, S., Kishi, K., 1996. Glutathione depletion impairs transcriptional activation of heat shock genes in primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells. *The Journal of clinical investigation*, 97(10), 2242-2250. <https://doi.org/10.1172/JCI118665>

Rumora, L., Domijan, A. M., Grubišić, T. Ž., Peraica, M., 2007. Mycotoxin fumonisin B1 alters cellular redox balance and signalling pathways in rat liver and kidney. *Toxicology*, 242(1-3), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.09.006>

Szabó, A., Fébel, H., Ali, O., & Kovács, M. (2019). Fumonisin B1 induced compositional modifications of the renal and hepatic membrane lipids in rats–Dose and exposure time dependence. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-18. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1652772>

Towner, R. A., Qian, S. Y., Kadiiska, M. B., & Mason, R. P. (2003). In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(10), 1330-1340. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.002>

Turner, P. C., Nikiema, P., Wild, C. P., 1999. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1-2), 81-93. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00012-5)

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Visconti, A., Boenke, A., Doko, M. B., Solfrizzo, M., Pascale, M., 1995. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR—measurements and testing projects. *Natural toxins*, 3(4), 269-274. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030419>

Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., Merrill, A. H., 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14486-14490. <http://www.jbc.org/content/266/22/14486.full.pdf>

Yang, C.G.; Wang, X.L.; Tian, J.; Liu, W.; Wu F.; Jiang, M.; Wen, H. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene*, 527:183–192, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.013>

IV - IMPLICAÇÕES

A idealização do projeto teórico conflitou com a realização prática. A ideia era realizar testes de sangue para avaliação do sistema imunológico, porém no dia dos abates os peixes eram pequenos, dificultando as coletas dos órgãos para as análises de expressão.

A aquisição da micotoxina é difícil, e as poucas empresas que faziam isso já não fazem mais, devido ao grande risco de contaminação. A opção é utilizar micotoxina purificada, mas o preço é muito alto e em poucas quantidades, inviabilizando a sequência da pesquisa.

O desenho dos primers, reagentes e adequação da metodologia para análises de expressão gênica são caras e despendem tempo. Em nosso trabalho, os testes de primers não foram satisfatórios em algumas etapas, o que contribui para o atraso dos resultados completos.

Os resultados obtidos foram de grande valia mesmo com as implicações e dificuldades encontradas. Foi verificado a modificação no perfil de ácidos graxos pela contaminação com micotoxina fumonisina. Por ser produzida no milho, que é base da maioria de rações e produtos para animais, podemos compreender a importância deste estudo em avaliar os efeitos da fumonisina em outra espécie animal, de modo rápido e com resultados conclusivos.

Este trabalho é um dos primeiros que relacionam os efeitos da fumonisina sobre parâmetros genéticos e produtivos em tilápia-do-Nilo, e pode servir como base para outros estudos de aprimoramento, desta e de outras espécies de peixes.