

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeitos da relação entre carboidrato e lipídio
em respostas fisiológicas em juvenis de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**

Allan Emilio Piedade
Engenheiro de Aquicultura

Jaboticabal, São Paulo

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Efeitos da relação entre carboidrato e lipídio
em respostas fisiológicas em juvenis de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**

Allan Emilio Piedade

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

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

Jaboticabal, São Paulo

2021

Piedade, Allan Emilio
P613e Efeitos da relação entre carboidrato e lipídio em respostas fisiológicas em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) / Allan Emilio Piedade. – – Jaboticabal, 2021
viii, 75 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2021

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Leonardo Sussumu Takahashi, Manuel Vazquez Vidal Junior

Bibliografia

1. . Aquicultura. 2. Estresse. 3. Fisiologia. 4. Nutrição. 5. *Piaractus mesopotamicus*. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos da relação entre carboidrato e lipídio em respostas fisiológicas em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)

AUTOR: ALLAN EMILIO PIEDADE

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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

Prof. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Participação Virtual)

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI (Participação Virtual)

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

Prof. Dr. MANUEL VAZQUEZ VIDAL JÚNIOR (Participação Virtual)

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, Campos dos Goytacazes-RJ

Jaboticabal, 30 de julho de 2021

Centro de Aquicultura da Unesp
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal SP Brasil
Tel 55 16 32032110 ramal 214 fax 55 16 32032268
pgaqui@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

Dedicatória

*Dedico esse trabalho à toda minha família, minha companheira de vida, meus amigos
e a todos os professores que sempre me incentivaram e acreditaram em meu
potencial!!!*

EPÍGRAFE

*Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir
não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir.*

Friedrich Nietzch

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Profa. Elisabeth C. Urbinati pela orientação, carinho, confiança, cuidado e por sempre acreditar e me incentivar a ser melhor. Te admiro muito e fico lisonjeado em ter tido a oportunidade de ser seu orientado.

À toda minha família, em especial a minha mãe Maria Emilio, meu irmão Lucas Emilio e ao meu pai Cláudio Martins Piedade por sempre acreditarem em meu potencial, e mesmo sentindo saudade por conta da distância sempre me incentivaram em meus objetivos profissionais.

Aos meus tios, tias, primos e primas que também sempre me incentivaram e me deram todo o apoio necessário para minha jornada acadêmica e profissional, vocês também fazem parte dessa conquista.

À minha companheira de vida, Kétuly da Silva Ataides, por toda a cumplicidade e incentivo que recebi desde o dia que nos conhecemos. Saiba que te admiro muito como pessoa e como profissional, aprendo todos os dias contigo. Obrigado por fazer parte da minha vida, e juntos formamos o casal aquicultura, como alguns dizem rsrs.

A todos os meus amigos, tanto os mais antigos quanto os que ganhei durante minha estadia em Jaboticabal Em especial ao Rubens e ao Evandro, que além de me ajudarem em minha caminhada acadêmica, também foram peças chaves para que minha estadia em Jaboticabal fosse marcante para o resto da vida. A todos os membros do LAFIPE pela condução e finalização do experimento, e pelas risadas e parceria que sempre tive, em especial a Mari e Aurea.

Um agradecimento especial à Damares Perecim, sabia que a senhora é peça chave no Laboratório de Fisiologia de Peixes. Obrigado por todo apoio e risadas durante o período do estágio e do mestrado, gosto muito de você!

A todos os funcionários do Centro de Aquicultura da Unesp, em especial ao Valdecir e ao Márcio por sempre estarem à disposição quando precisamos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, possibilitando desta maneira a execução do estudo.

APOIO FINANCEIRO

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo nº 130868/2019-1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. Situação e perspectiva da aquicultura mundial e brasileira	3
1.2. Carboidrato na nutrição de peixes.....	4
1.3. Estresse em peixes.....	8
1.4. Sistema imune dos peixes	11
1.4.1. Sistema imune inato.....	11
1.4.2. Sistema imune adquirido	13
1.5. Estresse oxidativo e sistema antioxidante	14
1.6. Modelo biológico	17
Objetivo Geral	18
Objetivos específicos.....	18
Desempenho zootécnico e respostas fisiológicas em juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio submetidos ao estresse de manejo	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1. Animais experimentais e protocolo experimental	34
2.2. Amostras	35
2.3. Dietas experimentais.....	36
2.4. Análises.....	37
2.4.1. Concentrações plasmáticas de glicose e cortisol.....	37
2.4.2. Concentrações sanguíneas de biomarcadores metabólicos	38
2.4.3. Análises imunológicas.....	38
2.4.4. Desempenho zootécnico.....	39
2.4.5. Análises estatísticas	39
3. RESULTADOS	40
3.1. Desempenho zootécnico	40
3.2. Indicadores de estresse.....	42
3.3. Indicadores metabólicos	43
3.3.1. Indicadores sanguíneos.....	43
3.3.2. Indicadores teciduais	44
3.3.3. Índices morfo-somáticos	45

3.4. Indicadores imunológicos	46
3.4.1. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima	46
4. DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	50
Sistema antioxidante e estresse oxidativo em juvenis de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob duas condições de estresse.....	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.1. Animais e delineamento experimental.....	58
2.2. Amostragens.....	59
2.3. Dietas experimentais	59
2.4. Análises.....	61
2.4.1. Indicador metabólico	61
2.4.2. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo.....	61
Atividade das enzimas	61
Concentração de GSH (glutathiona reduzida).....	62
Lipoperoxidação lipídica.....	62
2.5. Análise estatística.....	62
3. RESULTADOS.....	63
3.1. Indicador metabólico.....	63
3.2 Sistema antioxidante/Estresse oxidativo.....	64
4. DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	71

RESUMO

O presente estudo investigou o efeito da relação de carboidrato e lipídio (CHO:LIP) no desempenho zootécnico e nas respostas fisiológicas de juvenis de pacu expostos a dois estressores comuns na aquicultura, estresse agudo (exposição aérea) e estresse crônico (perseguição diária com puçá por 21 dias). Foram avaliados indicadores de estresse (cortisol e glicose plasmáticos), indicadores metabólicos (triglicerídeos, colesterol, proteína total, glicogênio hepático e índices hepatossomático e gorduro-viscerosomático), indicadores do sistema imune inato (atividade respiratória de leucócitos e concentrações séricas de lisozima) e avaliado o sistema antioxidante/estresse oxidativo (catalase, CAT; superóxido dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; glutathione s-transferase, GST; glutathione reduzida, GSH e lipoperoxidação lipídica, LPO). Os peixes foram alimentados durante 21 dias com três dietas experimentais: CHO_{25,6}:LIP₁₁ (2,33), CHO_{35,4}:LIP_{9,4} (3,77) e CHO₄₅:LIP₆ (7,50), sendo um grupo sem manejo estressor e outro exposto a manejo diário. Ao final do período, os dois grupos passaram por um estressor agudo (exposição aérea de 4 min) e amostrados antes do manejo (basal), 1, 3 e 24 horas depois. A glicose plasmática foi modulada pela relação CHO:LIP, apresentando os maiores níveis nas dietas 3,77 e 7,50, sendo os maiores níveis observados no grupo exposto ao estressor agudo (1, 3 e 24 horas). Os triglicerídeos plasmáticos reduziram às 24 horas nas dietas 3,77 e 7,50; e a dieta 2,33 teve a maior concentração quando comparada com as dietas 3,77 e 7,50. As dietas contendo maiores relação de CHO:LIP apresentaram maiores valores de glicogênio hepático e do IHS. A condição de estresse crônico impactou de forma negativa a concentração de lisozima sérica durante o período experimental. Concluindo, a dieta 7,50 promoveu o melhor desempenho, e as diferentes relações de CHO:LIP não afetaram a resposta de estresse e nem as respostas imunológicas após alimentação durante 21 dias. O estresse crônico prejudicou o desempenho e a capacidade de resposta do sistema imune inato. A atividade da SOD diminuiu 24 horas após exposição aérea. A GSH diminuiu após a exposição ao estressor nos peixes das dietas 2,33 e 3,77 e aumentou na dieta 7,50. A LPO foi menor nos peixes que receberam a dieta 7,50. A dieta 7,50 promoveu maior crescimento e menor LPO, além de aumentar as concentrações de GSH no fígado, demonstrando que o pacu aproveita de forma eficiente o carboidrato sem que haja prejuízo em suas respostas fisiológicas.

Palavras chaves: aquicultura, nutrição, estresse, fisiologia, *Piaractus mesopotamicus*.

ABSTRACT

The present study assessed the effect of the CHO:LIP ratio on growth performance, and physiological responses in juvenile pacu exposed to two common stressors in aquaculture, acute stress (air exposure) and chronic stress (daily chasing with net for 21 days). Stress (plasma cortisol and glucose), metabolic (triglycerides, cholesterol, total protein, hepatic glycogen and hepatosomatic and viscerosomatic indices), innate immune system (respiratory activity of leukocytes and serum concentrations of lysozyme) biomarkers were evaluated and antioxidant indicators (catalase, CAT; superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; glutathione s-transferase, GST; reduced glutathione, GSH and lipid lipoperoxidation, LPO) in liver. Fish were fed for 21 days with three diets: CHO25.6:LIP11 (2.33), CHO35.4:LIP9.4 (3.77) and CHO45:LIP6 (7.50), being an unhandled group and another exposed to daily chasing. At the end of the period, both groups were exposed to an acute stressor (4 min air exposure) and sampled before exposure (baseline), 1, 3 and 24 hours later. Plasma glucose was modulated by the CHO:LIP ratio, showing the highest levels in diets 3.77 and 7.50, with the highest levels observed in the group acutely stressed (1, 3 and 24 hours). Plasma triglyceride reduced at 24 hours in fish fed with diets 3.77 and 7.50; fish from diet 2.33 had the highest concentration when compared to diets 3.77 and 7.50. Fish from diets containing higher CHO:LIP ratio had higher liver glycogen and HSI values. The chronic handling negatively impacted the serum lysozyme concentration. In conclusion, the 7.50 diet promoted the best growth performance, and the different CHO:LIP ratios did not affect the stress or immune responses after feeding for 21 days. Chronic stress impaired the growth performance and responsiveness of the innate immune system. SOD activity decreased 24 h after air exposure and GSH decreased after exposure to the stressor in fish fed with diets 2.33 and 3.77 and increased in those fed with diet 7.50. LPO was lower in fish that received the 7.50 diet. In conclusion, the 7.50 diet promoted the best growth performance, lower LPO and increasing the concentrations of GSH in the liver, demonstrating that pacu efficiently uses carbohydrate without harming its physiological responses.

Keywords: aquaculture, nutrition, stress, physiology, *Piaractus mesopotamicus*.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Situação e perspectiva da aquicultura mundial e brasileira

A produção mundial de pescado foi de 114,5 milhões de toneladas em 2018, sendo a aquicultura responsável por 46% do total produzido, correspondendo a uma receita de USD 263,6 bilhões. Com a estagnação da pesca, desde 1980, a aquicultura tem suprido de forma contínua o expressivo aumento da demanda por pescado para consumo humano. Entre 1961 e 2017, o crescimento médio anual do consumo de pescado foi de 3,1 %, ultrapassando o crescimento populacional (1,6 %) e excedendo o da carne de todos os animais terrestres somados, que foi de 2,7 %. Em termos per capita, o aumento anual do consumo de pescado foi de 1,5 %, passando de 9 kg em 1961 para 20,5 kg em 2018 (FAO, 2020). Esses dados reforçam o potencial de crescimento da aquicultura, atividade que se for realizada de forma racional e respeitando os princípios de sustentabilidade é e será uma grande ferramenta de combate à fome mundial.

Acompanhando a tendência global, o Brasil teve um aumento de 3,4 % entre 2017 e 2018 segundo dados do IBGE e de 4,9 % segundo o anuário da Peixe BR entre 2018 e 2019, alcançando um total de 758 mil toneladas (IBGE, 2018; Peixe BR, 2020). Alguns fatores foram e ainda são importantes para que a aquicultura continue se desenvolvendo de forma satisfatória, como por exemplo o investimento em pesquisas, diferentes sistemas de produção e a intensificação da produção, que aliados às condições geográficas, climáticas e biológicas favoráveis possibilitam o crescimento da atividade no Brasil. Em contrapartida, a intensificação dos sistemas de produção normalmente impõe aos peixes condições estressoras, fazendo com que os mesmos fiquem susceptíveis à patógenos oportunistas, uma vez são estocados em altas densidades e passam por inúmeros manejos físicos e condições ambientais alteradas, sendo esse um dos fatores limitantes na produção aquícola (Barton et al., 2002). Outro fator limitante na produção de peixes é o custo com a ração, que dependendo do sistema de produção pode chegar a 70% do custo total, sendo a proteína o ingrediente mais oneroso da dieta. Os carboidratos são ingredientes energéticos de baixo custo que podem ser utilizados em substituição a proteína, reduzindo desta forma o custo de produção (Stone, 2003; Kamalam et al., 2017).

1.2. Carboidrato na nutrição de peixes

Carboidratos são compostos orgânicos de ocorrência natural, formados por carbono, hidrogênio e oxigênio que apresentam proporção $(CH_2O)_n$. Constituem os açúcares, amidos e celulose, sendo denominados de monossacarídeos em sua forma mais simples, como exemplo a glicose, frutose e galactose. Podem combinar-se formando açúcares mais complexos como é o caso da sacarose ou maltose, moléculas formadas por dois monossacarídeos, sendo classificadas como dissacarídeos. As moléculas que possuem entre dois e seis monossacarídeos são chamadas de oligossacarídeo e aquelas que possuem um número superior a seis são denominadas de polissacarídeos, como exemplo o glicogênio e o amido (milho, mandioca, batata, sorgo), sendo que entre as diferentes formas vegetais apenas os açúcares e os amidos possuem valor nutricional em dietas para peixes (Melo et al., 1998; Kaushik, 2001; Stone, 2003; NRC, 2011).

O amido de milho é um dos principais polissacarídeos utilizados em dietas comerciais para peixes (Rawles e Lochmann, 2003). O amido de milho é composto por 20-30 % de amilose e 80-70 % de amilopectina; porém, o amido de mandioca é composto por aproximadamente 17 % de amilose e 83 % de amilopectina (Gallant et al., 1992). Os amidos cerosos ou “waxy” são obtidos através de mutações especiais das plantas (ex. milho ceroso ou “waxy”). Os grãos do milho ceroso, quando cortados, possuem aparência de cera e contêm unicamente cadeias ramificadas de amido que correspondem a quase 99% de amilopectina, fazendo com que os peixes tenham um melhor aproveitamento deste nutriente pois essa disposição das cadeias (ramificações) facilitam a ação das enzimas digestivas. Segundo Melo et al. (1998), a amilose é formada por 200 a 20.000 unidades de glicose unidas através de ligações glicosídicas α -1,4, enquanto a amilopectina é uma molécula ramificada, formada por unidades curtas de aproximadamente 30 unidades de glicose unidas à cadeia principal por ligações α -1,6.

Segundo Rawles e Lochmann (2003), essas diferenças estruturais influenciam no grau de digestão dos peixes e consequente aproveitamento dos carboidratos como fonte energética. Dietas contendo diferentes níveis de CHOs submetidas à extrusão e peletização foram testadas na alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), onde a extrusão melhorou a disponibilidade do CHO e a eficiência da digestão da proteína quando comparado a peletização. Além do melhor aproveitamento, houve modulação das

enzimas digestivas tanto pelos diferentes nutrientes quanto pelo processamento (Honorato et al., 2016).

Os carboidratos (CHOs) são bastante utilizados em dietas para animais domésticos, e apesar dos estudos indicarem que não há exigência desse nutriente para peixes, sua inclusão em níveis adequados pode melhorar a eficiência na utilização de outros nutrientes. A proteína é o item mais oneroso nas dietas, e a correta utilização dos CHOs pode reduzir o seu catabolismo para produção de energia (“protein sparing effect”), fazendo com que o animal a utilize para crescimento. O efeito poupador de proteína reduz o custo de produção, além de minimizar a excreção de compostos nitrogenados para o ambiente, resultando em menor impacto da atividade aquícola, além de aumentar a capacidade de suporte nos sistemas de produção de peixe, como por exemplo em um sistema de recirculação de água onde o fator limitante é o filtro biológico (Suarez e Mommsen, 1987; Cowey e Walton, 1989; Wilson, 1994; Ren et al., 2011; Zhou et al., 2015; Kamalam et al., 2017). O melhor desempenho e o efeito poupador de proteína podem estar relacionados com o fato da glicose ser um substrato fundamental para alguns tecidos glicose-dependentes, como exemplo as células vermelhas, tecido nervoso, entre outros (Cowey et al., 1977; Kamalam et al., 2017).

Um nível aceitável de carboidrato em dietas para peixes é aquele que não compromete o crescimento e não resulta em mortalidade, já um nível ótimo é aquele que possibilite que toda a glicose seja oxidada, poupando, desta maneira, a proteína e a preservando para crescimento (Hilton et al., 1987). Quando comparados aos vertebrados, os peixes aparentemente apresentam uma menor habilidade em aproveitar os carboidratos da dieta, surgindo, desta forma, algumas possíveis explicações. Uma que já foi considerada é a deficiência de insulina nos peixes (Thorpe e Ince, 1974), porém estudos mostraram a presença de insulina semelhante e até superior do que as observadas em mamíferos (Mommsen e Plisetskaya, 1991). Outra possível justificativa seria a menor atividade de receptores de insulina (Mommsen e Plisetskaya, 1991), porém alta atividade destes receptores já foi demonstrada nas células de peixes (Maestro et al., 1997). Outra possibilidade seria o mecanismo de entrada de glicose na célula, nas proteínas transportadoras de glicose, as chamadas GLUTs, componentes essenciais para a utilização deste nutriente pelas células.

Num dos primeiros estudos em peixes, Wright et al. (1998) não encontraram GLUT-4 em vários tecidos de tilápia e uma distribuição muito limitada de GLUT-1 nos tecidos periféricos, sugerindo uma explicação para a intolerância dos peixes à glicose. Na mesma época, Krasnov et al. (1999) observaram aumento na absorção de carboidrato em embriões transgênicos de truta-arco-íris expressando genes de GLUT-1. Na mesma ocasião, numa contribuição importante, Planas et al. (2000) identificaram, na truta, uma molécula de GLUT com alta homologia da GLUT-4 de mamíferos, que se expressou no músculo esquelético, rim e brânquias, tecidos que possuem alta utilização de glicose. Já Baldan (2008), estudando o metabolismo de CHOs em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) identificou uma proteína com alta homologia com a GLUT-4 do músculo esquelético de rato, porém com intensidade de banda reduzida. Por outro lado, a intolerância dos peixes à glicose pode também ser atribuída, pelo menos em parte, à baixa atividade ou baixo número de GLUTs e receptores. Marin-Ruez et al. (2014) revisaram o tema e apresentaram as evidências acumuladas das características funcionais e da regulação da GLUT-4 em peixes.

Outro aspecto discutido em relação à utilização de carboidratos pelos peixes é a regulação de enzimas que participam do metabolismo da glicose. Segundo Panserat et al. (2000), pode haver um desequilíbrio entre o aproveitamento da glicose (glicólise) e sua produção pelo fígado (gliconeogênese). Com foco nesta hipótese, Enes et al. (2009) revisaram a regulação nutricional das enzimas chave envolvidas nas vias glicolítica e gliconeogênica. Os dados levantados sustentam a hipótese de que a aparente baixa capacidade de utilização da glicose pelos peixes, em especial os de hábito alimentar carnívoro, está parcialmente relacionada a uma inadequada regulação das referidas vias metabólicas.

O metabolismo da glicose tem sido bastante estudado em peixes devido a sua importância como fonte energética de baixo custo, bem como a baixa capacidade de sua utilização pelos tecidos periféricos quando comparados com outros vertebrados. A quantidade adequada de carboidrato utilizada em dietas para peixes varia por fatores biológicos (hábito alimentar, genótipo e exercício), nutricionais (fonte de carboidrato, nível de inclusão, processamento da dieta, manejo alimentar e outros nutrientes) e em relação a fatores ambientais (temperatura, fotoperíodo, salinidade e estresse) (Fernandez et al., 2007; Enes et al., 2009; Kamalam et al., 2017). A maioria dos estudos que investigaram o uso dos carboidratos em dietas para peixes demonstrou que o nível ideal

de amido pode melhorar o crescimento e a eficiência alimentar (Ren et al., 2011; Zhou et al., 2015). Em contrapartida, o excesso deste nutriente na dieta pode causar distúrbios metabólicos, como aumento da deposição de glicogênio no fígado, acúmulo de gordura tecidual e mesentérica, hiperglicemia e histopatologia, além de suprimir as funções imunes em peixes (Russell et al., 2001; Rawles et al., 2008; Gatesoupe et al., 2014; Wu et al., 2016; Lin et al., 2018).

De maneira geral, se a eficiência em utilizar o carboidrato como fonte energética for levada em consideração apenas com base na quantidade de glicose pós digestão, bem como sua posterior taxa glicêmica no organismo, os peixes, em especial os carnívoros, possuem uma baixa habilidade em utilizar os carboidratos dietéticos (NRC, 2011; Kamalam et al., 2017). Porém, quando a comparação com outros animais vertebrados for realizada, é importante levar em consideração algumas particularidades, como por exemplo: a natureza ectotérmica dos peixes, bem como sua menor taxa metabólica, disponibilidade de oxigênio e sua adaptação metabólica a privação alimentar. Desta maneira, os efeitos relacionados ao uso eficiente do carboidrato parecem estar associados, principalmente ao hábito alimentar, sendo que os peixes que possuem hábitos alimentares específicos como exemplo as espécies carnívoras, que normalmente não ingerem esse nutriente em grande quantidade em sua dieta natural, teriam perdido a capacidade de usar o aumento de glicose no sangue provenientes de carboidratos (Polakof et al., 2012).

Peixes carnívoros como a truta, salmão e robalo, quando comparados com peixes onívoros como tilápia, tambaqui, “catfish” e carpa apresentam menor atividade da amilase, sucrase e isomaltase, bem como reduzida capacidade de captação da glicose no intestino, menor capacidade de ligação à insulina e número reduzido de receptores no músculo branco. Também apresentam lento retorno aos níveis basais na taxa glicêmica (hiperglicemia pós-prandial) e reduzido controle de enzimas da via gliconeogênica após alimentação com dietas contendo carboidratos (Kamalam et al., 2017).

Em contrapartida, essa generalização nem sempre é verdadeira, existindo diferenças fisiológicas mesmo quando comparamos espécie com mesmo hábito alimentar, como é o caso da tilápia e do jundiá, que apesar de serem espécies onívoras apresentaram respostas distintas em relação à digestibilidade do amido, bem como em relação à atividade da amilase e maltase no trato digestório. Da mesma forma, em comparação com outros peixes carnívoros, o linguado senegalês demonstrou uma rápida redução nos níveis

glicêmicos, sugerindo uma melhor capacidade em utilizar o amido dietético (Gominho-Rosa et al., 2015; Conde-Sieira et al., 2015). Abimorad et al. (2007), estudando a relação entre proteína, lipídio e carboidrato para pacu, concluíram que os melhores valores foram, 23, 4 e 46 %, respectivamente, indicando uma alta tolerância ao carboidrato. Em estudo mais recente, Takahashi et al. (2018) submeteram o pacu a testes de tolerância à glicose (oral e intraperitoneal) e concluíram que por conta do seu hábito alimentar (frutívoro/onívoro), essa espécie possui alta capacidade de utilização da glicose como fonte energética.

1.3. Estresse em peixes

O estresse é uma reação adaptativa que possibilita maior chance de sobrevivência frente a situações desafiadoras, quando ocorre a quebra da homeostase (equilíbrio fisiológico). Nesse momento, há uma cascata de reações que geram alterações fisiológicas e comportamentais que variam conforme a intensidade e duração do estímulo, sendo este conjunto de manifestações biológicas conhecido como resposta de estresse. Essa resposta é dividida em três diferentes estágios: primário, secundário e terciário, indicando o grau de alteração provocado pelo agente estressor (Jobling, 1994; Barton, 1997; Tort, 2011; Urbinati et al., 2020).

Na resposta primária, o conjunto de reações fisiológicas ocorre segundos após a percepção do fator estressor e é controlado por dois complexos sistemas: o simpático-células cromafins e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, ambos regulados pelo sistema neuroendócrino. No primeiro, o sistema nervoso central irá estimular as células cromafins, localizadas na região cefálica do rim, a produzir as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e em menor quantidade dopamina). Já no segundo, o sistema nervoso central irá estimular o hipotálamo a produzir o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que irá atuar na hipófise produzindo e liberando corticotropina (ACTH), e este, por fim, estimulará as células interrenais a produzirem e liberarem glicocorticoides, em especial o cortisol (Barton e Iwama, 1991; Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati et al., 2020). A localização próxima do tecido cromafim e interrenal sugere interação parácrina entre as catecolaminas e o cortisol. Reid et al. (1996), trabalhando com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram que altos níveis de cortisol aumentaram as concentrações de catecolaminas nas células cromafins, bem como sua ação colinérgica (Urbinati et al., 2020).

Ainda na resposta primária, além dos hormônios supracitados (catecolaminas e cortisol), outros hormônios são ativados pelo hipotálamo, como exemplo os hormônios tireoidianos (HTs). Além de modificarem o padrão e a intensidade da resposta de estresse em peixes, também alteram suas ações, bem como a função dos hormônios do eixo interrenal (Peter, 2011). Múltiplas interações têm sido identificadas entre os eixos endócrinos, formando desta maneira uma “rede de estresse” que possui ações coordenadas e focadas no metabolismo energético. Apesar de haver várias evidências, ainda não está claro como ocorre a interação entre esses eixos (Bernier et al., 2009; Urbinati et al., 2020). Minutos após o aumento dos níveis de catecolaminas e cortisol circulantes, se iniciam as respostas secundárias do estresse, caracterizadas por alterações metabólicas, osmorregulatórias e imunológicas, de acordo com a demanda energética da nova condição. O aumento da glicose circulante ocorre inicialmente pela ação das catecolaminas através da quebra do glicogênio hepático (Mazeaud e Mazeaud, 1981), sendo ela a fonte primária de energia para os peixes, atendendo, principalmente, a demanda do cérebro e músculos (to fight or flight).

As catecolaminas regulam funções cardíacas e respiratórias, incluindo o aumento do fluxo sanguíneo nas brânquias, cérebro e músculo, aumento da permeabilidade branquial e recrutamento de oxigênio, bem como a capacidade de transporte desse gás através do aumento do número de células vermelhas e melhora da afinidade com a hemoglobina. Essas alterações cardiorrespiratórias são muito importantes para manter o fornecimento adequado de oxigênio aos tecidos em resposta à nova demanda energética (Wendelaar Bonga, 1997; Reid et al., 1998; Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati et al., 2020). Juntamente com as catecolaminas, o cortisol é responsável pelo preparo fisiológico do animal, induzindo alterações metabólicas, osmorregulatórias e imunológicas.

O cortisol é necessário para manter os níveis altos de glicose circulante, bem como para recuperar o glicogênio hepático. Para isso, além de atuar na glicogenólise (juntamente com as catecolaminas), ele também aumenta a capacidade gliconeogênica do organismo através da mobilização de aminoácidos provenientes da proteína corporal. O lactato, caso possua alta disponibilidade, também pode ser usado como fonte energética (Mommsen et al., 1999). Em relação às funções osmorregulatórias do cortisol, evidências mostram que ele é importante para a aclimação dos peixes de água doce, possuindo ações glicocorticoides e mineralocorticoides, atuando nas células branquiais através do aumento da proliferação e diferenciação das células de cloreto e na reabsorção do sódio

através do intestino e rim (Wendelaar Bonga, 1997; Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati et al., 2020).

Se o estresse for de carácter crônico, irão se instalar as respostas terciárias, que são caracterizadas pela exaustão do sistema biológico. Durante a fase adaptativa (resposta secundária), a energia é prioritariamente direcionada para órgãos e funções relacionadas à sobrevivência, como: respiração, natação e osmorregulação. Caso o agente estressor seja de natureza aguda, o animal irá recuperar a homeostase sem grandes prejuízos, porém em situação crônica as reservas energéticas são esgotadas gerando, desta maneira, um estado de exaustão fisiológica que causará prejuízo no crescimento e reprodução, além do comprometimento das funções imunes. O comprometimento do sistema de defesa dos peixes afeta sua saúde, bem-estar e sobrevivência, sendo comum o surgimento de doenças causadas por patógenos oportunistas presentes no ambiente (Walters e Plumb, 1980; Wendelaar Bonga, 1997; Barton et al., 2002; Urbinati et al., 2020).

A produção do cortisol ocorre nas células esteroidogênicas do tecido interrenal, a partir de moléculas de colesterol. Esse processo envolve a ação de cinco enzimas presentes na membrana interna das mitocôndrias (Mommsen et al., 1999). O primeiro passo é realizado pela proteína StAR, que tem a função de transportar o colesterol de fora (citossol) para dentro da membrana mitocondrial (Aluru et al., 2005). Em seguida, ocorre a hidroxilação dos carbonos 17, 21 e 11, sendo a enzima colesterol desmolase (P450_{scc}) responsável pela quebra da cadeia lateral do colesterol, formando pregnenolona. A seguir, a enzima 17 α -hidroxilase (P450_{17 α -II}) catalisa a hidroxilação do C17, formando então a 17 α -OH pregnenolona (Zhou et al., 2007). A 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) faz a transformação da pregnenolona em 17 α -OH progesterona e a 21-hidroxilase (P450_{c21}) catalisa a hidroxilação do C21, formando o desoxicortisol. Por último, a 11 β -hidroxilase (P450_{c11}) catalisa a hidroxilação do C11 ocorrendo a formação do cortisol (Figura 1). (Idler e Truscott, 1967; Truscott e Idler, 1972; Balm et al., 1989; Mommsen et al., 1999; Zanuzzo, 2014).

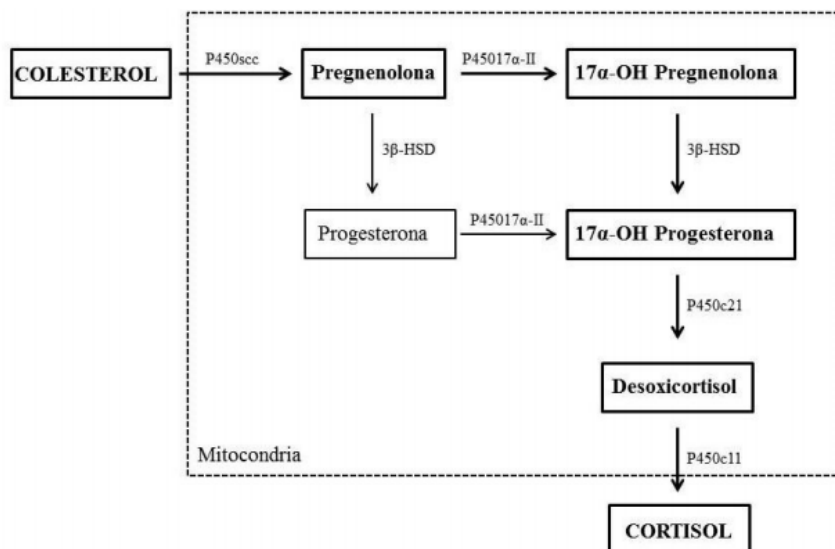


Figura 1. Biossíntese da produção de cortisol (Zanuzzo, 2014).

1.4. Sistema imune dos peixes

O sistema imune dos peixes é caracterizado por componentes celulares e humorais (substâncias solúveis), sendo este sistema dividido em imunidade inata (não específico) e imunidade adquirida (específico) que neutralizam substâncias estranhas no organismo, como microrganismos, toxinas e células malignas (Secombes e Wang, 2012; Rauta et al., 2012; Urbinati et al., 2020). Essas duas divisões do sistema imune trabalham de forma conjunta para destruir e eliminar agentes invasores ou desencadear processos defensivos, sendo o sistema imune inato a primeira linha de defesa, enquanto a imunidade adquirida está relacionada com a eliminação mais tardia dos patógenos e a formação da memória imunológica (Bernstein et al., 1998; Ye et al., 2018; Urbinati et al., 2020).

1.4.1. Sistema imune inato

A imunidade inata dos peixes é composta pelo tegumento, como pele e muco, agindo como barreira física e evitando, assim, a entrada de patógenos. Caso os agentes invasores penetrem no organismo, os peixes possuem células de defesa capazes de reconhecer, fagocitar e destruir agentes infecciosos, como os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, macrófagos, além de células citotóxicas como a *natural killer*, sendo essas células essenciais nesta etapa de defesa do organismo. Além disso, também possuem moléculas humorais como o sistema complemento, lisozima,

citocinas (interferon e interleucinas) e enzimas antimicrobianas (Secombes, 1996; Ellis, 1999; Kantari et al., 2008; Zacone et al., 2009; Urbinati et al., 2020). Quando um patógeno penetra pela primeira vez no organismo do hospedeiro, as respostas do sistema imune inato são acionadas com a finalidade de prevenir a infecção, porém, ao mesmo tempo, mecanismos do sistema adaptativo são ativados produzindo memória imunológica e evitando uma nova infecção pelo mesmo microrganismo (Wedemeyer, 1997).

As células de defesa dos teleósteos são produzidas por tecidos e órgãos linfoides (hematopoiéticos), como o rim, baço, timo e mucosa (Urbinati et al., 2014). O rim desempenha função semelhante à medula óssea, sendo responsável pela produção de células B, monócitos, macrófagos e granulócitos. O timo é o órgão responsável pela maturação dos linfócitos T, já o baço produz linfócitos e macrófagos. Os tecidos associados à mucosa por sua vez, além de produzirem macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos, também produzem muco que possuem proteínas que agem contra agentes infecciosos invasores, como exemplo a lisozima e proteínas do sistema complemento (Dalmo et al., 1997; Torroba e Zapata, 2003; Bowden et al., 2005; Urbinati et al., 2014). O aumento do número de células de defesa circulante no sangue dos peixes pode ser usado como indicativo da saúde do animal, sendo o sangue uma ferramenta complementar e seu perfil utilizado para determinar seu estado sanitário (Kindt et al., 2006).

Os neutrófilos, também conhecidos como células polimorfonucleares, estão envolvidos nos primeiros estágios da inflamação, sendo as primeiras células a chegarem ao local da inflamação (Griffin, 1984; Manning, 1994). Possuem grande capacidade fagocítica e são encontrados em maior quantidade no sangue, permitindo que o seu perfil seja indicativo de infecção (Suzuki, 1984; Kindt et al., 2006). Já os eosinófilos estão relacionados à infecção parasitária, e apesar da sua função não estar totalmente elucidada, atuam na resposta inflamatória e na defesa celular através da degranulação (exocitose), em outras palavras quando os produtos secretórios são liberados dos grânulos (Urbinati et al., 2014). Os monócitos são células periféricas da corrente sanguínea que migram para o sítio inflamatório transformando-se em macrófagos (Griffin, 1984; Cuesta et al., 1999). O macrófago, por sua vez, além de realizar a fagocitose, também libera citocinas (interferons e interleucinas) que possuem a função de apresentar os antígenos aos linfócitos, desencadeando desta maneira a resposta imune adquirida (Secombes e Fletcher, 1992).

Dentre os fatores humorais que compõem o sistema imune inato dos peixes teleósteos, o sistema complemento é um dos mais importantes pois está relacionado à várias etapas da resposta imune, como por exemplo fagocitose, opsonização, quimiotaxia e inativação de toxinas liberadas por agentes infecciosos (Secombes, 1996; Boshra e Sunyer, 2006; Nakao et al., 2011). O sistema complemento é composto por um conjunto de aproximadamente 35 proteínas que podem ser ativadas de três diferentes maneiras: I) via clássica, ativada por complexo antígeno-anticorpo; II) via alternativa, ativada por moléculas de superfície de microrganismos e por complexo antígeno-anticorpo; III) via das lectinas, ativada por ligação de carboidratos de superfície bacteriana, sendo todas as respectivas vias descritas em peixes (Holland e Lambris, 2002). A ação das três vias forma o complexo de ataque à membrana (CAM), responsável pela atividade lítica em organismos invasores (Nakao et al., 2011; Urbinati et al., 2014). A via alternativa é a mais comum e importante nos peixes pelo seu carácter não específico, sendo essa via ativada assim que o organismo entra em contato com o agente infeccioso (Biller-Takahashi et al., 2012).

A lisozima é outro importante componente não específico do sistema imunológico, encontrado na maioria dos peixes (Grinde et al., 1988). É uma enzima produzida por leucócitos, especialmente neutrófilos e monócitos, que possui capacidade lítica sobre a membrana celular de diversas bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas. Nos peixes, encontra-se amplamente distribuída no organismo, como exemplo no muco, pele, brânquias, trato gastrointestinal e soro, sendo comum estar presente em maior quantidade nos órgãos linfoides (Palaksha et al., 2008). Variações nos seus níveis séricos podem ocorrer devido a alterações sazonais, sexo, maturação sexual, alimentação, temperatura da água, pH e estresse a manejos ou infecções (Hernández e Tort, 2003).

1.4.2. Sistema imune adquirido

O sistema imune adquirido também é composto por células e fatores humorais, e, diferentemente no sistema imune inato, esse sistema é acionado após o contato com o agente patogênico, e irá desencadear reações que culminarão na produção de anticorpos específicos para aquele agente invasor, bem como na formação da memória imunológica (Bernstein et al., 1998). Esse mecanismo de defesa é caracterizado pela produção de linfócitos T e B, que com o auxílio dos macrófagos serão apresentados aos antígenos (Urbinati et al., 2014). Após a fagocitose, fragmentos do antígeno se ligam a superfície

do macrófago que possui a função de apresentá-lo aos linfócitos T, os quais liberam sinais químicos (citocinas) que irão estimular outras células, como os linfócitos B, que são responsáveis pela produção de anticorpo específico para aquele agente infeccioso (Secombes e Wang, 2012; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014).

1.5. Estresse oxidativo e sistema antioxidante

O oxigênio molecular (O_2) é essencial para os organismos aeróbicos, sendo indispensável para diversos processos metabólicos como a geração de energia. A redução parcial do oxigênio gera subprodutos que, em baixas concentrações, desempenham funções fisiológicas importantes, como defesa imune, sinalização intercelular, manutenção de processos fisiológicos, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes. Esses subprodutos são chamados de radicais livres (RLs) e foram selecionados evolutivamente para modular processos imunológicos e fisiológicos (Wood et. al., 2003; Kiley e Storz, 2004; Finkel, 2011; Lushchak, 2011; Schieber e Chandel, 2014). Entretanto, o oxigênio é um potente oxidante, que ao ser reduzido parcialmente gera RLs (átomos que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua última camada orbital), que dependendo da sua forma e quantidade podem combinar-se de maneira inespecífica com moléculas e estruturas celulares, como carboidratos, lipídios, proteínas e DNA. Essas reações podem levar a inativação de enzimas e até mesmo causar lipoperoxidação, com sérios prejuízos e até morte celular (Halliwell, 1987; Halliwell e Gutteridge, 2000; Nordberg e Arner, 2001; Valavanidis et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas durante o metabolismo do oxigênio, ocorrendo principalmente na mitocôndria, peroxissomos, citoplasma e na membrana plasmática. A geração contínua das EROs é um processo fisiológico normal da respiração celular, necessário para síntese de ATP, através da redução completa da molécula de oxigênio na membrana mitocondrial. A redução tetravalente do oxigênio, realizada pela enzima citocromo c oxidase no processo de fosforilação oxidativa, produz água. Porém, a redução incompleta do oxigênio gera intermediários reativos e danosos às células (Floyd, 1984; Storey, 1996; Barreiros et. al., 2006).

As principais EROs são: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), dentre outros. A cascata de formação das espécies reativas se inicia com a redução monovalente do O_2 , gerando desta maneira o $O_2^{\cdot-}$. Adicionando-se um segundo elétron, o $O_2^{\cdot-}$ é transformado em peróxido O_2^{2-} , que não é um radical livre, porém sofre protonação e é convertido em H_2O_2 e, em meio aquoso, o $O_2^{\cdot-}$ passa por reação de dismutação espontânea ou catalisada, formando H_2O_2 e O_2 . Na presença de metais de transição, como ferro e cobre, o H_2O_2 pode ser transformado em $OH^{\cdot}$ através da reação de Fenton, ou na presença do $O_2^{\cdot-}$ através da chamada reação de Haber-Weiss (Halliwell e Gutteridge, 1984; Sies, 1986; Apel e Hirt, 2004; Lushchak, 2011).

O $O_2^{\cdot-}$ é o radical livre mais abundante nas células e apresenta moderada reatividade, já que possui baixa capacidade de atravessar membranas celulares. É gerado na fosforilação oxidativa, principalmente nas mitocôndrias e microsossomos do retículo endoplasmático, e sua toxicidade está na capacidade de gerar EROs mais danosas ao organismo, como os radicais hidroxil e peroxil. Apesar do potencial citotóxico do $O_2^{\cdot-}$, o mesmo é de extrema importância na defesa inata do organismo, sendo produzido pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos com finalidade bactericida, o chamado “burst oxidativo” através da ativação da NADPH oxidase presente nas membranas dessas células (Halliwell e Gutteridge, 1986; Boveris, 1998; Diaz et al., 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000).

O $OH^{\cdot}$ é classificado como a EROs mais danosa ao organismo, visto que possui uma meia-vida extremamente curta, reagindo de maneira inespecífica com moléculas biológicas próximas, como carboidratos, lipídios, proteínas e DNA. Além da alta reatividade, o organismo não possui um sistema enzimático de defesa específico contra essa espécie reativa, sendo necessário a neutralização do $O_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 . Esse radical possui baixa capacidade de difusão e alto potencial de lesão, causando a lipoperoxidação e consequente morte celular (Pena et al., 1999; Halliwell e Gutteridge, 2000; Nordberg e Arnér, 2001). Se por um lado, a produção de EROs é um processo natural e contínuo, por outro os organismos desenvolveram, ao longo da sua evolução, mecanismos capazes de neutralizar o excesso desses radicais, evitando, desta maneira, o desbalanço redox e consequente estresse oxidativo (Sies, 1993; Apel e Hirt, 2004; Valavanidis et al., 2006).

O sistema antioxidante é a principal linha de defesa do organismo contra as EROs, possuindo a função de inibir, neutralizar ou retardar a oxidação de moléculas biológicas

pelos radicais livres. Essas substâncias são produzidas naturalmente pelas células ou incorporadas através da dieta, como é o caso de algumas vitaminas e minerais que compõem o grupo de defesa não enzimática (Sies, 1991; Cerutti, 1994; Storey, 1996; Barreiros e David, 2006). Esse sistema pode ser classificado quanto a sua função biológica, sendo dividido em sistema primário e secundário. O sistema primário possui a função de inibir e retardar a geração de EROs, impedindo, dessa forma, a oxidação de moléculas celulares. Já o sistema secundário repara os danos e lesões causadas pelas EROs no DNA e membranas celulares (Abdalla, 1993; Bianchi e Antunes, 1999; Lushchak, 2011).

Além da classificação quanto a sua função, o sistema antioxidante também é dividido em dois grupos conforme a natureza de suas substâncias, sendo classificado como mecanismo antioxidante enzimático e não enzimático (Schlenk et al., 1999; Barbosa, et al., 2010). O sistema enzimático é o primeiro a agir contra as EROs, e é formado por um conjunto de enzimas endógenas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST). Já o sistema não enzimático é formado por substâncias endógenas e exógenas (precisam ser incorporadas na dieta) que irão atuar na supressão de formação, eliminação e desativação das EROs. Essas substâncias podem ser lipossolúveis, como as vitaminas A, E e o selênio, ou hidrossolúveis como o tripeptídeo glutathione (GSH), Cu, Zn, Mn e vitamina C (Kay et al., 1986; Sies, 1991; Storey, 1996; Schlenk et al., 1999).

A SOD é uma família de metaloenzimas que atuam como primeira linha de defesa contra as EROs, possuindo a função de catalisar a dismutação do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 . Essa enzima é de fundamental importância no balanço redox pois evita o acúmulo de espécies reativas menos danosa ($O_2^{\bullet -}$) que, em excesso, se transformam em $OH^{\bullet}$ (espécie reativa mais prejudicial ao organismo). Existem três isoformas conhecidas atualmente e que possuem distribuição celular e metais distintos, sendo a forma citoplasmática que contém um átomo de Zn e um átomo de Cu, a forma mitocondrial formada por quatro subunidades idênticas, cada qual com um átomo de Mn, e a forma extracelular secretada pelos fibroblastos que também utiliza átomos de Zn e Cu como cofatores (Yim et al., 1993; Halliwell e Gutteridge, 2000; Apel e Hirt, 2004).

Seguindo a cascata das reações antioxidantes, a CAT é a enzima responsável por catalisar a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 , evitando que o mesmo reaja com metais

de transição, ou com o $O_2^{\cdot-}$, transformando-se em $OH^{\cdot}$. Essa enzima está localizada em praticamente todos os tipos celulares, porém sua presença é mais evidente nos peroxissomos de eritrócitos (hemeproteína citoplasmática) e nas células do fígado e rins dos animais. A CAT também previne problemas na concentração de O_2 circulante no organismo animal, já que o H_2O_2 em excesso oxida a hemoglobina, evidenciando assim a importância desta enzima na saúde e bem-estar animal. Por possuir alto K_m , dificilmente essa enzima será saturada, porém foi constatado que altas concentrações de $O_2^{\cdot-}$ pode inibir sua atividade (Kono e Fridovich, 1982; Gaetani et al., 1989; Scandalios, 2005).

A GPx é uma enzima citosólica que também é encontrada em diferentes tecidos animais e possui a função de converter a glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSH) utilizando o H_2O_2 como substrato. Além disso, também possui capacidade de degradar outros peróxidos orgânicos e inorgânicos (hidroperóxidos lipídicos produzidos pelas EROs), fornecendo elétrons para que a reação aconteça. No organismo animal, existem dois tipos de GPx, sendo uma selênio-dependente e uma que não depende do selênio (GPx5), sendo essa última capaz de degradar qualquer hidroperóxido orgânico, com exceção do H_2O_2 . Essa enzima é de fundamental importância, pois mantém os níveis fisiológicos de H_2O_2 na célula, já que há pouca quantidade de CAT no citoplasma. A GPx, juntamente com a CAT e a SOD, são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (Grisham, 1992; Willians et al., 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000; Van Der Oost et al., 2003). Por sua vez, a GST (glutathiona s-transferase) possui a função de catalisar reações de conjugação entre GSH e moléculas oxidadas, transformando os compostos tóxicos em uma forma que seja mais facilmente eliminada do organismo (Lushchak e Bagnyukova, 2006).

1.6. Modelo biológico

Na América do Sul, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma das principais espécies de peixe cultivada, com expressiva relevância comercial. Além do apelo econômico, o pacu é um modelo biológico adequado ao estudo do metabolismo de carboidrato em peixes, devido ao seu hábito alimentar e ingestão de grande variedade de alimentos (animais e vegetais). Na estação chuvosa, seus principais alimentos são sementes e frutos, demonstrando grande capacidade de digerir e aproveitar derivados de origem vegetal, ingredientes que são muito utilizados na indústria de ração para peixes (Takahashi et al., 2018; Valladão et al., 2018; Urbinati et al., 2020). Considerado de hábito

frugívoro-onívoro, o pacu pode ser alimentado com altos níveis de fonte não proteica, como os carboidratos, desde que sejam atendidas suas exigências em proteína e energia digestível, 23% e 3.335,0 kcal/kg de ração (Abimorad et al., 2007; Takahashi et al., 2018). Apesar de vários estudos que sugerem a alta capacidade de aproveitamento do carboidrato/glicose pelo pacu, faltam evidências que elucidem mecanismos celulares da utilização da glicose, bem como as consequências da dinâmica deste nutriente em processos fisiológicos de alta demanda energética como o estresse, o sistema imunológico e o sistema antioxidante.

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes relações entre carboidrato e lipídio no desempenho zootécnico, respostas metabólicas, imunológicas, estresse e sistema antioxidante/estresse oxidativo em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a condição de estresse agudo e crônico.

Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio após diferentes condições de estresse.
- Estabelecer o perfil de indicadores metabólicos (triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, glicogênio hepático, índice gorduro-viscerossomático e índice hepatossomático) após alimentação com diferentes relações de carboidrato e lipídio após diferentes condições de estresse.
- Avaliar as respostas de estresse (glicose e cortisol plasmáticos) em juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob diferentes condições de estresse.
- Estudar as respostas imunes inatas (atividade respiratória de leucócitos e concentração sérica de lisozima) em juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob diferentes condições de estresse.
- Avaliar a influência de diferentes relações de carboidrato e lipídio no sistema antioxidante/estresse oxidativo (catalase, superóxido desmutase, glutathione S-transferase, glutathione reduzida, glutathione peroxidase e lipoperoxidação lipídica) em juvenis de pacu sob diferentes condições de estresse

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. *Ars Curandi-Clinica Medica*, Rio de Janeiro, v.26, p.141-164, 1993.
- ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J., URBINATI, E. C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Research*, v.38, p.36–44, 2007.
- ALURU, N., RENAUD, R., LEATHERLAND, J. F., VIJAYAN, M. M. Ah receptor-mediated impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450scc gene attenuation in rainbow trout. *Toxicological Sciences*, v.84, p.260-269, 2005.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology*, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BALDAN, A. P. 2008. Avaliação da tolerância do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a carboidratos. 119p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2008.
- BALM, P. H. M., LAMBERT, J. D. G., BONGA, S. E. W. Corticosteroid Biosynthesis in the Interrenal Cells of the Teleost Fish, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 76, p. 53-62, 1989.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARTON, B. A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. In: IWAMA, G. K., PICKERING, A. D., SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). *Fish stress and health in aquaculture*. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. p. 1-33, 1997.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, n. 42, v. 3, p. 517-525, 2002.

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

BERNIER, N. J., FLIK, G., KLAREN, P. H. M. Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and tryptotrophic axes to the stress response in fishes. *Fish Neuroendocrinology*. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, p.235-311, 2009.

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

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

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

BOSHRA, H.; LI, J., SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 20, p. 239-262, 2006.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina*, v. 58, p. 350-356, 1998.

BOWDEN, T. J., COOK, P., ROMBOUT, J. H. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, v.19, p.413-427, 2005.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, v. 344, p. 862-863, 1994.

CONDE-SIEIRA, M., SOENGAS, J. L., VALENTE, L. M. Potential capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to use carbohydrates: metabolic responses to hypo- and hyperglycaemia. *Aquaculture*, v.438, p.59–67, 2015.

COWEY, C. B., Walton, M. J. Intermediary metabolism. In: Halver J. E (ed), Fish nutrition. Academic Press, San Diego, p 260–329, 1989.

COWEY, C., DE LA HIGUERA, M., ADRON, J. W. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition, v.38, p.385-395, 1977.

CUESTA, A., ESTEBAN, M. A., MESEGUER, J. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.71, p.161-171, 1999.

DALMO, R. A., INGEBRIGTSEN, K., BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases, v.20, p.241-273, 1997.

DIAZ, J., SERRANO, E., ACOSTA, F., CARBONELL, L. F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. Clinical Chemistry, v. 44, p. 2215-2227, 1998.

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

ENES, P., PANSEERAT, S., KAUSHIK, S., OLIVA-TELES, A. Hepatic glucokinase and glucose-6-phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v.149, p.80–86, 2009.

FAO. State of World Fisheries and Aquaculture. 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations: <<http://www.fao.org/publications/sofia/en/>>. Acessado em: 20 de junho de 2020.

FERNANDEZ, F., MIQUEL, A. G., CÓRDOBA, M., VARAS, M., METÓN, I., CASERAS, A., BAANANTE, I. V. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v.343, p.1–10, 2007.

FINDEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, v.194, p.7-15, 2011

FLOYD, R. A. Free radicals in molecular biology, aging and disease. New York, Raven Pr, p. 1- 416, 1984.

GAETANI, G. F., GALIANO, S., CANEPA, L., FERRARIS, A. M., KIRKMAN, H. N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, v. 73, p. 334- 339, 1989.

GALLANT, D. J, BOUCHET, B., BULÉON, A., PÉREZ, S. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 46, p. 3-16, 1992.

GATESOUE, F. J., HUELVAN, C., LE BAYON, N., SÉVÈRE, A., AASEN, I. M., DEGNE, K. F., MAZURAS, D., PANSEERAT, S., ZAMBONINO-INFANTE, J. L., KAUSHIK, S. J. The effect of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbiota in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v. 422, p. 47-53, 2014.

GOMINHO-ROSA, M. C., RODRIGUES, A. P. O., MATTIONI, B., DE FRANCISCO, A., MORAES, G., FRACALOSI, D. M. Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: digestibility, enzyme activity and starch microstructure. *Aquaculture*, v.435, p.92–99, 2015.

GRIFFIN, B. R. Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes - Activation by antibody, complement, and normal serum components. *Developmental and Comparative Immunology*, v.8, p.589-597, 1984.

GRINDE, B., LIE, O., POPPE, T., SALTE, R. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* v. 68, p. 299-304, 1988.

GRISHAM, M. B. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. In AUSTIN, R. G., Landes, p. 4-22, 1992.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. The FASEB Journal, v.1, p. 358-364, 1987.

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

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemistry Journal, 219, 14, 1984.

HERNÁNDEZ, A., TORT, L. Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Fish and Shellfish Immunology, v. 15 p. 479-481, 2003.

HILTON, J. W., PLISETSKAYA, E. M., LEATHERLAND, J. F. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish Physiology and Biochemistry, v. 4, p. 113-120, 1987.

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

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=784>>. Acesso em: 8 de Abril. 2020.

IDLER, D. R., TRUSCOTT, B. 1-alpha-hydroxycorticosterone: synthesis in vitro and properties of an interrenal steroid in the blood of cartilaginous fish (*Genus raja*). Steroids v. 9, p. 457-477, 1967.

JOBLING, M. Fish bioenergetics. Chapman and Hall, London, 1994.

KAMALAM, B. S., MEDALE, F., PANSERAT, S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. Aquaculture. v. 467, p. 3-27, 2017.

KANTARI, C., PEDERZOLI-RIBEIL, M., WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contributions to microbiology*, v.15, p.118-146, 2008.

KAUSHIK, S. Carbohydrate nutrition: importance and limits of carbohydrate supplies. In: GUILLAUME, J., KAUSHIK, S., BERGOT, P., METAILLER, R. (Eds.), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Praxis Publishing, Chichester, p. 131–144, 2001.

KAY, M. M. B., BOSMAN, G. J. C. G. M., SHAPIRO, S. S., BENDICH, A., BASSEL, P. S. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.83, p.2463-2467, 1986.

KILEY, P. J., STORZ, G. Exploiting thiol modifications. *PLOS Biology*. v. 11, p. 391-400. 2004.

KINDT, T., OSBORNE, B., GOLDSBY, R. *Kuby - Immunology*. W. H. Freeman, 6^a Ed. p. 944, 2006.

KONO, Y., FRIDOVICH, I. Superoxide radicals inhibit catalase. *Journal of biological chemistry*, v. 257, p. 5751-5754, 1982.

KRASNOV, A., PITKÄNEN, T. I., REINISALO, M., MÖLSÄ, H. Expression of human glucose transporter type 1 and rat hexokinase type II cDNAs in rainbow trout embryos; effects on glucose metabolism. *Marine Biotechnology*, v. 1, p. 25-32, 1999.

LIN, S. M., SHI, C. M., MU, M. M., CHEN, Y. J., LUO, L. Effect of high dietary starch levels on growth, hepatic glucose metabolism, oxidative status and immune response of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 78, p. 121-126, 2018.

LUSHCHAK V. I., BAGNYUKOVA T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 144, p. 283 – 289, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v. 101, p. 13-30, 2011.

MANNING, M. J. Fishes. In: TURNER, L. (Ed.), Immunology. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100, 1994.

MELO, W. J, BERTIPAGLIA, L. M. A., MELO, G. M. P., MELO, V. P. Carboidratos. Jaboticabal, Ed. Funep, p. 213, 1998

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

NAKAO, M., TSUJIKURA, M., ICHIKI, S., VO, T. K., SOMAMOTO, T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. Developmental and Comparative Immunology, v. 35, n. 12, p. 1296-1308, 2011.

NORDBERG, J., ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology and Medicine, v.31, p. 1287- 1312, 2001.

NRC. Carbohydrates and Fibre, in: Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington DC, p. 135–162, 2011.

PALAKSHA, K. J., SHIN, G. W., KIM, Y. R., JUNG, T. S. Evaluation of nonspecific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, v.24, p.479-488, 2008.

PEIXE BR. Anuário 2020 Peixe BR da Piscicultura. Associação Brasileira da Piscicultura. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/> >. Acessado em: 8 de Abril. 2020.

PENA, M. M. O.; LEE, J.; THIELE, D. J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. Journal of Nutrition, 129, 7, 1251-1260, 1999.

PETER, M. C. S. The role of thyroid hormones in stress response of fish. General and Comparative Endocrinology, v. 171, p. 198-210, 2011.

PLANAS, J. V., CAPILLA, E., GUTIÉRREZ, J. Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. FEBS Letters, v. 481, p. 266-270, 2000.

POLAKOF, S., PANSERAT, S., SOENGAS, J. L., MOON, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B.* v.182, p.1015–1045, 2012.

RAUTA, P. R., NAYAK, B., DAS, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology Letters*, v. 148, p. 23-33, 2012.

RAWLES, S., LOCHMANN, R. Effects of amylopectin/amylose starch ratio on growth, body composition and glycemic response of sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 34, p. 278-288, 2003.

RAWLES, S., SMITH, S., GATLIN, D. Hepatic glucose utilization and lipogenesis of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) in response to dietary carbohydrate level and complexity. *Aquaculture Nutrition*, v. 14, p. 40-50, 2008.

REID, S. G., VIJAYAN, M. M., PERRY, S. F. Modulation catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Comparative Physiology B.*, v.165, p. 665-676, 1996.

REID, S.G., BERNIER, N.S., PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 120, p. 1-27, 1998.

REN, M., AI, Q., MAI, K., MA, H., WANG, X. Effect of dietary carbohydrate level on growth performance, body composition, apparent digestibility coefficient and digestive enzyme activities of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. *Aquatics Research*, v. 42, p. 1467-1475, 2011.

RUSSELL, P. M., DAVIES, S. J., GOUVEIA, A., TEKINAY, A. A. Influence of dietary starch source on liver morphology in juvenile cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Aquatics Research*, v. 32, p. 306-316, 2001.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant genes defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHIEBER, M., CHANDEL, N.S. ROS Function in Redox Signaling and Review. Oxidative Stress. Current Biology, v. 24, p. 453-462, 2014.

SCHLENK, D., DAVIS, K. B., GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. Aquaculture, v. 177, p. 367-379, 1999.

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

SECOMBES, C. J., FLETCHER, T. C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annual Review of Fish Diseases Journal, v.2, p.53-71, 1992.

SECOMBES, C.J., WANG, T. The innate and adaptive immune system of fish. In: Infectious disease. In: Aquaculture Prevention and Control, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p.3-68, 2012.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. Angewandte Chemie, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

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

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. European Journal of Biochemistry, v. 215, p. 213- 219, 1993.

STONE, D. A. J. Dietary carbohydrate utilization by fish. Reviews in Fisheries Sciences, v. 11, p. 337–370, 2003.

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

SUAREZ, R. K., MOMMSEN, T. P. Gluconeogenesis in teleost fishes. Canadian Journal of Zoology, v. 65, p. 1869-1882, 1987.

SUMPTER, J. P. The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). Fish stress and health in aquaculture, 1997.

SUZUKI, K. A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, v.50, p. 1305-1315, 1984.

TAKAHASHI, L. S., HA, N., PEREIRA, M. P., BILLER-TAKAHASHI, J. D., URBINATI, E. C. Carbohydrate tolerance in the fruit-eating fish *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Aquaculture Research, v. 49, p. 1182-1188, 2018.

TORROBA, M., ZAPATA, A. G. Aging of the vertebrate immune system. Microscopy Research Technology, v. 62, p. 477-481, 2003.

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

TRUSCOTT, B., IDLER, D. R. Corticosteroids in plasma of elasmobranchs. Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology, v.42, p.41-50, 1972.

URBINATI, E. C., ZANUZZO, F. S., BILLER-TAKAHASHI, J. D. Estresse e sistema imune em peixes. Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce. Funep, Jaboticabal. p. 87-105, 2014.

URBINATI, E. C., ZANUZZO, F. S., BILLER-TAKAHASHI, J. D. Stress and imune system in fish. Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish. Ed., Elsevier, Academic Press. Amsterdam. p. 93-114, 2020.

VALAVANIDIS, A, VLAHOIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, p. 178-189, 2006.

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

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 13, p. 57-149. 2003.

WALTERS, G. R., PLUMB, J. A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. Journal of Fish Biology, v. 17, p. 177-185, 1980.

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

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

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. Physiological Reviews, v.77, p. 591-625, 1997.

WILLIAMS, K., FRAYNE, J., HALL, L. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. Molecular Human Reproduction, v. 4, p. 841-848, 1998.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. Aquaculture, v.124, p.67- 80, 1994.

WOOD, Z. A., POOLE, L. B., KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science v. 300, p. 650-653. 2003.

WRIGHT, JR., O'HALLI, W., YANG, H., BONEN, A. GLUT-4 deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. General and Comparative Endocrinology, v. 111, p. 20-27, 1998.

WU, C. L., YE, J. Y., GAO, J. E., CHEN, L., LU, Z. B. The effects of dietary carbohydrate on the growth, antioxidant capacities, innate immune response and pathogen resistance of juvenile Black carp *Mylopharyngodon piceus*. Fish and Shellfish Immunology, v. 49, p. 132-142, 2016.

YE, H., LIN, Q., LUO, H. Applications of transcriptomics and proteomics in understanding fish immunity. Fish and Shellfish Immunology, v. 26, p. 140-145, 2018.

YIM, M., CHOCK, P., STADTMAN, E. Enzyme function of cooper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. The Journal of Biological Chemistry, v. 268, p. 4099-4105, 1993.

ZACCONE, G., MESEGUER, J., GARCÍA-AYALA, A., KAPOOR, B. G. Fish Defenses. 234 May Streem, Enfield, New Hampshire, United States of America: Science Publishers, 2009.

ZANUZZO, F. S. Ação moduladora do cortisol e da Aloe vera no sistema imune inato de peixes. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p. 135. 2014.

ZHOU, C., GE, X., NIU, J., LIN, H., HUANG, Z., TAN, X. Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. Aquaculture, v. 437, p. 390-397, 2015.

ZHOU, L.Y., WANG, D. S., KOBAYASHI, T., YANO, A., PAUL-PRASANTH, B., SUZUKI, A., SAKAI, F., NAGAHAMA, Y. A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney. Endocrinology, v.148, p.42824291, 2007.

CAPÍTULO II

Desempenho zootécnico e respostas fisiológicas em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio submetidos ao estresse de manejo

RESUMO

O presente estudo investigou o efeito da relação de CHO:LIP no desempenho zootécnico, respostas metabólicas, de estresse e imunológicas em juvenis de pacu expostos a dois estressores comuns na aquicultura, estresse agudo (exposição aérea) e estresse crônico (perseguição diária com puçá por 21 dias). Foram avaliados indicadores de estresse (cortisol e glicose plasmáticos), indicadores metabólicos (triglicerídeos, colesterol, proteína total, glicogênio hepático e índices hepatossomático e gorduro-viscerossomático) e indicadores do sistema imune inato (atividade respiratória de leucócitos e concentrações séricas de lisozima). Os peixes foram alimentados durante 21 dias com três dietas experimentais: CHO_{25,6}:LIP₁₁ (2,33), CHO_{35,4}:LIP_{9,4} (3,77) e CHO₄₅:LIP₆ (7,50), sendo um grupo sem manejo estressor e outro exposto a manejo diário. Ao final do período, os dois grupos passaram por um estressor agudo (exposição aérea de 4 min) e amostrados antes do manejo (basal), 1, 3 e 24 horas depois. A glicose plasmática foi modulada pela relação CHO:LIP, apresentando os maiores níveis nas dietas 3,77 e 7,50, sendo os maiores níveis observados no grupo exposto ao estressor agudo (1, 3 e 24 horas). Os triglicerídeos plasmáticos reduziram às 24 horas nas dietas 3,77 e 7,50; e a dieta 2,33 teve a maior concentração quando comparada com as dietas 3,77 e 7,50. As dietas contendo maiores relação de CHO:LIP apresentaram maiores valores de glicogênio hepático e do IHS. A condição de estresse crônico impactou de forma negativa a concentração de lisozima sérica durante o período experimental. Concluindo, a dieta 7,50 promoveu o melhor desempenho, e as diferentes relações de CHO:LIP não afetaram a resposta de estresse e nem as respostas imunológicas após alimentação durante 21 dias. O estresse crônico prejudicou o desempenho e a capacidade de resposta do sistema imune inato. Este estudo indica que o pacu foi capaz de preservar as respostas de estresse e imunes mesmo quando recebeu baixas quantidades de carboidratos, provavelmente por utilizar o lipídio como fonte de energia. O esforço

metabólico dos peixes priorizou o atendimento das respostas de estresse e imunológicas, mas não sustentou as de crescimento, haja visto o prejuízo no desempenho produtivo.

Palavras-chave: aquicultura, nutrição, respostas fisiológicas *Piaractus mesopotamicus*

ABSTRACT

The present study assessed the effect of the CHO:LIP ratio on growth performance, and metabolic, stress and immunological biomarkers in juvenile pacu exposed to two common stressors in aquaculture, acute stress (air exposure) and chronic stress (daily chasing with net for 21 days). Stress (plasma cortisol and glucose), metabolic (triglycerides, cholesterol, total protein, hepatic glycogen and hepatosomatic and viscerosomatic indices) and innate immune system (respiratory activity of leukocytes and serum concentrations of lysozyme) biomarkers were evaluated. Fish were fed for 21 days with three diets: CHO25.6:LIP11 (2.33), CHO35.4:LIP9.4 (3.77) and CHO45:LIP6 (7.50), being an unhandled group and another exposed to daily chasing. At the end of the period, both groups were exposed to an acute stressor (4 min air exposure) and sampled before exposure (baseline), 1, 3 and 24 hours later. Plasma glucose was modulated by the CHO:LIP ratio, showing the highest levels in diets 3.77 and 7.50, with the highest levels observed in the group acutely stressed (1, 3 and 24 hours). Plasma triglyceride reduced at 24 hours in fish fed with diets 3.77 and 7.50; fish from diet 2.33 had the highest concentration when compared to diets 3.77 and 7.50. Fish from diets containing higher CHO:LIP ratio had higher liver glycogen and HSI values. The chronic handling negatively impacted the serum lysozyme concentration. In conclusion, the 7.50 diet promoted the best growth performance, and the different CHO:LIP ratios did not affect the stress or immune responses after feeding for 21 days. Chronic stress impaired the growth performance and responsiveness of the innate immune system. This study indicates that pacu was able to preserve stress and immune responses even when it was fed with low levels of carbohydrates, probably because it used lipid as an energy source. The metabolic effort of fish prioritized the stress and immune responses, but they did not support the growth.

Keywords: aquaculture, nutrition, physiology responses, *Piaractus mesopotamicus*

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por ingredientes para formulação de rações para peixes, com o crescimento da aquicultura, gerou um impacto negativo nos estoques pesqueiros, especialmente para produção de farinha e óleo de peixe (FAO, 2018). Diante do potencial uso de fontes vegetais, os carboidratos vêm sendo explorados como fonte energética em substituição a proteína, porém a capacidade de utilização deste nutriente pelos peixes deve ser considerada, pois varia entre as espécies, idade, fatores ambientais, sazonalidade, fonte e processamento do carboidrato (Wilson, 1994; Takahashi et al., 2006; Kamalam et al., 2017). Sua adequada inclusão favorece a retenção de proteína, prevenindo o catabolismo deste oneroso nutriente, além de reduzir os impactos ambientais gerados através da excreção de compostos nitrogenados e favorecer a formulação de dietas balanceadas de baixo custo e com melhores características físicas (Honorato et al., 2010; Kamalam et al., 2017).

Os estudos sobre a influência do estresse na produção aquícola têm mostrado um impacto negativo significativo, especialmente pelo prejuízo no sistema imunológico (Schreck, 2010; Schreck e Tort, 2016; Herrera et al., 2019). O sistema imune dos peixes é modulado por processos fisiológicos que são energeticamente caros para os animais, como produção e manutenção de células de defesa que combatem patógenos, bem como o aumento da síntese de componentes humorais e proteínas do sistema imune inato e adquirido (Derting e Compton, 2003; Magnadottir, 2006). Buscar alternativas preventivas que fortaleçam a saúde dos peixes é um caminho a ser seguido, como por exemplo, atender suas exigências nutricionais como forma de prepará-los para desafios estressores (Hooley et al., 2014; Herrera et al., 2019). A deficiência dietética resulta em perda da homeostase (estresse metabólico) afetando a saúde e bem-estar dos peixes, e especialmente a capacidade de enfrentar desafios ambientais e biológicos como doenças bacterianas, fúngicas e virais. Desta forma, é essencial desenvolver dietas equilibradas que atendam às exigências nutricionais e que sejam economicamente viáveis (Gatlin et al., 2007; Damusaru et al., 2019; Sousa et al., 2020). Nesse sentido, os carboidratos são excelentes fontes energéticas, embora algumas espécies de peixes possuam limitada capacidade de aproveitamento deste nutriente (Kamalam et al., 2017). O lipídio, importante fonte energética, é o nutriente normalmente utilizado para balancear a inclusão do carboidrato. Até o momento, a maioria dos estudos envolvendo os efeitos dos

carboidratos e lipídios tem como foco composição corporal, desempenho zootécnico e utilização destes nutrientes pelos peixes (Li et al., 2016).

O peixe alvo deste estudo é o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), um dos principais peixes cultivados na América do Sul (Valladão et al., 2018), que possui hábito alimentar onívoro/frutívoro e alta capacidade de aproveitar fontes não proteicas para geração de energia, poupando desta maneira a proteína para crescimento muscular, desde que sejam atendidas suas exigências em proteína e energia digestível (Abimorad et al., 2007; Takahashi et al., 2018; Embrapa, 2019). O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho zootécnico, respostas metabólicas, de estresse e imunológicas em juvenis de pacus alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob duas condições de estresse comuns na piscicultura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo 010281/19) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal – SP, sendo realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1. Animais experimentais e protocolo experimental

Um total de 240 juvenis de pacu com peso inicial de $52,77 \pm 7,7$ g, fornecido pelo Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), foi aleatoriamente distribuído em 24 caixas circulares de polietileno com volume de 1.000 L (10 peixes por caixa), em um sistema de recirculação de água com aeração constante. Durante o período experimental, foram monitorados temperatura ($27,5 \pm 1$ °C), oxigênio dissolvido ($6,5 \pm 0,3$ mg L⁻¹) e pH ($7,13 \pm 0,01$), sendo o fotoperíodo de 12 horas. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente duas vezes ao dia (8 e 16 h) com ração comercial (28 % de PB e 3.600 kcal EB kg⁻¹) e aclimatados ao sistema durante uma semana antes do início do experimento.

Após aclimação, os peixes foram alimentados durante 21 dias com três dietas experimentais contendo diferentes relações de carboidrato e lipídio. As dietas 1 (CHO_{25,6}:LIP₁₁), 2 (CHO_{35,4}:LIP_{9,4}) e 3 (CHO₄₅:LIP₆) apresentaram a seguinte proporção de carboidrato e lipídio: 2,33; 3,77; e 7,50, respectivamente.

No grupo estresse agudo, os peixes foram submetidos à exposição aérea (durante quatro minutos) somente ao final do experimento. Já no grupo de estresse crônico, os peixes foram submetidos ao manejo diário de perseguição com puçá (por quatro minutos), duas vezes ao dia (2 horas após alimentação), durante os 21 dias de experimento. Ao final desse período, foram amostrados dois peixes por caixa para caracterizar a coleta basal (n=8), e então os peixes de todas as 24 caixas passaram pelo manejo de exposição aérea, sendo amostrados 1, 3 e 24 horas após (n = 8 por coleta por tratamento). Foram avaliados indicadores metabólicos (glicose e triglicerídeos plasmáticos, níveis séricos de colesterol e proteína total sanguínea, glicogênio hepático, índice hepatossomático e índice gorduro-viscerossomático), de estresse (cortisol e glicose plasmáticos) e do sistema imune inato (atividade respiratória de leucócitos e concentração sérica de lisozima). A glicose plasmática foi utilizada como indicador metabólico e de estresse, já que sua resposta está relacionada com ambas condições fisiológicas.

2.2. Amostragens

Após 24 em jejum, os peixes foram anestesiados com MS-222 (0,1 g L⁻¹) e amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal, com seringas sem anticoagulantes. O sangue foi aliquoteado em microtubos contendo heparina, microtubos contendo Glistab® (EDTA 6 g/dL e KF 12 g/dL, Labtest Ref. 29 / 29E) e tubos de vidro sem anticoagulante (soro). Para obtenção de plasma, os microtubos contendo anticoagulantes foram centrifugados (3.000 rpm/10 min. a 4 ° C), sendo os microtubos contendo Glistab® utilizados para quantificação da glicose e triglicerídeo plasmático. O plasma restante foi armazenado a -20 ° C para dosagem de cortisol.

Para obtenção do soro, as amostras de sangue foram mantidas em ambiente refrigerado durante três horas e, em seguida, centrifugadas (3.000 rpm/10 min. a 4 ° C), sendo o soro utilizado para determinação concentração de proteínas totais e o restante

armazenado a -20°C para análise das concentrações do colesterol e lisozima. As amostras de sangue total com heparina foram utilizadas para mensuração da atividade respiratória de leucócitos.

Após a coleta de sangue, os animais foram pesados e eutanasiados por secção da medula espinhal para remoção do fígado e gordura mesentérica. O fígado foi pesado para cálculo do índice hepatossomático (IHS) e armazenado a -20°C para determinação do glicogênio hepático. A gordura mesentérica foi pesada para cálculo do índice gorduro-viscerossomático (IGVS).

2.3. Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas com base em valores tabelados de digestibilidade dos ingredientes utilizados e de acordo com as exigências da espécie (Rostagno et al., 2017; Abimorad et al., 2007), alterando-se apenas a relação entre carboidratos e lipídios. Os ingredientes e a composição centesimal das dietas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmula e composição centesimal das dietas experimentais:

<i>Ingredientes</i>	Dietas		
	CHO _{25,6} :LIP ₁₁ D1	CHO _{35,4} :LIP _{9,4} D2	CHO ₄₅ :LIP ₆ D3
Farelo de soja ^a	33,0	34,5	37,0
Farinha de peixe ^b	16,0	16,0	16,0
Sêmola grits ^c	1,0	1,0	1,0
Farelo de trigo ^d	2,0	5,0	7,0
Farelo de arroz ^e	24,6	13,5	0,0
Amido de milho ^f	1,0	16,1	32,1
Óleo de soja ^g	5,5	5,4	3,9
Fosfato bicálcico (foscálcio) ^h	2,5	2,5	2,5
Premix fish ⁱ	0,5	0,5	0,5
Celulose microcristalina ^j	8,0	3,0	0,0
Vitamina C ^k	0,015	0,015	0,015
Caolin ^l	5,9	2,5	0,0
Total	100,00	100,0	100,0

Composição Centesimal Estimada

Matéria seca %	91,1	90,4	89,7
Proteína bruta %	27,7	27,4	27,1
Proteína digestível %	23,7	23,6	23,4
Lipídio %	11,0	9,4	6,0
Fibra bruta %	10,0	5,5	2,4
Matéria mineral %	10,7	9,9	9,0
Extrato não nitrogenado %	25,6	35,4	45,0
Energia bruta kcal/kg	3.795	4.042	4.082
Energia digestível kcal/kg	3.046	3.108	2.954
Cálcio %	1,67	1,66	1,66
Fósforo %	1,07	1,04	1,01
Carboidrato/Lipídio	2,33	3,77	7,50

a, b, d, e, i, k e l = Agromix, Jaboticabal – SP; *c, h e j* = Rhoster, Araçoiaba da Serra – SP; *f* = Siamar, Neves Paulista – SP e *g* = Óleo leve, Araucária – PR.

Para a preparação das dietas, os ingredientes foram pesados, homogeneizados e peletizados em máquina de moer carne. Em seguida os peletes foram secos em estufa de ventilação forçada a 55 ° C durante 24 horas e as rações estocadas a -20 ° C até o uso. As dietas experimentais foram fornecidas duas vezes ao dia, às 8 e 16 horas até a saciedade aparente e sua quantidade anotada para posteriores análises de consumo e desempenho zootécnico.

2.4. Análises

2.4.1. Concentrações plasmáticas de glicose e cortisol

A concentração de glicose foi determinada com kit Labtest (Glicose Liquiform, São Paulo, Brasil, ref. 133) e do cortisol com kit DRG / Cortisol Elisa – Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Ref. EIA 1887, Springfield, Estados Unidos).

2.4.2. Concentrações sanguíneas de biomarcadores metabólicos

A concentração plasmática de triglicerídeos foi determinada com kit Labtest (Triglicérides Liquiform, São Paulo, Brasil, ref. 87) e as concentrações séricas do colesterol e proteínas totais com kits Labtest (Colesterol Liquiform e Proteínas Totais, ref. 76 e 99, respectivamente). A concentração de glicogênio hepático foi determinada de acordo com Perry et al. (1988) e os índices morfo-somáticos através da seguinte fórmula: $IHS = (\text{peso do fígado/peso do peixe}) * 100$ e $IGVS = (\text{peso da gordura mesentérica/peso do peixe}) * 100$, sendo o valor expresso em %.

2.4.3. Análises imunológicas

A atividade respiratória dos leucócitos foi mensurada de acordo com Anderson e Siwicki (1995), modificado para o pacu (Biller-Takahashi et al., 2013), com base na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas pelo “burst oxidativo” das células fagocíticas, quando ocorre a redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) e se formam precipitados de material insolúvel com coloração azul-escuro presentes no interior dos fagócitos, os grânulos de formazan (Klein, 1990). Uma alíquota de 50 µL de sangue total (heparina) foi incubada com 50 µL de NBT (Sigma-Aldrich – Ref. N6639 -1G, St Louis, MO, USA) a temperatura ambiente, por 30 minutos (no escuro). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e 50 µL dessa mistura foram transferidos para tubos de ensaio e, então, adicionado 1 mL de dimetilformamida (DMF – Sigma - 227056). Os tubos foram centrifugados a 2080 rpm, por cinco minutos, e a leitura da densidade ótica determinada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV –Vis), a 540 nm.

A concentração sérica de lisozima foi determinada de acordo com metodologia de Smolelis e Hartsell (1949), modificada para pacu por Zanuzzo et al. (2015), que consiste na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (SigmaAldrich, Ref. M3770 - 25G, St Louis, MO, USA) usando a lisozima da clara de ovo de galinha como padrão (Sigma-Aldrich, Ref. 62970 – 1G). Foram utilizados 25 µL de soro (duplicata) em microplacas de acrílico de fundo chato (96 poços), em seguida adicionados 75 µL de tampão fosfato de sódio e por último adicionados 100 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*. A concentração/atividade foi medida com base na redução da absorbância a cada 5 minutos, durante 10 minutos (inicial, 5 e 10 minutos), sendo a leitura realizada

em um leitor de microplaca (Labsystem; Multiskan ascent) no comprimento de onda de 450 nm. A redução da absorbância de cada amostra foi comparada com a curva padrão e a concentração de lisozima expressa em $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

2.4.4. Desempenho zootécnico

Os peixes foram pesados no início e ao final do experimento, e a quantidade de ração consumida e a mortalidade foram anotadas durante o período experimental. Foram avaliados peso final, ganho médio de peso, taxa de conversão alimentar, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica de acordo com as equações a seguir:

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ peixes inicial} - N^{\circ} \text{ peixes mortos}}{N^{\circ} \text{ peixes final}} \times 100$$

$$\text{Ganho médio de peso (g)} = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$$

$$\text{Conversão alimentar} = \frac{\text{Consumo de ração}}{\text{Ganho de peso}}$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (\%)} = \frac{\text{Ganho de peso médio}}{\text{Tempo (dias)}} \times 100$$

$$\text{Eficiência proteica} = \frac{\text{Ganho de peso médio}}{\text{Proteína bruta consumida}}$$

2.4.5. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando as funções *lme* e *anova* do pacote *nlme* (Pinheiro et al., 2020) do software R (R Core Team, 2020). Delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 (relação de carboidrato e lipídio) x 2 (condições de estresse), para variável peso [Eq. 1], e esquema fatorial 3 (relação de carboidrato e lipídio) x 4 (horários de coleta, i.e. efeito longitudinal) x 2 (condições de estresse), para as demais variáveis [Eq. 2], foram utilizados, conforme modelos a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + E_j + (AE)_{ij} + e_{ijk} \quad [1]$$

onde Y_{ijk} é a variável dependente, μ é a média geral, A_i é o efeito fixo de nível de inclusão de aa dietético, E_j é o efeito fixo da condição de estresse, $(AE)_{ij}$ é a interação entre A_i e E_j , e $e_{ijk} \sim \text{iidN}(0, \sigma_e^2)$ é o efeito aleatório de erro residual.

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + E_j + b_{ij:k} + C_l + (AE)_{ij} + (AC)_{il} + (EC)_{jl} + (AEC)_{ijl} + e_{ijkl} \quad [2]$$

onde Y_{ijkl} é a variável dependente, μ é a média geral, A_i é o efeito fixo de nível de inclusão de aa dietético, E_j é o efeito fixo da condição de estresse, $b_{ij:k} \sim \text{iid} N(0, \sigma_b^2)$ é o efeito aleatório da k-ésima caixa dentro da interação $(AE)_{ij}$, C_l é o efeito fixo de horário de coleta, $(AE)_{ij}$ é a interação entre A_i e E_j , $(AC)_{il}$ é a interação entre A_i e C_l , $(EC)_{jl}$ é a interação entre E_j e C_l , $(AEC)_{ijl}$ é a interação entre A_i , E_j , C_l , e e_{ijkl} é o efeito aleatório de erro residual $e_{ijk} \sim N(0, R)$, onde R é estrutura de correlação de e_{ijk} . Foram avaliadas as R geral (σ_e^2), simétrica composta, autorregressiva de ordem 1 e autorregressiva de ordem 1 heterogênea. O critério de informação de Akaike, corrigido para pequenas amostras (Sugiura, 1978), foi utilizado para escolha da melhor R .

As médias foram comparadas por meio de comparações múltiplas utilizando ajuste de multiplicidade de Tukey, disponível na função *emmeans* do pacote *emmeans* (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). Para os efeitos de níveis de inclusão de aa dietético e horários de coletas as médias foram ainda comparadas utilizando contrastes por meio de polinômios ortogonais, disponível nas funções *emmeans* e *contrast* do pacote *emmeans* (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). P-valor menor do que 0.05 foi considerado como significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Desempenho zootécnico

De acordo com as Tabelas 2 e 3, os parâmetros peso final (PF), ganho médio de peso (GP), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE) e eficiência proteica (EP) diferiram entre as dietas e a condição de estresse. Entre as dietas testadas o melhor resultado para desempenho zootécnico foi obtido com a dieta CHO:LIP 7,50, e entre as condições de estresse os melhores resultados foram para o grupo estresse agudo.

Na tabela 2 são apresentados os resultados para os parâmetros zootécnicos avaliados considerando somente as dietas, independente da condição de estresse. Já na

tabela 3 são avaliadas as dietas dentro de cada condição de estresse, grupo estresse agudo (exposição aérea) e crônico (perseguição diária com puçá).

Tabela 2. Valores médios de parâmetros zootécnicos para juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio, durante 21 dias, agrupando as duas condições de manejo.

Parâmetros zootécnicos	Dietas		
	CHO _{25,6} :LIP ₁₁ D1	CHO _{35,4} :LIP _{9,4} D2	CHO ₄₅ :LIP ₆ D3
Peso final (g)	75,50 b	81,30 a	82,10 a
GP (g)	22,80 c	27,60 b	29,01 a
C.A	1,62 b	1,38 a	1,34 a
T.C.E (%)	1,90 c	2,18 b	2,31 a
E.P	2,29 c	2,73 b	2,90 a
Sobrevivência (%)	100	100	100

PF = peso final, GP = ganho médio de peso, C.A = conversão alimentar, T.C.E = taxa de crescimento específico, E.P = eficiência proteica. Letras minúsculas indicam diferenças entre as dietas (Tukey; $p < 0,05$).

Tabela 3. Valores médios de parâmetros zootécnicos para juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob duas condições de estresse durante três semanas.

Parâmetros zootécnicos <i>Estresse agudo</i>	Dietas		
	CHO _{25,6} :LIP ₁₁ D1	CHO _{35,4} :LIP _{9,4} D2	CHO ₄₅ :LIP ₆ D3
Peso final (g)	79,80 bA	88,10 aA	88,50 aA
GP (g)	28,00 bA	34,44 aA	36,44 aA
C.A	1,36 cA	1,14 bA	1,05 aA
T.C.E (%)	2,27 bA	2,62 aA	2,82 aA
E.P	2,67 cA	3,20 bA	3,51 aA
Sobrevivência (%)	100	100	100

Estresse crônico

Peso final (g)	71,10 bB	74,50 aB	75,50 aB
GP (g)	17,64 bB	20,72 aB	21,72 aB
C.A	1,89 bB	1,62 aB	1,62 aB
T.C.E (%)	1,52 bB	1,73 abB	1,79 aB
E.P	1,91 bB	2,26 aB	2,30 aB
Sobrevivência (%)	100	100	100

PF = peso final, GP = ganho médio de peso, C.A = conversão alimentar, T.C.E = taxa de crescimento específico, E.P = eficiência proteica. Letras minúsculas indicam diferenças entre as dietas dentro de cada condição de estresse e letras maiúsculas indicam diferenças entre a condição de estresse (Tukey; $p < 0,05$).

3.2. Indicadores de estresse

As concentrações plasmáticas de cortisol não diferiram em relação aos fatores testados (tratamentos, tempos de coleta e condição de estresse) (Fig. 2A). As concentrações de glicose diferiram entre as dietas, sendo o menor valor observado na CHO:LIP 2,33, não havendo diferença entre as dietas CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50. Em relação à interação entre aos tempos de coleta e condição de estresse, os maiores níveis de glicose foram observados 1 e 3 horas após exposição aérea (estresse agudo), retornando aos valores basais após 24 horas. Os peixes do estresse agudo apresentaram concentrações mais elevadas 1, 3 e 24 horas após a exposição aérea quando comparados com os peixes do grupo estresse crônico.

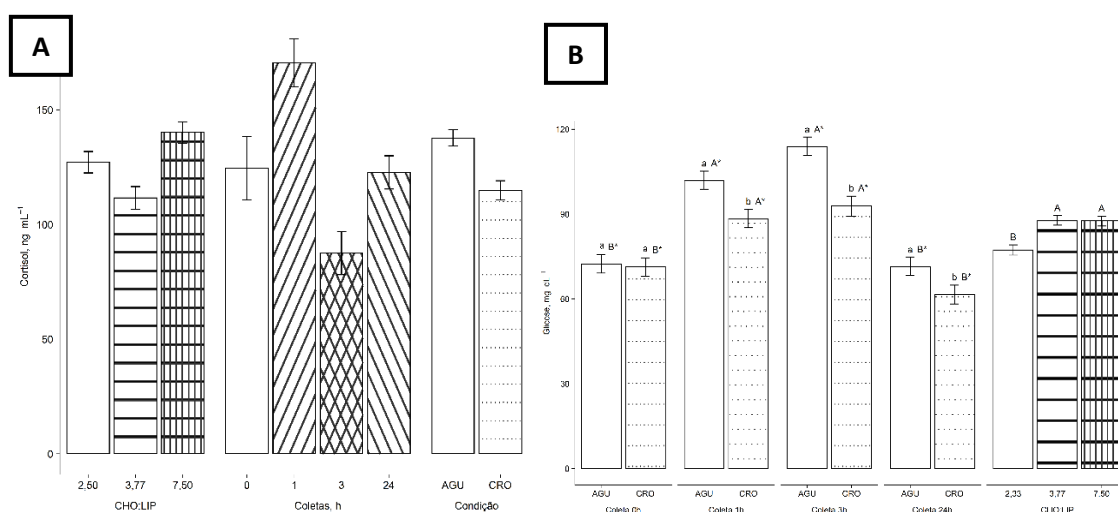


Fig. 2. Concentrações plasmáticas de cortisol **(A)** e glicose **(B)** de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sobre duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta: 0 (basal), 1, 3 e 24 horas após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferenças entre as dietas, letras maiúsculas com * indicam diferenças entre os tempos de coleta, e letras minúsculas indicam diferenças entre a condição de estresse dentro de cada tempo de coleta (Tukey; $p < 0,05$).

3.3. Indicadores metabólicos

3.3.1. Indicadores sanguíneos

Os níveis plasmáticos de triglicerídeos (Fig. 3) foram modulados pelos fatores avaliados, havendo interação entre tempos de coleta e as dietas. Os níveis observados seguiram o mesmo comportamento em ambas as condições de estresse. Somente houve diferença entre as dietas no tempo 24 horas, quando os peixes do tratamento CHO:LIP 2,33 apresentaram concentrações mais elevadas quando comparado com os das dietas CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50. Os peixes das dietas CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50 apresentaram redução às 24 horas após estresse agudo, já os da dieta CHO:LIP 2,33 apresentaram aumento entre 1 e 3 horas seguida de redução às 24 horas. Não houve diferença entre as condições de estresse isoladamente.

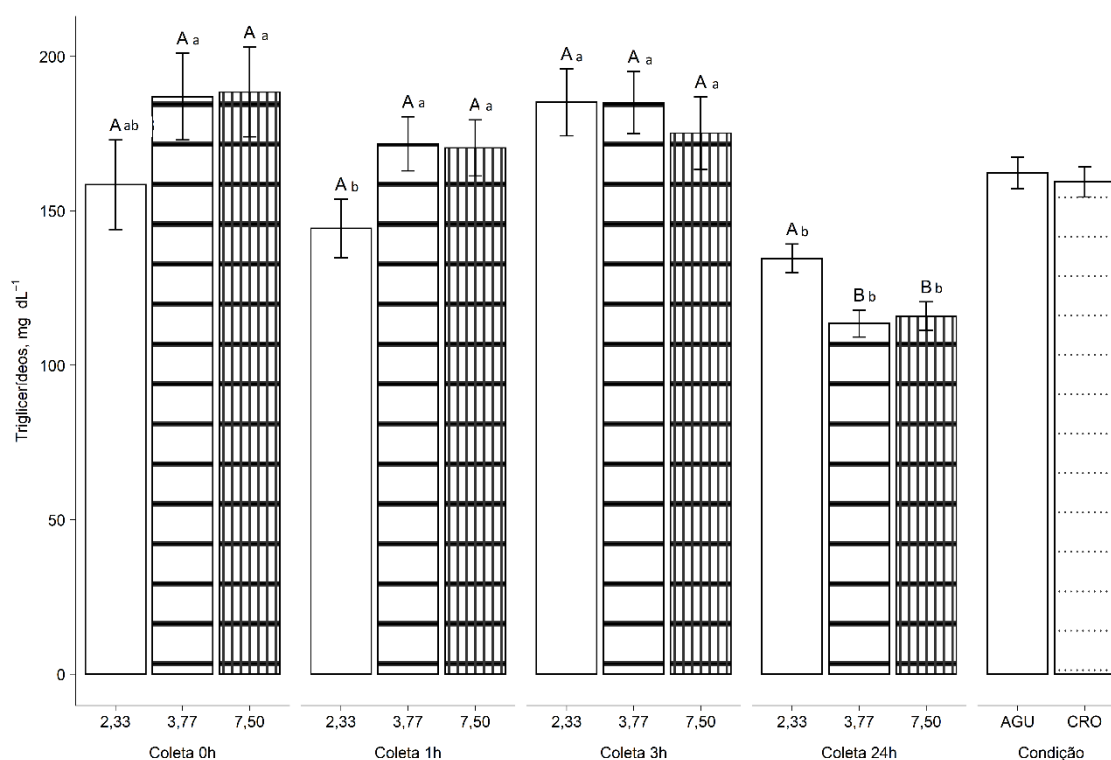


Fig. 3. Concentrações plasmáticas de triglicerídeos de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de coleta dentro de cada dieta e letras maiúsculas indicam diferença entre as dietas dentro de cada tempo de coleta (Tukey; $p < 0,05$).

Não houve interação de fatores em relação às concentrações séricas de colesterol e proteína total (Fig. 4 A e B), indicando que, em ambas as variáveis, os fatores avaliados (condição de estresse, tratamentos e tempos de coleta) não tiveram interferência nos resultados durante o período experimental.

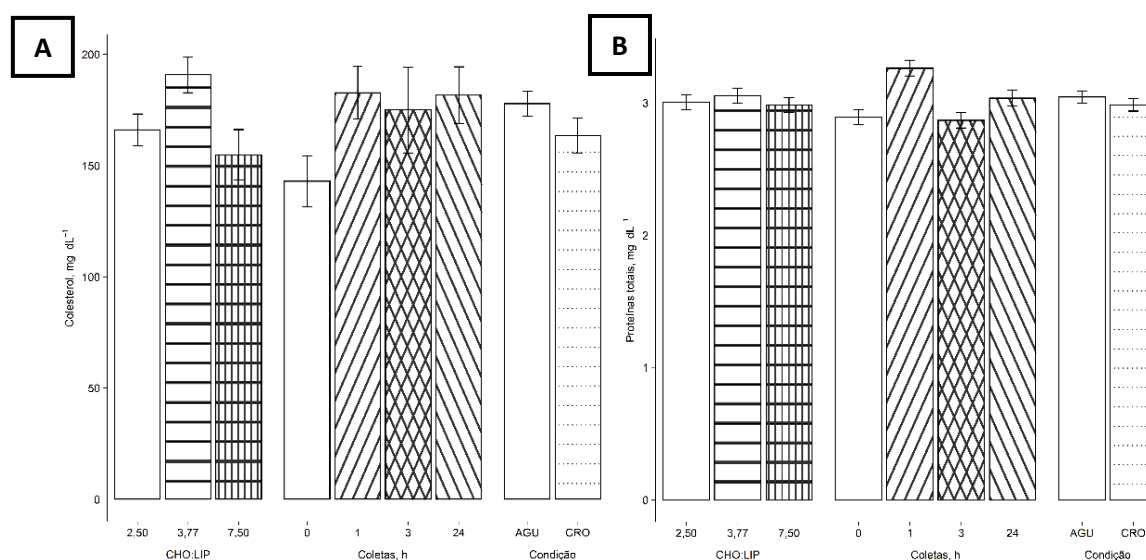


Fig. 4 Concentrações séricas de colesterol **(A)** e proteína total **(B)** de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídeo submetidos a duas condições de estresse e em diferentes tempos de coleta (Tukey; $p < 0,05$).

3.3.2. Indicadores teciduais

As concentrações de glicogênio hepático diferiram entre as dietas, sendo o menor valor observado nos peixes que receberam a CHO:LIP 2,33; não havendo diferença entre as dietas CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50. Não houve interação entre os fatores avaliados.

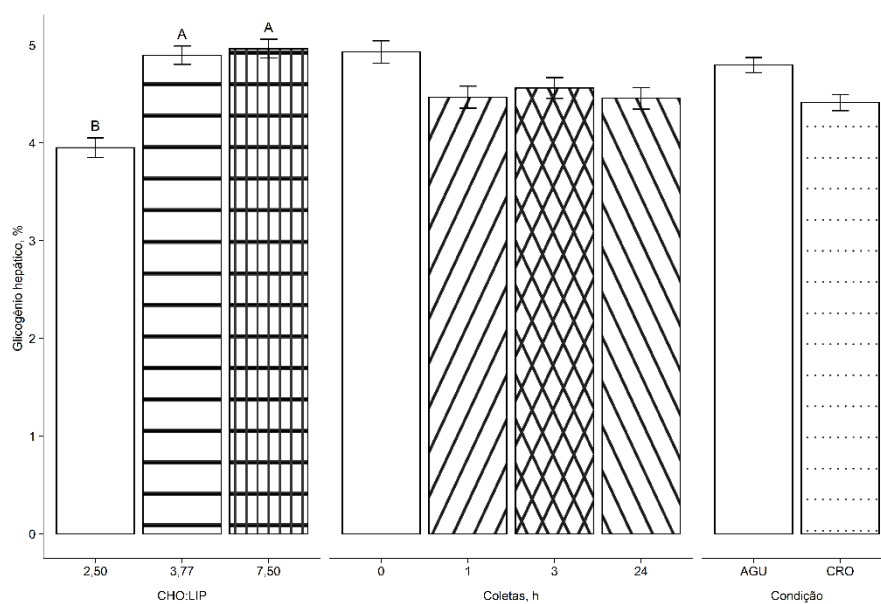


Fig. 5. Concentrações de glicogênio hepático de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferenças entre as dietas (Tukey; $p < 0,05$).

3.3.3. Índices morfo-somáticos

Houve diferença no índice hepatossomático (IHS) entre as dietas (Fig. 6A), sendo que os valores aumentaram com a inclusão de carboidrato nas dietas CHO:LIP 2,33; CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50; respectivamente. Não houve interação entre os demais fatores avaliados. Já o índice gorduro-viscerossomático (IGVS) (Fig. 6B) não apresentou diferença significativa para nenhum dos fatores avaliados e não houve interação entre eles.

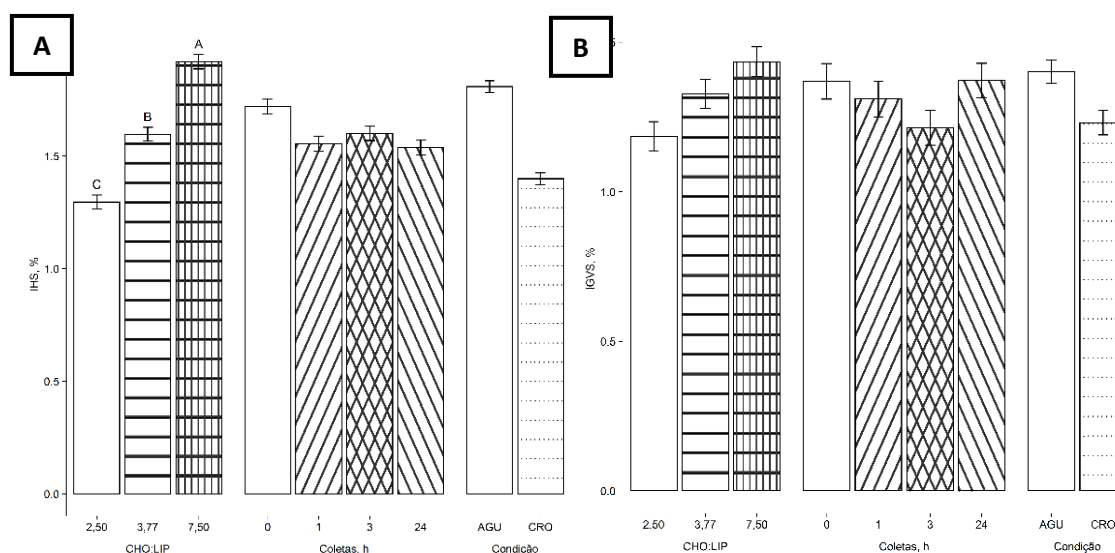


Fig. 6. Índice hepatossomático **(A)** e índice gorduro-viscerossomático **(B)** de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferenças entre as dietas (Tukey; $p < 0,05$).

3.4. Indicadores imunológicos

3.4.1. Atividade respiratória dos leucócitos (ARL) e concentrações séricas de lisozima

A atividade respiratória dos leucócitos não foi influenciada pelos fatores avaliados e não houve interação entre as dietas, tempos de coleta e condição de estresse (Fig. 7A). Já para a concentração sérica de lisozima, houve diferença estatística para a condição de estresse, sendo a menor concentração observada nos peixes que passaram pelo estresse crônico (Fig. 7B).

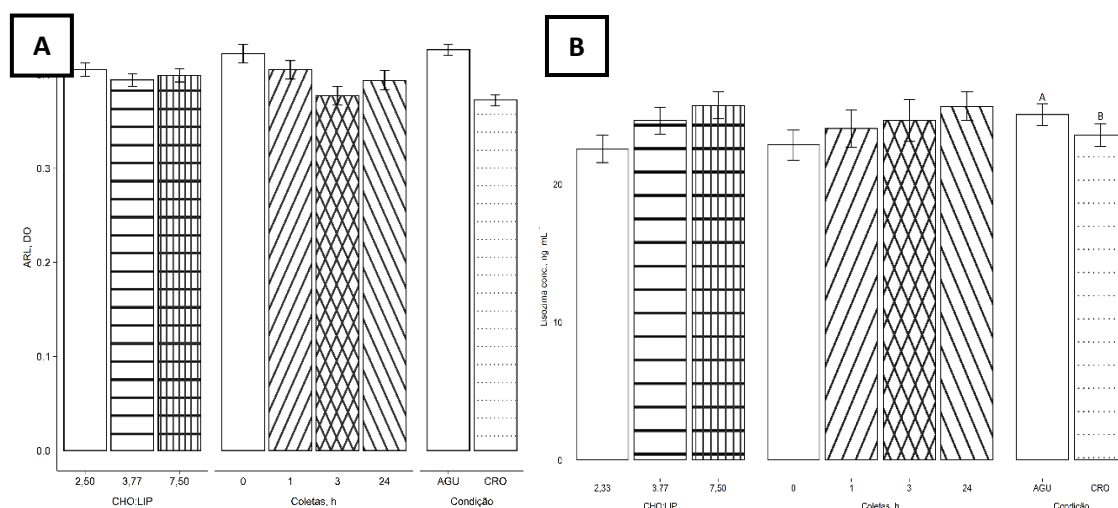


Fig. 7. Atividade respiratória de leucócitos ARL (A) e concentração sérica de lisozima de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sobre duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferenças entre as condições de estresse (Tukey; $p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O objetivo de nosso estudo foi avaliar se a relação CHO: LIP na dieta de pacu afeta respostas de desempenho, metabólicas, de estresse e imunológicas de juvenis sob duas condições de estresse, agudo (exposição aérea) e crônico (perseguição com puçá), considerando que durante as respostas de estresse há um aumento na demanda de energia e o fornecimento de fontes adequadas destes nutrientes pode minimizar eventuais prejuízos na resposta imune. Alternativas que fortaleçam a saúde dos peixes, como o atendimento de suas exigências nutricionais, é um caminho a ser avaliado, como forma de prepará-los para desafios estressores da criação. Os carboidratos e os lipídios são importantes fontes energéticas não proteicas utilizadas na nutrição de peixe, sendo sua adequada inclusão recomendada como forma de reduzir o custo de produção, além de poupar a proteína para o crescimento muscular (Kamalam et al., 2017; Boonanuntanasarn et al., 2018).

Observamos que o desempenho produtivo foi beneficiado por dietas contendo níveis mais elevados de carboidrato e foi prejudicado pelo manejo estressor crônico; a glicose circulante refletiu as quantidades mais elevadas de carboidrato na dieta, bem como os níveis de triglicerídeos no sangue, os estoques de glicogênio no fígado e os índices morfo-somáticos (IHS e IGVS). A condição de manejo crônico não alterou os indicadores

metabólicos, exceto por menores IHS e IGVS, mas após manejo agudo houve mobilização de triglicerídeos 24 h após a exposição ao estressor. Por outro lado, os peixes expostos ao estressor crônico, embora tenham apresentado níveis glicêmicos mais elevados após nova exposição, estes foram inferiores aos observados nos peixes que não foram cronicamente estressados, sugerindo algum nível de exaustão metabólica. Imunologicamente, as concentrações de lisozima foram menores nos peixes estressados cronicamente, mas não dependeu das relações de nutrientes testadas. Todas as dietas foram aceitas pelos animais, independente da relação entre carboidrato e lipídio, não havendo mortalidade durante o período experimental.

Os melhores índices produtivos (peso final, GP, TCA, TCE e TEP) para as maiores relações entre CHO:LIP (3,77 e 7,50), observados em nosso estudo, confirmam a capacidade do pacu de aproveitar o carboidrato como fonte energética, sendo os valores acima de 40% recomendados, sem que haja prejuízo em seu desempenho (Abimorad et al., 2007). Esta resposta está relacionada ao seu hábito alimentar e a capacidade da espécie de aproveitar o carboidrato como fonte energética (Takahashi et al., 2018). Coutinho et al. (2018), trabalhando com diferentes relações de carboidrato e lipídio para tilápias em tanque rede, obtiveram melhor resultado produtivo e econômico com a dieta CHO₄₃LIP₇ (7,83). Contudo, estudo prévio, com *Dicentrarchus labrax*, relatou que o excesso de carboidrato na dieta pode causar redução no desempenho, além de ocasionar acúmulo de gordura mesentérica (Enes et al., 2006). O nível adequado de inclusão de carboidrato em dietas para peixes de produção deve ser investigado conforme seu hábito alimentar e sistema de produção, pois já é comprovado que o carboidrato é um importante aliado à produção de peixes, se incluído corretamente.

O aumento nos níveis de cortisol circulante após exposição dos peixes ao estressor agudo foi apenas numérico, mas a glicose plasmática aumentou indicando que a exposição aérea foi um manejo estressor (Barton et al., 2002; Wendelaar Bonga 1997). Do mesmo modo, os níveis de cortisol no sangue, apesar de não diferirem no teste de variância, foram mais baixos nos peixes cronicamente manejados, sugerindo redução da resposta do eixo hormonal responsável pela liberação do cortisol. A redução dos níveis de triglicerídeos circulantes observada 24 horas após estressor agudo sugere que os lipídios contribuíram como fonte de energia para atender as necessidades metabólicas, após exposição aguda ao estressor, tanto nos peixes manejados diariamente como os não manejados. Cronicamente, o estoque visceral foi reduzido por mobilização, bem como as

reservas hepáticas. Os lipídios são um dos principais constituintes orgânicos dos peixes e tem papel essencial com fonte de energia metabólica (Tocher, 2003). O estresse diário por 21 dias mobilizou energia que foi redirecionada para manutenção do organismo, desviando aquela destinada ao uso de funções como o crescimento, o que refletiu negativamente no desempenho zootécnico dos peixes (Tort, 2011).

Ainda se conhece pouco sobre a relação entre os carboidratos e o sistema imune dos peixes. Zhou et al. (2014), investigando os efeitos do carboidrato dietético no sistema imune inato de juvenis de *Trachinotus ovatus*, concluíram que a inclusão de níveis adequados deste nutriente promoveu melhora no sistema imune dos animais. Já Anand et al. (2018), trabalhando com *Labeo rohita*, concluíram que o nível de inclusão de 45% de carboidrato dietético melhorou a resposta imune inata, sem afetar o desempenho dos peixes. Em nosso estudo, as relações de CHO:LIP não influenciaram estatisticamente na modulação da atividade respiratória de leucócitos, embora tenha ocorrido uma redução da atividade no grupo estresse crônico, quando comparado com o grupo estresse agudo. Já a concentração sérica de lisozima foi modulada pelas condições de estresse testadas, e os peixes expostos ao estressor crônico apresentaram menor concentração quando comparados com peixes do grupo estresse agudo. Esse resultado corrobora estudos que avaliaram a influência do estresse na capacidade de resposta do sistema imune em peixes e relataram prejuízos nas respostas testadas (Harris e Bird 2000; Tort 2011; Chadzinska et al. 2012; Nardocci et al., 2014; Urbinati et al., 2020).

5. CONCLUSÃO

A relação CHO:LIP 7,50 promoveu os melhores índices de desempenho de juvenis de pacu, enquanto as diferentes relações de carboidrato e lipídios não interferiram nas respostas de estresse e imunológicas. Os peixes sob estresse crônico tiveram seu desempenho reduzido e menor capacidade de resposta do sistema imune inato. Este estudo indica que o pacu foi capaz de preservar as respostas de estresse e imunes mesmo quando recebeu baixas quantidades de carboidratos, provavelmente por utilizar o lipídio como fonte de energia. O esforço metabólico dos peixes priorizou o atendimento das respostas de estresse e imunológicas, mas não sustentaram as de crescimento, haja visto o prejuízo no desempenho produtivo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J., URBINATI, E. C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Research*, v. 38, p. 36–44, 2007.

ANAND, G., BHAT, I. A., VARGHESE, T., DAR, S. A., SAHU, N. P. AKLAKUR, M. D., KUMAR, S., SAHOO, S. Alterations in non-specific immune responses, antioxidant capacities and expression levels of immunity genes in *Labeo rohita* fed with graded level of carbohydrates. *Aquaculture*. v. 483, p. 76 – 83, 2018.

ANDERSON, D. P., SIWICKI, A. K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M., ARTHUR, J. R, SUBASINGHE, R. P. Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 185-202, 1995.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, v. 3, p. 517-525, 2002.

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

BOONANUNTANASARN, S., KUMKHONG, S., YOOHAT, K., PLAGNES-JUAN, E., BUREL, C., MARANDEL, L., PANSERAT, S. Molecular responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture*. v. 482, p. 117-123, 2018.

CHADZINSKA, M., TERTIL, E., KEPKA, M., HERMSE, T., SCHEER, M., VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. Adrenergic regulation of the innate immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, v. 36, p. 306 – 316, 2012.

CIAqui. Centro de Inteligência e Mercado em Aquicultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em < [CIAqui - Portal Embrapa](#) >. Acesso em: 06 de dezembro de 2020.

COUTINHO, J. J. O., NEIRA, L. M., SANDRE, L. C. G., DA COSTA, J. I., MARTINS, M. I. E. G., PORTELLA, M. C., CARNEIRO, D. J. Carbohydrate-to-lipid ratio in extruded diets for Nile tilapia farmed in net cages. *Aquaculture*, v.497, p. 520-525, 2018.

DAMUSARU, J. H., MONIRUZZAMANA, M., PARKA, Y., SEONGA, M., JUNG, J. Y., KIME, D. J., BAIA, S. C. Evaluation of fish meal analogue as partial fish meal replacement in the diet of growing Japanese eel *Anguilla japonica*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 247, p. 41–52, 2019.

DENG, D. F., REFSTIE, S., HUNG, S. S. O. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates. *Aquaculture*, v. 199, p. 107–117, 2001.

DERTING, T. L., COMPTON, S. Immune response, not immune maintenance, is energetically costly in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Physiological and Biochemical Zoology*. v.76, p. 744-752, 2003.

ENES, P., PANSERAT, S., KAUSHIK, S., OLIVA-TELES, A. Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 145, p. 73 – 81, 2006.

FAO. State of World Fisheries and Aquaculture. 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations: < <http://www.fao.org/publications/sofia/en/> >. Acessado em: 08 de Abril. 2020.

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

HARRIS, J., BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 77, p. 163–176, 2000.

HERRARA, M., MANCERA, J.M., COSTAS, B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: comparative endocrine and physiological responses. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, p. 447, 2019.

HONORATO, C .A., ALMEIDA, L. C., DA SILVA NUNES, C., CARNEIRO, D. J., MORAES, G. Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture. Nutrition*. v. 16, p. 91-99, 2010.

HOOLEY, C. G., BARROWS, F. T., PATERSON, J., SEALEY, W. M. Examination of the effects of dietary protein and lipid levels on growth and stress tolerance of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of The World Aquaculture Society*, v. 45, p. 115–26, 2014.

KAMALAM, B. S., MEDALE, F., PANSERAT, S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*. v. 467, p. 3-27, 2017.

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

LI, X., ZHUN, X., HAN, D., YANG, Y., JIN, J., XIE, S. Carbohydrate utilization by herbivorous and omnivorous freshwater fish species: a comparative study on gibel carp (*Carassius auratus gilbelio*. var CAS III) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Research*, v. 47, p. 128-139, 2016.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunolog*, v. 20, p. 137-151, 2006.

NARDOCCI, G., NAVARRO, C., CORTÉS, P. P., IMARAI, M., MONTOYA, M., VALENZUELA, B., JARA, P., ACUÑA-CASTILLO, P., FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine mechanisms for imune system regulation during stress in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 40, p. 531 – 538, 2014.

PERRY, S. F., WALSH, P. J., MOMMSEN, T. P., MOON, T. W. Metabolic consequences of hypercapnia in the rainbow trout *Salmo gairdneri*: β -adrenergic effects. *General and Comparative Endocrinology*, v. 69, p. 439–447, 1988.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, F. L. T., HANNAS, M. I., SAKOMURA, N. K., PERAZZO, F. G., SARAIVA, A., TEIXEIRA, M. L., RODRIGUES, P. B., OLIVEIRA, R. F., BARRETO, S. L. T., BRITO, C. O. Tabelas brasileiras para aves e suínos [composição de alimento e exigências nutricionais]. 4. Ed. – Viçosa: Departamento de Zootecnia, UFV, 2017.

SCHRECK, C. B. Stress and reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, v. 165, p. 549–56, 2010.

SCHRECK, C. B., TORT, L. The Concept of Stress in fish. In: Schreck, C.B., Tort, L., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (editors). *Biology of Stress in Fish*. London: Academic Press p. 2–34, 2016.

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

SOUSA, L. C., MOROMIZATO, B. S., ALMEIDA, V. N. S., MIASAKI, C. T., TAKAHASHI, L. S., BILLER, J. D. There is more than one way of feeding carnivorous fish: Surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *P. corruscans*) are able to cope with carbohydrates rich diets, but there is a trade-off between growth and immunity. *Animal Feed Science and Technology*, v. 262, p. 114382, 2020.

TAKAHASHI, L. S., HA, N., PEREIRA, M. P., BILLER-TAKAHASHI, J. D., URBINATI, E. C. Carbohydrate tolerance in the fruit-eating fish *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture Research*, v. 49, p. 1182-1188, 2018.

TELES, M., BOLTAÑA, S., REYES-LÓPEZ, F., SANTOS, M. A., MACKENZIE, S., TORT, L. Effects of chronic cortisol administration on global expression of GR and the liver transcriptome in *Sparus aurata*. *Marine Biotechnology*, v. 15, p. 104-114, 2013.

TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, v.11, p. 107-184, 2010.

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

URBINATI, E. C., ZANUZZO, F. S., BILLER-TAKAHASHI, J. D. Stress and immune system in fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Ed., Elsevier, Academic Press. Amsterdam. p. 93-114, 2020.

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

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

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, p. 591-625, 1997.

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

ZHOU, C., GE, X., LIN, H., NIU, J. Effect of dietary carbohydrate on non-specific immune response, hepatic antioxidative abilities and disease resistance of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 41, p. 183 – 190, 2014.

CAPÍTULO III

Sistema antioxidante e estresse oxidativo em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob duas condições de estresse

RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos de diferentes relações de carboidrato e lipídio dietéticos em juvenis de pacu sob duas condições de estresse comuns na aquicultura, estresse agudo (exposição aérea por 4 min) e estresse crônico (perseguição com puçá diariamente por 21 dias), na glicose plasmática e na capacidade antioxidante hepática (catalase, CAT; superóxido dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; glutathione S-transferase, GST; glutathione reduzida, GSH e lipoperoxidação lipídica, LPO). Os peixes foram alimentados durante 21 dias com três dietas experimentais: CHO_{25,6}:LIP₁₁ (2,33), CHO_{35,4}:LIP_{9,4} (3,77) e CHO₄₅:LIP₆ (7,50), sendo que um grupo não foi manejado e outro recebeu o manejo estressor diário. Ao final de 21 dias, os dois grupos foram expostos ao estressor agudo e amostrados antes (basal), 1, 3 e 24 horas depois. A glicose plasmática foi modulada pela relação CHO:LIP, com os maiores níveis nas dietas 3,77 e 7,50, sendo os níveis mais elevados observados no grupo que só recebeu o estressor agudo (1, 3 e 24 horas). A atividade da SOD diminuiu 24 horas após exposição aérea. A GSH diminuiu após a exposição ao estressor nos peixes das dietas 2,33 e 3,77 e aumentou na dieta 7,50. A LPO foi menor nos peixes que receberam a dieta 7,50. Os resultados sugerem que a dieta 7,50 apresentou efeito protetor do sistema antioxidante, diminuindo a LPO no fígado de pacu.

Palavras-chave: nutrição, aquicultura, estresse oxidativo, sistema antioxidante

ABSTRACT

The present study investigated the effects of different dietary carbohydrate-lipid ratios in juvenile pacu under two common stress conditions in aquaculture, acute stress (air exposure for 4 min) and chronic stress (daily net chasing for 21 days), in plasma glucose and antioxidant indicators (catalase, CAT; superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; glutathione s-transferase, GST; reduced glutathione, GSH and lipid lipoperoxidation, LPO) in liver. Fish were fed for 21 days with three experimental diets: CHO25.6:LIP11 (2.33), CHO35.4:LIP9.4 (3.77) and CHO45:LIP6 (7.50), with one fish group not undisturbed and the other exposed to the daily stressor. At the end of 21 days, both fish groups were exposed to the acute stressor and sampled before (baseline), 1, 3 and 24 h later. Plasma glucose was modulated by the CHO:LIP ratio, with the highest levels in diets 3.77 and 7.50, in the group exposed only to the acute stressor (1, 3 and 24 h). SOD activity decreased 24 h after air exposure and GSH decreased after exposure to the stressor in fish fed with diets 2.33 and 3.77 and increased in those fed with diet 7.50. LPO was lower in fish that received the 7.50 diet. The results suggest that the 7.50 diet had a protective effect on the antioxidant system, decreasing LPO in pacu liver.

Keywords: nutrition, aquaculture, oxidative stress, antioxidant system.

1. INTRODUÇÃO

Embora os carboidratos sejam classificados como nutrientes não essenciais para peixes, eles vêm sendo muito estudados por ser uma fonte energética de baixo custo. Estudos demonstram que a capacidade de utilização deste nutriente está relacionada a vários fatores, como: hábito alimentar, fonte e nível de inclusão, temperatura, entre outros. A adequada inclusão de carboidrato em dietas para peixe resulta em custos de produção mais baixos por reduzir o nível de proteína, sem prejuízo do crescimento por seu efeito poupador de proteínas (Hemre et al., 2002; Stone, 2003; Kamalam et al., 2017; Takahashi et al., 2018; Coutinho et al., 2018). O carboidrato na dieta é uma fonte de energia facilmente disponível e sua oferta em níveis ótimos resulta na oxidação completa da glicose (Hilton et al., 1987), especialmente em caso de maior demanda biológica como a que ocorre durante situações de estresse (Wendelaar Bonga 1997; Barton et al., 2002).

A intensificação dos sistemas de produção faz com que os peixes cultivados passem por situações estressantes ao longo do ciclo produtivo, como alterações físico-químicas na água, manejos físicos ou estresse metabólico (dieta inadequada) (Chowdhury e Saikia, 2020). O estresse afeta o peixe de forma distinta, dependendo do caráter agudo ou crônico, com respostas adaptativas ou mal adaptativas, embora, em ambas as condições, a demanda energética seja sempre maior que em condição de homeostase fisiológica (Tort, 2011). Peixes estressados têm as taxas metabólicas alteradas e consomem mais oxigênio para atender a demanda energética da nova situação desafiadora, o que pode levar a um esforço maior do mecanismo redox na respiração celular, resultando em maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Lushchak, 2011; Pinto et al., 2019).

As espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo oxidativo, ocorrendo de forma natural nas mitocôndrias e em outros sub compartimentos celulares (Zhang et al., 2021), e são reguladas por um delicado balanço redox entre EROS e os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático naturais, sendo o estresse oxidativo resultado do desbalanço entre a produção e neutralização das EROS (Schieber e Chandel, 2014; Pinto et al., 2019). As EROS em excesso causam danos em moléculas como carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Fagan et al., 1999; Niki, 2009; Nimse e Pal, 2015; Cadet e Davies, 2017). A hipótese deste estudo é que em condição de maior demanda energética, em distintas condições de estresse (agudo e crônico), ocorra maior produção de EROS e estes possam estar associados a possíveis efeitos negativos da

resposta de estresse. Além disso, o estudo testou se o fornecimento de maior nível de carboidratos na dieta poderia favorecer o fornecimento de energia para o metabolismo dos peixes e interferir no balanço redox celular.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sistema antioxidante/estresse oxidativo em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio sob duas condições de estresse comuns na piscicultura (estresse agudo de exposição aérea e estresse de perseguição diária durante 21 dias). O pacu é o peixe alvo deste estudo, pois além de ser uma das principais espécies comerciais na América do Sul (Valladão et al., 2018), possui hábito alimentar frutívoro/onívoro e se alimenta principalmente de frutas e sementes, demonstrando grande capacidade de utilização de ingredientes de origem vegetal, em especial o carboidrato (Takahashi et al., 2018; Urbinati et al., 2020). Considerando seu hábito alimentar, o pacu possui a capacidade de poupar a proteína para crescimento muscular, usando o carboidrato como fonte energética, desde que sejam atendidas suas exigências proteicas e energéticas (Abimorad et al., 2007; Takahashi et al., 2018).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo 010281/19) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal – SP, sendo realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1. Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 240 juvenis de pacu com peso inicial de 52,77 g e desvio padrão de 7,72; adquiridos do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), aleatoriamente distribuídos em 24 unidades experimentais de formato circular e volume de 1.000 L (10 peixes por caixa) em um sistema de recirculação com aeração constante. Durante o experimento, foram monitorados temperatura ($27,5 \pm 1$ °C), oxigênio dissolvido ($6,5 \pm 0,3$ mg L⁻¹) e pH ($7,13 \pm 0,01$), sendo o fotoperíodo de 12 horas. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente duas vezes ao dia (8 e 16 h) com ração comercial (28 % de PB e 3.600 kcal EB kg⁻¹) e aclimatados ao sistema durante uma semana antes do início do experimento. Após aclimação, os peixes foram alimentados durante 21 dias com as dietas experimentais, nas quais variava a relação entre carboidrato e lipídio: dieta

1 (CHO_{25,6}:LIP₁₁), 2 (CHO_{35,4}:LIP_{9,4}) e 3 (CHO₄₅:LIP₆), com a seguinte proporção de carboidrato e lipídio: 2,33; 3,77; e 7,5, respectivamente.

No grupo de estresse agudo, os peixes só foram expostos ao estressor (exposição aérea durante quatro minutos) ao final do experimento, após uma coleta basal, e no grupo de estresse crônico os peixes eram estressados diariamente (perseguição com puçá), duas vezes ao dia (2 horas após alimentação), durante quatro minutos. Ao final dos 21 dias, foi realizado a coleta basal (2 peixes por caixa, n = 8 por coleta em cada tratamento), e então os peixes de todas as caixas foram expostos ao estressor agudo. Em seguida, novas coletas foram realizadas, às 1, 3 e 24 horas depois do estressor. Foram avaliados os seguintes indicadores: glicemia como indicador metabólico e os indicadores do sistema antioxidante e a atividade hepáticas das enzimas Catalase (CAT), Superóxido Desmutase (SOD), Glutathione S-Transferase (GST), Glutathione Peroxidase (GPx), a Glutathione Reduzida (GSH), e de estresse oxidativo, a lipoperoxidação lipídica (LPO).

2.2. Amostragens

Os peixes foram anestesiados com MS-222 (0,1 g L⁻¹) e amostras de sangue retiradas por punção da veia caudal, com seringas sem anticoagulante. O sangue foi transferido para microtubos contendo Glistab® (anticoagulante contendo EDTA 6 g/dL and KF 12 g/dL, Labtest Ref. 29 / 29E). Para obtenção do plasma, os microtubos foram centrifugados (3.000 rpm/10 min. a 4 ° C) e o plasma utilizado para análise de glicose plasmática. Após a coleta de sangue, os peixes foram eutanasiados (secção da medula espinhal) e o fígado coletado e armazenado a -80 ° C para análise dos indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo.

2.3. Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas com base em valores tabelados de digestibilidade dos ingredientes utilizados e de acordo com as exigências da espécie (Rostagno et al., 2017; Abimorad et al., 2007), alterando-se apenas a relação entre carboidratos e lipídios. Os ingredientes e a composição centesimal das dietas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Fórmula e composição centesimal das dietas experimentais:

<i>Ingredientes</i>	Dietas		
	CHO _{25,6} :LIP ₁₁ D1	CHO _{35,4} :LIP _{9,4} D2	CHO ₄₅ :LIP ₆ D3
Farelo de soja ^a	33,0	34,5	37,0
Farinha de peixe ^b	16,0	16,0	16,0
Sêmola grits ^c	1,0	1,0	1,0
Farelo de trigo ^d	2,0	5,0	7,0
Farelo de arroz ^e	24,6	13,5	0,0
Amido de milho ^f	1,0	16,1	32,1
Óleo de soja ^g	5,5	5,4	3,9
Fosfato bicálcico (foscalcio) ^h	2,5	2,5	2,5
Premix fish ⁱ	0,5	0,5	0,5
Celulose microcristalina ^j	8,0	3,0	0,0
Vitamina C ^k	0,015	0,015	0,015
Caolin ^l	5,9	2,5	0,0
Total	100,00	100,0	100,0

Composição Centesimal Estimada

Matéria seca %	91,1	90,4	89,7
Proteína bruta %	27,7	27,4	27,1
Proteína digestível %	23,7	23,6	23,4
Lipídio %	11,0	9,4	6,0
Fibra bruta %	10,0	5,5	2,4
Matéria mineral %	10,7	9,9	9,0
Extrato não nitrogenado %	25,6	35,4	45,0
Energia bruta kcal/kg	3.795	4.042	4.082
Energia digestível kcal/kg	3.046	3.108	2.954
Cálcio %	1,67	1,66	1,66
Fósforo %	1,07	1,04	1,01
Carboidrato/Lipídio	2,33	3,77	7,50

a, b, d, e, i, k e l = Agromix, Jaboticabal – SP; *c, h e j* = Rhoster, Araçoiaba da Serra – SP; *f* = Siamar, Neves Paulista – SP e *g* = Óleo leve, Araucária – PR.

Para a preparação das dietas, os ingredientes foram pesados, homogeneizados e peletizados em máquina de moer carne. Em seguida os peletes foram secos em estufa de ventilação forçada a 55 ° C durante 24 horas e as rações estocadas a -20 ° C até o uso. As dietas experimentais foram fornecidas duas vezes ao dia, às 8 e 16 horas até a saciedade aparente e sua quantidade anotada para posteriores análises de consumo e desempenho zootécnico.

2.4. Análises

2.4.1. Indicador metabólico

A concentração de glicose foi determinada com Kit Labtest (Glicose Liquiform, São Paulo, Brasil, ref. 133).

2.4.2. Indicadores do sistema antioxidante e estresse oxidativo

Atividade das enzimas

Amostras de fígado foram homogeneizadas (1:10 mg/ μ L) em solução tampão fosfato pH 7,0 (CAT, SOD, GST, GPx, GSH e LPO), centrifugadas e o sobrenadante armazenado a -80 ° C até as análises. Para cálculo das enzimas foi determinada a concentração de proteína de acordo com Bradford (1976). A determinação da atividade da CAT foi realizada de acordo com Aebi (1984), com base no consumo de peróxido de hidrogênio exógeno (H_2O_2), e produção, ao final da reação, de água e oxigênio. A absorbância foi lida a 240 nm, a cada 15 segundos/5 minutos. A SOD foi determinada segundo Mccord e Fridovich (1969), com base na inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, a 550 nm, 25 ° C. A concentração de GST foi determinada de acordo com Keen et al. (1976), com base na redução da glutathione pelo substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), criando a glutathione 2,4-nitrobenzeno lido a 340 nm. A atividade da GPx foi determinada de acordo com Hafeman et al. (1974), de forma indireta através da oxidação do NADPH na presença de glutathione redutase (GR) e o substrato glutathione oxidada, produzida pela ação da GPx. A redução da absorbância foi lida a 340 nm, a cada 15 segundos /5 minutos.

Concentração de GSH (glutathiona reduzida)

A concentração de GSH foi determinada segundo Beutler et al. (1963) usando ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB), a 412 nm, comparando os valores obtidos com uma curva padrão de GSH.

Lipoperoxidação lipídica

A análise da lipoperoxidação lipídica foi determinada pela produção de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com Camejo et al. (1998).

2.5. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando as funções *lme* e *anova* do pacote *nlme* (Pinheiro et al., 2020) do software R (R Core Team, 2020). Delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 (relação de carboidrato e lipídio) x 4 (horários de coleta, i.e. efeito longitudinal) x 2 (condições de estresse [Eq. 1], foram utilizados, conforme modelo a seguir:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + E_j + b_{ij:k} + C_l + (AE)_{ij} + (AC)_{il} + (EC)_{jl} + (AEC)_{ijl} + e_{ijkl} \quad [1]$$

onde Y_{ijkl} é a variável dependente, μ é a média geral, A_i é o efeito fixo de relação carboidrato e lipídio, E_j é o efeito fixo da condição de estresse, $b_{ij:k} \sim \text{iid } N(0, \sigma_b^2)$ é o efeito aleatório da k -ésima caixa dentro da interação $(AE)_{ij}$, C_l é o efeito fixo de horário de coleta, $(AE)_{ij}$ é a interação entre A_i e E_j , $(AC)_{il}$ é a interação entre A_i e C_l , $(EC)_{jl}$ é a interação entre E_j e C_l , $(AEC)_{ijl}$ é a interação entre A_i , E_j , C_l , e e_{ijkl} é o efeito aleatório de erro residual $e_{ijk} \sim N(0, R)$, onde R é estrutura de correlação de e_{ijk} . Foram avaliadas as R geral (σ_e^2), simétrica composta, autorregressiva de ordem 1 e autorregressiva de ordem 1 heterogênea. O critério de informação de Akaike, corrigido para pequenas amostras (Sugiura, 1978), foi utilizado para escolha da melhor R .

As médias foram comparadas por meio de comparações múltiplas utilizando ajuste de multiplicidade de Tukey, disponível na função *emmeans* do pacote *emmeans* (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). Para os efeitos de relação de carboidrato e lipídio e horários de coletas as médias foram ainda comparadas utilizando contrastes por meio de polinômios ortogonais, disponível nas funções *emmeans* e *contrast*

do pacote *emmeans* (Lenth, 2019) do software R (R Core Team, 2020). P-valor menor do que 0.05 foi considerado como significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Indicador metabólico

As concentrações de glicose plasmática diferiram entre as dietas, sendo o menor valor observado na dieta CHO:LIP 2,33. Não houve diferença entre as dietas CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50. Em relação aos tempos de coleta, os maiores níveis de glicose foram observados 1 e 3 horas após exposição aérea, nas duas condições de estresse, retornando aos valores basais após 24 horas. Houve interação entre a condição de estresse e tempo de coleta, sendo que os peixes do estresse agudo apresentaram concentrações mais elevadas 1, 3 e 24 horas após a exposição aérea quando comparados com os peixes do grupo estresse crônico.

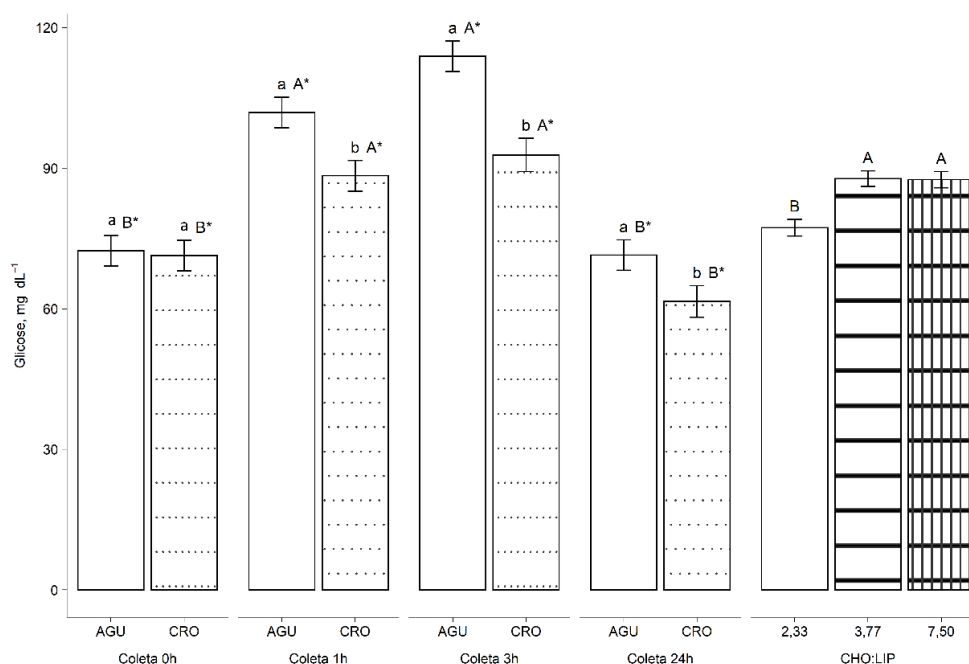


Fig. 1. Concentrações plasmáticas de glicose de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações de carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferenças entre as dietas; letras maiúsculas com * indicam diferenças em um mesmo tratamento, entre os tempos de coleta; letras minúsculas indicam diferenças entre as condições de estresse, em cada tempo de coleta (Tukey; $p < 0,05$).

3.2 Sistema antioxidante/Estresse oxidativo

A atividade da catalase (CAT) não diferiu estatisticamente em nenhuma comparação, e não houve interação entre os fatores avaliados (dietas, tempo de coleta e condição de estresse).

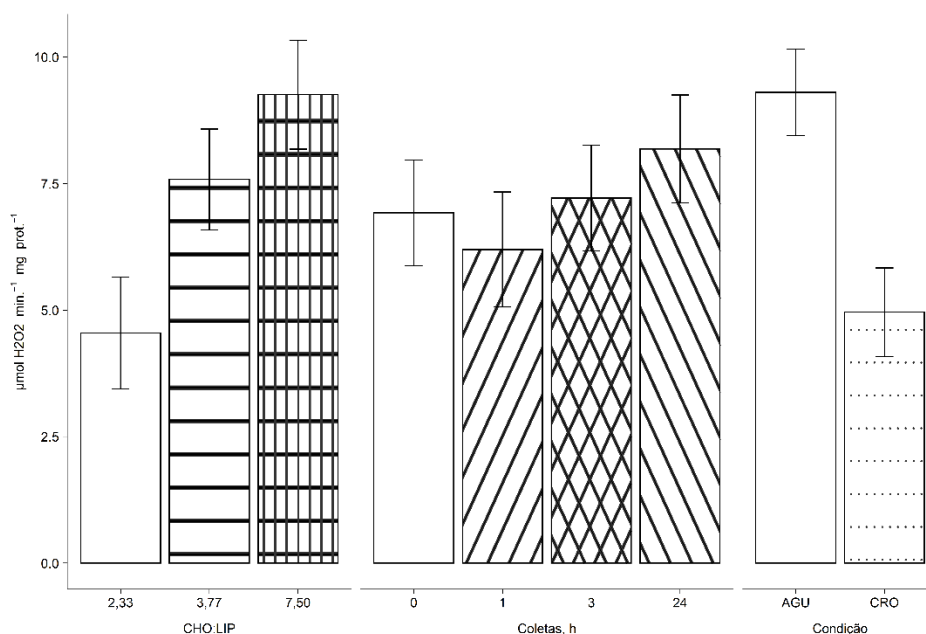


Fig. 2. Atividade da catalase (CAT) no fígado de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea (Tukey; $p < 0,05$).

A atividade hepática da enzima superóxido dismutase (SOD) diferiu significativamente entre tempos de coleta, com redução às 24 horas após exposição aérea. Para os outros fatores avaliados, como tratamento dietético e condição de estresse, os resultados não diferiram estatisticamente.

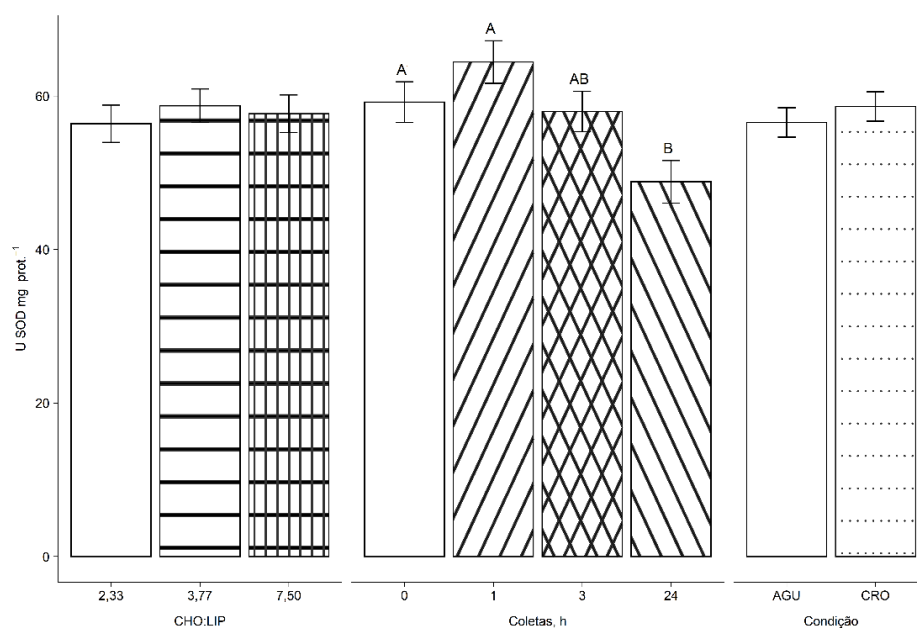


Fig. 3. Atividade da superóxido dismutase no fígado de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferença entre os tempos de coleta (Tukey; $p < 0,05$).

A atividade hepática da glutathione s-transferase (GST) não diferiu em nenhuma comparação e não houve interação entre os fatores avaliados (dieta, tempo de coleta e condição de estresse).

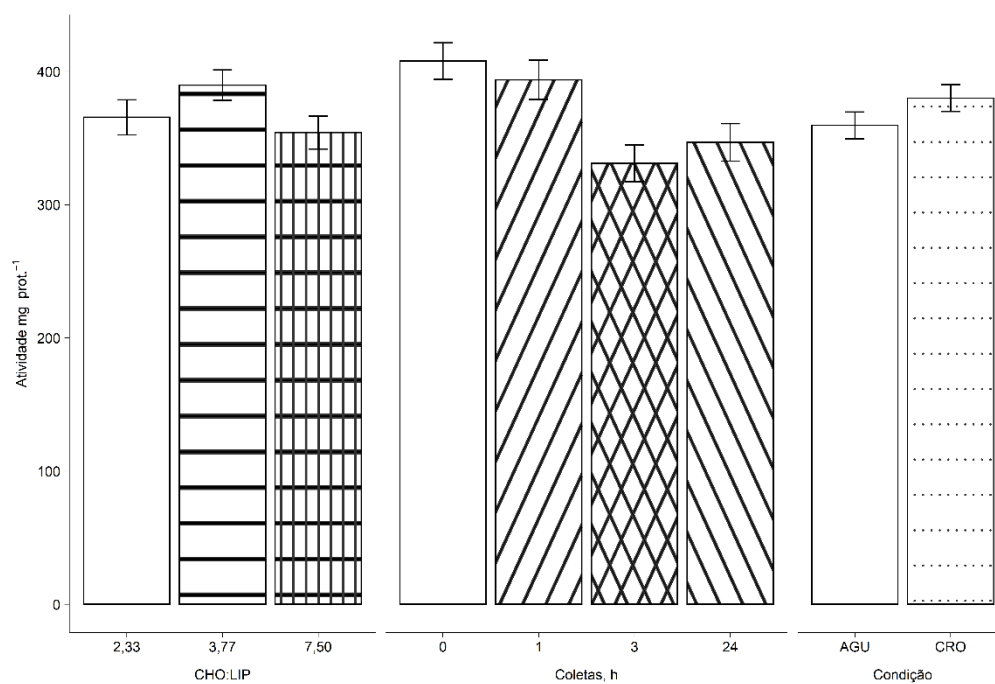


Fig. 4. Atividade da glutatona s-transferase (GST) no fígado de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta horas após exposição aérea (Tukey; $p < 0,05$).

A atividade hepática da glutatona peroxidase (GPx) no fígado de juvenis de pacu não diferiu segundo os fatores avaliados e não houve interação entre as dietas, tempos de coleta e condição de estresse durante o período experimental.

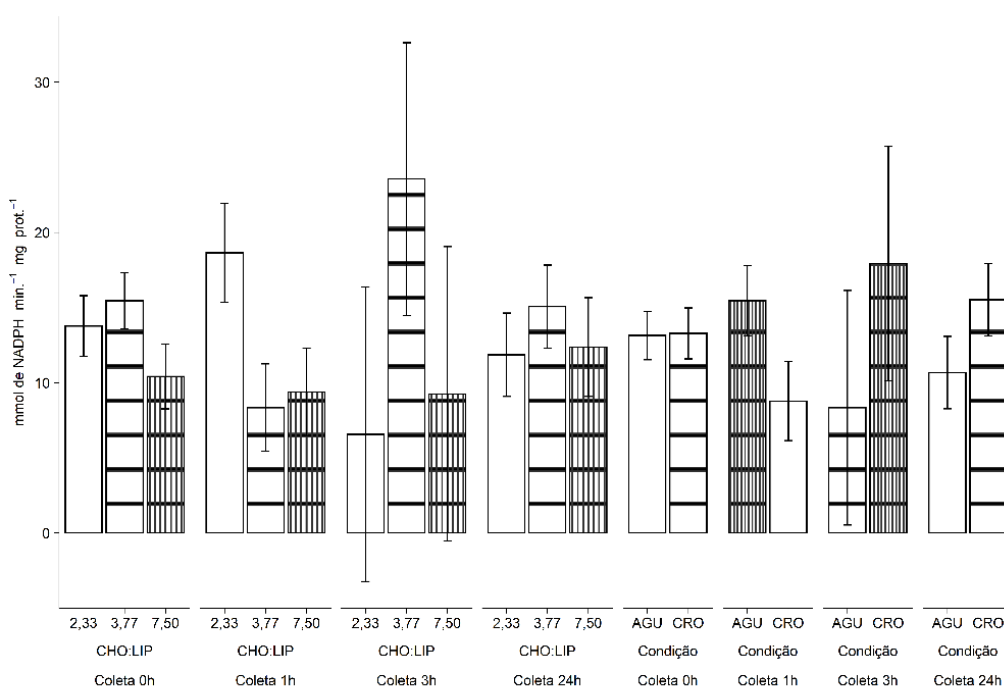


Fig. 5. Atividade da glutatona peroxidase (GPx) no fígado de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta horas após exposição aérea (Tukey; $p < 0,05$).

Em relação à concentração de glutatona reduzida (GHS) no fígado, houve diferença entre as dietas. A maior concentração foi observada na dieta CHO:LIP 7,50, às 3 horas após exposição aérea, não havendo diferença entre as dietas CHO:LIP 2,33 e CHO:LIP 3,77. Nas dietas CHO:LIP 2,33 e CHO:LIP 3,77; houve redução à 3 horas, retornando aos níveis basais às 24 horas. Já na dieta CHO:LIP 7,50; foi observado aumento nos valores 1 hora após a exposição ao estressor agudo, retornando aos níveis basais às 3 e 24 horas. Não houve diferença estatística na comparação das condições de estresse durante o período experimental.

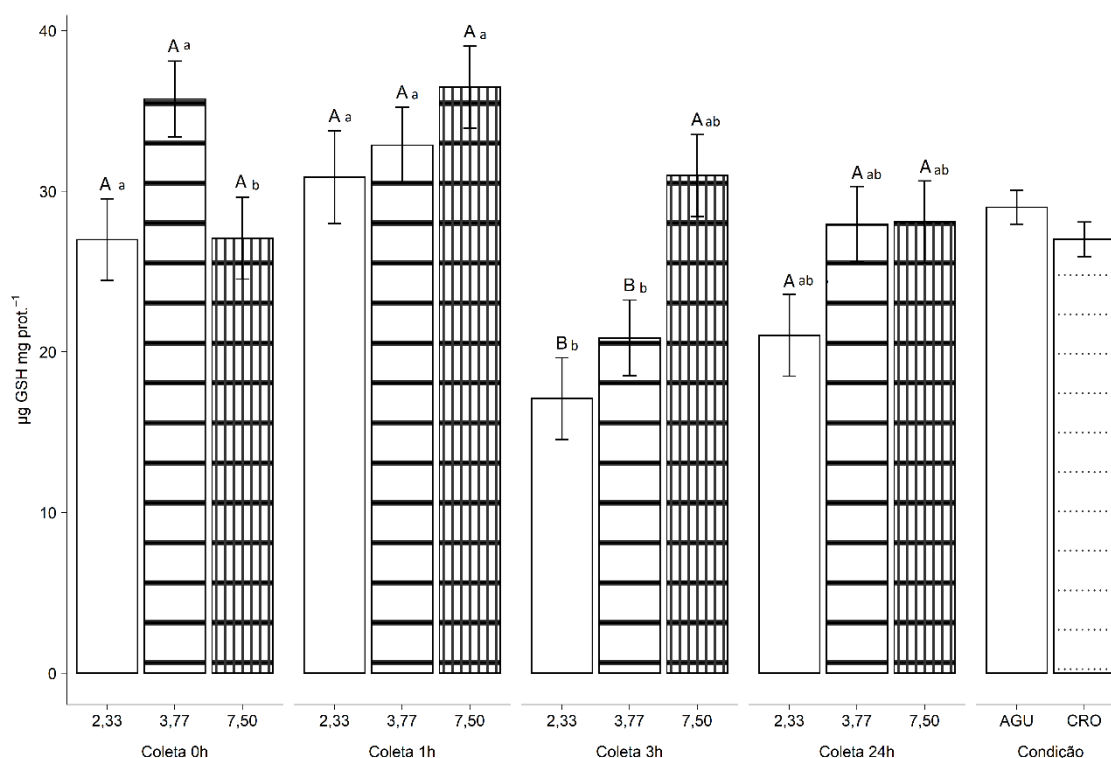


Fig. 6. Concentração de glutathiona reduzida no fígado de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferença entre as dietas, em cada tempo de coleta; letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de coleta, em cada tratamento (Tukey; $p < 0,05$).

A lipoperoxidação lipídica (TBARS) diferiu significativamente na comparação entre as dietas experimentais. Os maiores valores foram observados na dieta CHO:LIP 2,33 quando comparado a dieta 3 CHO:LIP 7,50 às 1 e 24 horas após exposição aérea. Para todas as dietas não houve diferença estatística entre os tempos de coleta após a exposição aérea (estresse agudo).

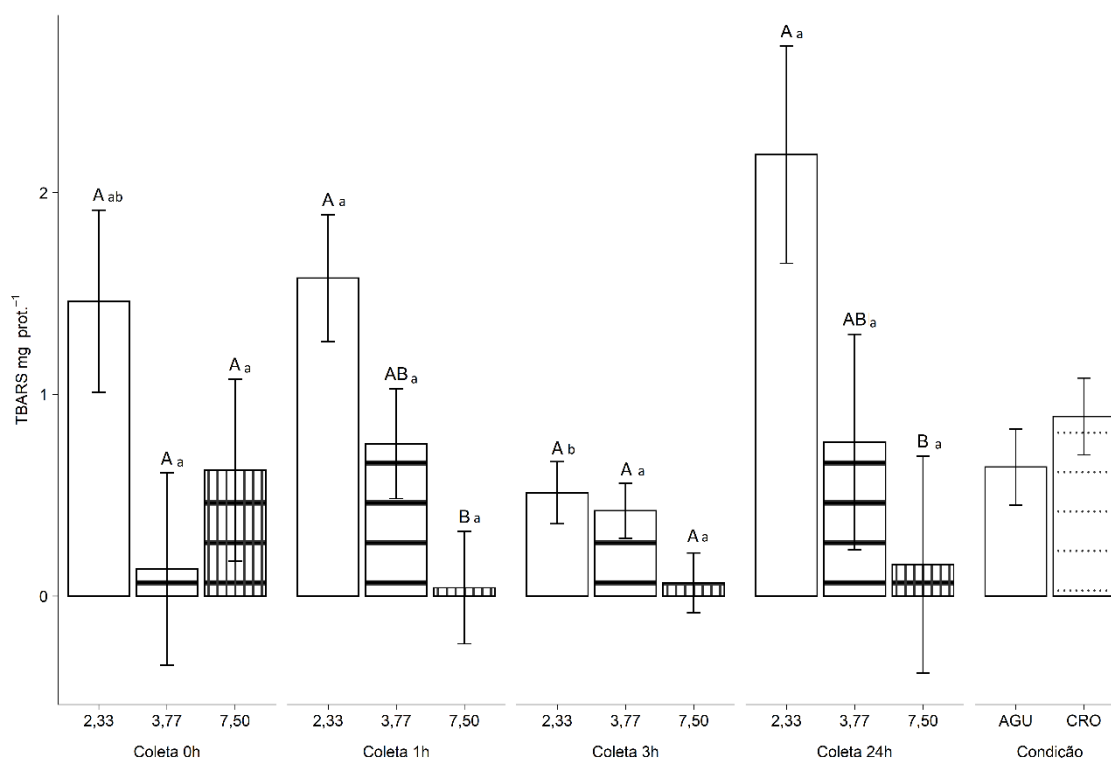


Fig. 7. Concentração de TBARS (lipoperoxidação lipídica) no fígado de juvenis de pacu alimentados com diferentes relações carboidrato e lipídio submetidos a duas condições de estresse e diferentes tempos de coleta após exposição aérea. Letras maiúsculas indicam diferença entre as dietas, em cada tempo de coleta. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de coleta, em cada tratamento (Tukey; $p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos da relação entre carboidrato e lipídio no sistema antioxidante e no estresse oxidativo no fígado de juvenis de pacu sob duas condições de estresse, agudo (exposição aérea) e crônico (perseguição diária com puçá) durante 21 dias. Nossa hipótese é que, durante a resposta de estresse, ocorre maior demanda energética, com ativação dos processos de produção de energia, o que pode resultar em desbalanço redox e consequente estresse oxidativo. Assim, a disponibilidade de níveis dietéticos mais elevados de carboidratos, fonte de energia mais facilmente mobilizada, pode favorecer o atendimento das demandas energéticas sem impactar o status redox das células. Isso foi confirmado pelos resultados observados nos níveis de glicose mais elevados nos peixes que receberam as dietas com mais carboidrato (CHO:LIP 3,77 e CHO:LIP 7,50), os quais apresentaram os menores níveis de

peroxidação lipídica quando foram expostos ao estressor agudo. Nesta condição, há uma exigência energética maior atendida por ação adrenérgica do eixo simpático-cromafim (Schreck e Tort, 2016). Por outro lado, as concentrações de GSH, molécula que tem papel central na defesa antioxidante celular neutralizando a maioria dos radicais livres e partículas reativas de oxigênio, tais como radicais hidroxila, superóxido e radicais de ácidos graxos (Sarangarajan et al., 2017), estão aumentadas nestas mesmas dietas nas coletas após exposição ao estressor agudo.

Como em outros animais, os peixes também possuem um equilíbrio redox entre produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS), sendo o estresse oxidativo causado quando ocorre o desbalanço redox (Nimse e Pal, 2015; Chowdhury e Saikia, 2020). A maioria dos estudos que avalia o sistema antioxidante de peixes está relacionado à ecotoxicologia aquática (Lushchak, 2016), havendo pouca informação e entendimento sobre a relação entre os estressores comuns na aquicultura sobre o balanço redox dos peixes produzidos em cativeiro (Elabd et al., 2017; Filiciotto et al., 2017). Alterações nas condições ambientais (temperatura, oxigênio) (Clotfelter et al. 2013), temperatura e salinidade (Eissa et al., 2017) ou manejos físicos (Faria et al., 2021; Neyrão et al., 2021) podem causar estresse oxidativo. Fatores como má nutrição e contaminantes na água também induzem o desbalanço redox, ocasionado em prejuízo no crescimento e redução da resposta imune, fazendo com que os peixes fiquem vulneráveis a doenças (Chowdhury e Saikia, 2020).

Nosso estudo é inovador pois avalia dois tipos de estressores associados a diferentes relações de carboidrato e lipídio em dietas para peixes, como forma de interferir no sistema antioxidante do pacu, que aproveita o carboidrato dietético de forma eficiente (Takahashi et al., 2018). Analisando estudos que investigaram o uso de carboidratos associados ao sistema antioxidante, os resultados são divergentes, possivelmente pelos diferentes protocolos experimentais utilizados. De acordo com estes estudos, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes está correlacionado a uma melhor condição de saúde e homeostase metabólica em peixes. Ma et al. (2019) observaram que o aumento do amido dietético impactou de forma negativa no *status* oxidativo em juvenis de *Micropterus salmoides*. Em outro estudo (Wu et al., 2016), com “black carp” *Mylopharyngodon piceus*, o estresse oxidativo foi agravado quando os peixes foram alimentados com excesso de carboidratos. Estes resultados diferem do observado no presente estudo no qual o aumento do carboidrato dietético (CHO:LIP 7,50) influenciou

de forma positiva no *status* oxidativo, promovendo os menores níveis para lipoperoxidação lipídica (TBARS) em relação a níveis mais baixos (CHO:LIP 2,33).

No mesmo sentido, Castro et al. (2016), avaliando o *status* oxidativo no fígado e intestino de *Sparus aurata* alimentados com dietas ricas em óleo vegetal e carboidrato, concluíram que o carboidrato dietético exerceu função protetora contra o estresse oxidativo no fígado e intestino dos peixes. Outro estudo que relatou que o uso do carboidrato dietético como fonte alternativa de energia não gera efeito negativo no sistema antioxidante (Pérez-Jiménez et al., 2017) foi realizado com o *Dentex dentex*. Os autores concluíram que os carboidratos contribuíram como protetores oxidativos. Apesar destes estudos (Castro et al., 2016; Pérez-Jiménez et al., 2017) relatarem aspectos semelhantes ao nosso em relação ao efeito protetor dos carboidratos no sistema antioxidante, é importante destacar que nenhum dos dois desafiou os peixes com condição de alta demanda energética como foi feito no presente estudo.

5. CONCLUSÃO

A CHO:LIP 7,50 mostrou efeito protetor do sistema antioxidante, reduzindo a lipoperoxidação lipídica e aumentando as concentrações de GSH no fígado de juvenis de pacu após exposição aérea. As enzimas CAT, SOD, GPx e GST não apresentaram alterações, indicando que a inclusão de até 45% de carboidratos não afeta de forma negativa a proteção antioxidante de juvenis de pacu. O presente estudo sugere o desenvolvimento de dietas sustentáveis e adequadas para o pacu (maiores níveis de carboidrato dietético do que as rações comerciais), visto que a espécie possui excelente capacidade de aproveitar fontes não proteicas para geração de energia, poupando desta maneira a proteína para crescimento muscular, sem que haja desequilíbrio redox.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J., URBINATI, E. C. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Research*, v.38, p.36–44, 2007.

AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

ANAND, G., BHAT, I. A., VARGHESE, T., DAR, S. A., SAHU, N. P. AKLAKUR, M. D., KUMAR, S., SAHOO, S. Alterations in non-specific immune responses, antioxidant capacities and expression levels of immunity genes in *Labeo rohita* fed with graded level of carbohydrates. *Aquaculture*, v. 483, p. 76 – 83, 2018.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, v. 3, p. 517-525, 2002.

BEUTLER, E., DUROM, O., KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, p. 882-890, 1963.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254, 1976.

CAMEJO, G., WALLIN, B., ENOJÄRVI, M. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates. *Methods in Molecular Biology*, v. 108, p. 377- 387, 1998.

CASTRO, C., DIÓGENES, A. F., COUTINHO, F., PANSERAT, S., CORRAZE, G., PÉREZ-JIMÉNEZ, A., PERES, H., OLIVA-TELES, A. Liver and intestine oxidative status of gilthead sea bream fed vegetable oil and carbohydrate rich diets. *Aquaculture*, v. 464, p. 665 – 672, 2016.

CHOWDHURY, S., SAIKIA, S. K. Oxidative Stress in Fish: A Review. *Journal of Scientific Research*, v. 12, p. 145-160, 2020.

CLOTFELTER E. D., LAPIDUS S. J. H., BROWN A. C. The effects of temperature and dissolved oxygen on antioxidant defences and oxidative damage in the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Journal Fish Biology*, v. 82, p. 1086–1092, 2013.

COUTINHO, J. J. O., NEIRA, L. M., SANDRE, L. C. G., DA COSTA, J. I., MARTINS, M. I. E. G., PORTELLA, M. C., CARNEIRO, D. J. Carbohydrate-to-lipid ratio in extruded diets for Nile tilapia farmed in net cages. *Aquaculture*, v.497, p. 520-525, 2018.

EISSA, N., WANG, H. P., YAO, H., SHEN, Z. G., SHAHEEN, A. A., ABOU-ELGHEIT, E. N. Expression of Hsp70, Igf1, and three oxidative stress biomarkers in response to handling and salt treatment at different water temperatures in yellow perch, *Perca flavescens*. *Frontiers in Physiology*, v. 8, p. 683, 2017.

ELABD, H., WANG H. P., SHAHEEN, A., YAO, H., ABBASS, A. Antioxidative effects of some dietary supplements on Yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different physical stressors. *Aquaculture Reports*, v.8, p.21–30, 2017.

FARIA, F. P., MARTINEZ, C. B. R., TAKAHASHI, L. S., MELLO, M. M. M., MARTINS, T. P., URBINATI, E. C. Stress and modulation of the innate immune and antioxidant responses by cortisol in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 47, p. 895-905, 2021.

FILICIOTTO, F., CECCHINI, S., BUSCAINO, G., MAC CARRONE, V., PICCIONE, G., FAZIO, F. Impact of aquatic acoustic noise on oxidative status and some immune parameters in gilthead sea bream *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture Research*, v. 48, p. 1895–1903, 2017.

HAFEMAN, D. G., SUNDE, R. A., HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *Journal of Nutrition*, v. 104, p.580-587, 1974.

HEMRE, G. I., MOMMSEN, T. P., KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, v. 8, p. 175-194, 2002.

HERRARA, M., MANCERA, J. M., COSTAS, B. The use of dietary additives in fish stress mitigation: Comparative endocrine and physiological responses. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, p. 447, 2019.

HILTON, J. W., PLISETSKAYA, E. M., LEATHERLAND, J. F. Does oral 3,5,3 α -triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 4, p. 113 - 120, 1987.

KAMALAM, B. S., MEDALE, F., PANSERAT, S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, v. 467, p. 3-27, 2017.

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

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v. 101, p. 13–30, 2011.

MA, H. J., MOU, M. M., PU, D. C., LIN, S. M., CHEN, Y. J., LUO, L. Effect of dietary starch level on growth metabolism enzyme and oxidative status of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, v. 498, p. 482-487, 2019.

MCCORD, J. E., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Journal of Biology and Chemistry*, v.244, p. 6049- 6055, 1969.

NEYRÃO, I. M., BILLER, J. D., TAKAHASHI, L. S., URBINATI, E. C. Modulation of immunity and hepatic antioxidant defense by corticosteroids in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 260, p. 111-125, 2021.

NIMSE S. B, PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, v. 5, p. 27986–28006, 2005.

NIMSE S. B, PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* v.5, p. 27986–28006, 2015.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A., ALBELLÁN, E., ERIZCUN, M., CARDENETE, G., MORALES, A. E., HIDALGO, M. C. Dietary carbohydrates improve oxidative status of

common dentex (*Dentex dentex*) juveniles, a carnivorous fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 203, p. 17-23, 2017.

PINTO, D., PELLEGRIN, L., NITZ, L. F., DA COSTA, S. T., MONSERRAT, J. M., GARCIA, L. Haematological and oxidative stress responses in *Piaractus mesopotamicus* under temperature variations in water. *Aquaculture Research*, v.1, p. 1-11, 2019.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, F. L. T., HANNAS, M. I., SAKOMURA, N. K., PERAZZO, F. G., SARAIVA, A., TEIXEIRA, M. L., RODRIGUES, P. B., OLIVEIRA, R. F., BARRETO, S. L. T., BRITO, C. O. Tabelas brasileiras para aves e suínos [composição de alimento e exigências nutricionais]. 4. Ed. – Viçosa: Departamento de Zootecnia, UFV, 2017.

SARANGARAJAN, R., MEERA, S., RUKKUMANI, R., SANKAR, P., ANURADHA, G. Antioxidants: friend or foe? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.10, p. 1111–1116, 2017.

SCHIEBER, M., CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, v.24, p.453–462, 2014.

SCHRECK C. B., TORT L. The Concept of Stress in fish. In: SCHRECK C. B., TORT L., FARRELL A. P., BRAUNER C. J. *Biology of Stress in Fish*. London: Academic Press p. 1–34, 2016.

STONE, D. A. J. Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science* v. 11, p. 337-369, 2003.

TAKAHASHI, L. S., HA, N., PEREIRA, M. P., BILLER-TAKAHASHI, J. D., URBINATI, E. C. Carbohydrate tolerance in the fruit-eating fish *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture Research*, v. 49, p. 1182-1188, 2018.

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

URBINATI, E. C., ZANUZZO, F. S., BILLER-TAKAHASHI, J. D. Stress and imune system in fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Ed., Elsevier, Academic Press. Amsterdam. p .93-114, 2020.

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

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v. 77, p. 591-625, 1997.

WU, C. L., YE, J. Y., GAO, J. E., CHEN, L., LU, Z. B. The effect of dietary carbohydrate on the growth, antioxidant capacities, innate immune responses and pathogen resistance of juvenils Black carp *Mylopharyngodon piceus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 49, p. 132-142, 2016.

ZHANG, Y., WONG, H. S. Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells? *Journal of Experimental Biology*, v. 224, p. 1-9, 2021.

ZHOU, C., GE, X., LIN, H., NIU, J. Effect of dietary carbohydrate on non-specific immune response, hepatic antioxidative abilities and disease resistance of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 41, p. 183 – 190, 2014.

ZHOU, C., LIU, B., GE, X., XIE, J., XU, P. Effect of dietary carbohydrate on the growth performance, immune response, hepatic antioxidant abilities and heat shock protein 70 expression of Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*. *Journal Applied Ichthyology*, v. 29, p. 1348-1356, 2013.