Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Marina Tenório Botelho

Biomarcadores na avaliação do estado fisiológico de juvenis de beijupirás, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), de cultivo.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Gomes
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Lemos

São Paulo
2017

Marina Tenório Botelho

Biomarcadores na avaliação do estado fisiológico de juvenis de beijupirás, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), de cultivo.

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Oceanografia, área de concentração Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Gomes
Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Lemos

São Paulo
2017

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Biomarcadores na avaliação do estado fisiológico de juvenis de beijupirás, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), de cultivo.

Versão corrigida

Marina Tenório Botelho

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em _____/_____/_____

_____ _____
Prof(a). Dr(a). Conceito

_____ _____
Prof(a). Dr(a). Conceito

_____ _____
Prof(a). Dr(a). Conceito

Sumário

Agradecimentos iii

Resumo v

Abstract vii

Lista de Figuras ix

Lista de Tabelas xi

Lista de Siglas xi

Introdução Geral 1

Parte I: Avaliação do estado fisiológico de juvenis de beijupirás durante o período de engorda em dois sistemas de criação diferentes 3

I. Introdução 4

II. Hipótese 12

III. Objetivo 12

IV. Materiais e métodos 13

IV.1. Pré-teste 13

IV.2. Experimento 13

IV.3. Biometria 18

IV.4. Ensaio cometa 19

IV.5. Ensaio de micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocitárias 24

IV.6. Imuno-histoquímica 25

IV.7. Enzimas da defesa antioxidante 29

IV.8. Análises estatísticas 39

V. Resultados 40

V.1. Parâmetros físico-químicos dos tanques 40

V.2. Biometria 41

V.3. Ensaio cometa 45

V.4. Ensaio de micronúcleo e anormalidades nucleares 46

V.5. Imuno-histoquímica 47

V.6. Enzimas da defesa antioxidante 48

VI. Discussão 52

VII. Conclusão 63

Parte II: Avaliação de dano genotóxico e de atividade enzimática de juvenis de beijupirás (*Rachycentron canadum*) expostos a um hidrocarboneto policíclico aromático de referência (β-naftoflavona) 64

I. Introdução 65
II. Hipótese 68
III. Objetivo 68
IV. Metodologia 69
V. Resultados 72
V.1. Biometria e parâmetros físico-químicos dos tanques 72
V.2. Ensaio cometa 75
V.3. Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares 76
V.4. Enzimas da defesa antioxidante 78
VI. Discussão 80
VII. Conclusão 86
Considerações Finais 87
Referências bibliográficas 90

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Vicente Gomes por toda a ajuda, conselhos e incentivo desde a graduação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Daniel Lemos pelo auxílio na área de aquicultura que foi nova para mim.

À Maria José de Arruda Campos Rocha Passos por todo apoio durante o experimento, as análises no laboratório e na escrita deste trabalho.

Aos meus pais, Marco Tulio Resende Botelho e Vanessa Vilela de Carvalho Tenório de Brito Botelho, por simplesmente serem eles. Por todo apoio, incentivo, ensinamentos e confiança ao longo de toda a minha vida. Amo vocês.

À Vitória Carolina Davis, Marielle Novais Leal e Natália Sommer Faria por me aturarem, incluindo minhas crises, há muitos anos já. A distância nunca afetou a gente e espero que assim continue.

À Thalita Tieko, Nayara Tannure e Mariane Gonzales pela amizade nos anos de São Paulo e por me ajudarem a suportar essa cidade. À Marília Pelellegrino, Mariana Oliva Tomazella e Isabella Goulart pela companhia por todos esses anos morando juntas. À Turma IX pelos bandejões e conversas.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues por todo o suporte e disponibilidade para ensinamento das técnicas de toda a parte enzimática do trabalho e por permitir a utilização do seu laboratório na UNITAU para análise das amostras. À Mariana Feijó, Gustavo Salles, Maria Teresa Oliveira e Larissa Nunes pelo auxílio nas análises enzimáticas.

Ao Prof. Dr. Phan Van Ngan pelos seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco Blasquéz por permitir a utilização do seu laboratório na Faculdade de Medicina Veterinária da USP para confeccionar as lâminas que foram utilizadas na imuno-histoquímica. Ao Diogo Palermo e Juliana Ferrão pela ajuda durante o processo.

Ao pessoal do laboratório Fábio Hasue, Douglas Paschoaleti e Marcelo Satoru por me ajudarem sempre que necessário.

Ao Luis Felipe de Freitas e ao Ricardo Ota pela ajuda em toda a parte experimental deste trabalho, não sei o que eu teria feito sem você em Ubatuba. Um muito obrigada também ao Rodrigo Eiji e Rafael Coelho.

À todos os funcionários da Base do Instituto Oceanográfico "Clarimundo de Jesus" pelo auxílio durante o período que passei lá. Dona Cida, Vânia, Bete, Manoel, Ayrton, Messiana, Lincoln, Sr. Orlando, Zé Luis e Roberto, obrigada!

À CAPES pela bolsa concedida e ao Instituto Oceanográfico por permitir a utilização de toda a sua infra-estrutura.

Resumo

A aquicultura é uma indústria em franco desenvolvimento no mundo todo, apesar de a criação de peixes marinhos no Brasil ainda estar aquém do seu potencial. O beijupirá (*Rachycentron canadum*) é uma espécie que vem despertando interesse dos criadores, devido às suas altas taxas de crescimento, adaptabilidade ao cultivo e aceitação no mercado. As condições de cultura intensiva podem gerar fatores de estresse aos organismos que afetam seu estado fisiológico. Neste trabalho, beijupirás foram cultivados em dois sistemas de criação diferentes, um tanque *indoor* com sistema de circulação de água aberto e um tanque-rede costeiro, e parâmetros genotóxicos, morfométricos e a atividade de enzimas da defesa antioxidante foram comparados ao final de um período de 11 semanas de criação. Não houve diferenças significativas nas taxas de crescimento dos dois tanques, porém o ensaio cometa e o de micronúcleo e demais anormalidades nucleares detectaram um maior dano ao DNA e uma maior frequência de anormalidades nucleares nos peixes mantidos no tanque *indoor*. Esses ensaios mostraram-se muito sensíveis para observar o estado fisiológico de beijupirás em cativeiro. A expressão da proteína p53, que é relacionada a integridade do DNA, foi detectada por imuno-histoquímica e não apresentou diferenças significativas entre os dois tanques, porém o valor da sua expressão foi alto, podendo indicar que a p53 estava ativada para regular os danos ao DNA já existentes e detectados pelo ensaio cometa. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase também não apresentaram diferenças significativas entre os peixes dos dois tanques. A atividade destas enzimas precisa ser melhor estudada, pois não há um padrão de respostas conhecido para as diversas espécies de peixes já estudadas. Também foi realizada uma exposição de beijupirás à β-naftoflavona (BNF) nas concentrações 2mg/kg e 10mg/kg em condições controladas de laboratório para compreender melhor os mecanismos de resposta desta espécie a um composto reconhecidamente tóxico. Foram avaliados parâmetros genotóxicos e enzimas relacionadas à defesa antioxidante. O ensaio cometa não detectou diferenças significativas no dano ao DNA entre os beijupirás dos controles e expostos à BNF, porém o ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares apresentou diferenças significativas entre os peixes expostos às duas concentrações em relação aos controles. Os danos detectados pelo ensaio cometa são quebras reparáveis que acontecem na fita de DNA, enquanto as anormalidades nucleares são danos permanentes, portanto, durante o período de exposição à BNF é

possível que o tempo tenha sido suficiente para o reparo das quebras no DNA. Com relação às enzimas, apenas a catalase apresentou diferenças significativas de atividade, com uma inibição de atividade causada pela BNF em maior concentração em relação ao controle. Analisando-se os dois experimentos, as técnicas de ensaio cometa e micronúcleo e demais anormalidades nucleares indicaram serem as mais sensíveis para um monitoramento de beijupirás de cultivo, com a vantagem de não haver necessidade de sacrifício dos organismos. Ainda são necessários mais estudos com as enzimas da defesa antioxidante, em busca de um padrão na sua resposta a substâncias tóxicas.

Palavras chave: *Rachycentron canadum*, dano genotóxico, defesa antioxidante, p53

Abstract

The aquaculture production is continuously growing in the world, even though the marine fish cultures in Brazil are still smaller than its potential. The intention of rearing the cobia (*Rachycentron canadum*) species is currently increasing due to its high growth rates, adaptability to captivity and acceptance on the market. The intensive culturing conditions may cause stress to the organism, even affecting its physiological state. In this work, cobia has been reared in two different kinds of tanks: the first one was an indoor tank with open water circulation system and the other one was a near shore cage tank. Genotoxic and morphometric parameters and the activity of antioxidant defense enzymes were measured and compared at the end of 11 weeks of culturing. There weren't any significant differences between both tanks on the growth rate, but both the comet assay and the micronuclei and others nuclear abnormalities assay detected higher DNA damage and nuclear abnormalities frequency on the fish that were kept at the indoor tank. The comet and the nuclear abnormalities assays seem to be more sensitive to monitoring the physiological state of cobia during the culture. The protein p53, related to DNA integrity, expression was detected by immunohistochemical and didn't show significant differences, but the value of the expression was high, so it could indicate that p53 was activated to regulate the DNA damage that was detected by the comet assay. The activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase also didn't demonstrate any significant differences between the fish at any of the tanks. As there isn't any known response pattern for the several species of fish that have already been studied, more studies are necessary concerning these enzymes. In addition to the experiment already mentioned, cobia were exposed to β-naphthoflavone (BNF) at concentrations of 2mg/kg and 10mg/kg on laboratory controlled conditions to better understand the response mechanisms of this species to a toxic substance. The genotoxic parameters and the antioxidant defense enzymes activity were measured. The comet assay didn't detect any significant differences between the exposed to BNF and the control groups, however the nuclear abnormalities assay showed significant differences between the two exposed concentrations and the control groups. The DNA damages identified by the comet assay are breaks on the DNA strands, meanwhile, nuclear abnormalities are permanent damages. Therefore, during the exposed period it was possible that the time had been sufficient to repair the breaks on DNA. Catalase activity had significant differences with inhibition of the activity in cobia exposed to BNF of higher concentration, the others

enzymes didn't demonstrate results with significant differences. Looking at both experiments, the comet assay and nuclear abnormalities assay seem to be the most sensitive to cobia's monitoring and they also have the advantage that there is no need to sacrifice the fish. Further studies on the antioxidant defense enzymes are needed in order to find a pattern on its response to toxic compounds.

Key words: *Rachycentron canadum*, genotoxity damage, antioxidant defense, p53.

Lista de Figuras

Figura 1: Tanque *indoor* utilizado para manutenção dos beijupirás durante o período experimental. 16

Figura 2: *Skimmers* utilizados durante o período de criação experimental de beijupirás no tanque *indoor*. A1 e A2 correspondem a um *skimmer* que retêm partículas em suspensão; B1 é um *skimmer* que retém compostos nitrogenados; B2 filtro do interior do *skimmer*..... 17

Figura 3: Classes de dano ao DNA obtidas pelo ensaio cometa de beijupirás..... 23

Figura 4: Tipos de células encontradas em ensaio de micronúcleo de beijupirás..... 25

Figura 5: Padrão de análise para a marcação da expressão da proteína p53 em fígado de beijupirás. 0 representa nenhuma expressão; 1 pouca expressão; 2 expressão moderada e 3 expressão intensa. 29

Figura 6: Testes de diluições para medição da atividade enzimática da catalase em fígado, brânquia, músculo e coração de beijupirá. 32

Figura 7: Mecanismo de visualização da atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) através de um sistema acoplado, sendo GRED a glutationa redutase, GSH a glutationa reduzida e GS-SG a glutationa oxidada..... 33

Figura 8: Testes de diluições para medição da atividade enzimática da glutationa peroxidase (GPx) em fígado, brânquia e coração de beijupirá..... 35

Figura 9: Modelo simplificado para a leitura da atividade da superóxido dismutase (SOD). 36

Figura 10: Testes de diluições para medição da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em fígado, músculo e coração de beijupirá..... 37

Figura 11: Curva padrão para proteínas totais feita com concentrações conhecidas de albumina bovina para a quantificação das proteínas totais das amostras de tecidos de beijupirá. 38

Figura 12: Parâmetros físico-químicos da água dos tanques ao longo do tempo do experimento com beijupirás criados em tanque *indoor* (verde) e tanque-rede (azul). A: Porcentagem de saturação e concentração (mg/mL) de oxigênio dissolvido na água; B: Salinidade e temperatura (°C); C: Concentração de amônia (mg/mL) e nitrito (mg/mL) D: Transparência do tanque-rede medida pela profundidade do Disco de Secchi (cm). 41

Figura 13: Fator de condição de Fulton de beijupirás mantidos em tanque-rede (quadrado) e tanque *indoor* (círculo) durante o pré-teste e o experimento final..... 43

Figura 14: Índice hepato-somático de beijupirás criados em tanque-rede (quadrado) e tanque *indoor* (círculo) durante o pré-teste e o experimento final. 44

Figura 15: Beijupirás coletados com presença de parasitas *Neobenedenia* sp na cabeça (circuladas em branco)..... 44

Figura 16: Controle positivo de ensaio cometa em beijupirás. Os dois primeiros gráficos correspondem a análise computadorizada de imagem e o terceiro a análise visual. As

barras de erro representam o erro padrão das amostras e letras diferentes indicam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10. 45

Figura 17: Ensaio cometa de beijupirás mantidos em dois sistemas de criação diferentes (tanque *indoor* e tanque-rede) durante o experimento final do trabalho. Os dois primeiros gráficos representam a análise computadorizada de imagem e o terceiro a análise visual. As barras de erro representam o erro padrão das amostras e letras diferentes representam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10. .. 46

Figura 18: Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares em beijupirás mantidos em dois sistemas de criação diferentes (tanque *indoor* e tanque-rede). As barras de erro representam o erro padrão das amostras e * representam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10. 47

Figura 19: Resultados dos ensaios imuno-histoquímicos realizados para a detecção da expressão da proteína p53 com beijupirás mantidos em dois sistemas de criação diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da amostra..... 48

Figura 20: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase em fígado, brânquia e músculo de beijupirás criados em dois sistemas diferentes durante o pré-teste. As barras de erro representam o erro padrão das amostras e * representam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10. 49

Figura 21: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase no tecido hepático de beijupirás criados em dois sistemas diferentes durante o experimento final deste trabalho. As barras de erro representam o erro padrão das amostras..... 50

Figura 22: Desenho experimental da exposição de beijupirás à β-naftoflavona (BNF) nos dois experimentos realizados (I1 e I2): controle água, controle óleo de milho e exposição à BNF nas concentrações de 2mg/kg e 10mg/kg..... 70

Figura 23: Porcentagem e concentração (mg/mL) de oxigênio dissolvido no sistema de tanques de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF)..... 72

Figura 24: Salinidade e temperatura do sistema de tanques de manutenção dos beijupirás durante o período de exposição à β-naftoflavona (BNF)..... 73

Figura 25: Peso úmido, comprimento total e comprimento padrão de beijupirás após o período de exposição à β-naftoflavona (BNF). As barras de erro representam o erro padrão das amostras..... 74

Figura 26: Fator de condição de Fulton de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). 74

Figura 27: Índice hepato-somático de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF)..... 75

Figura 28: Ensaio cometa de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). Os dois primeiros gráficos são resultantes da análise computadorizada de imagem e o terceiro gráfico apresenta o resultado da análise visual. As barras de erro representam o erro padrão das amostras e as letras amostras estatisticamente diferentes, considerando-se *p* menor que 0,10. 76

Figura 29: Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares em beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). As barras de erro representam o erro padrão das amostras e as letras amostras estatisticamente diferentes, considerando-se *p* menor que 0,10. 77

Figura 30: Atividade enzimática das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx) no fígado de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). As barras de erro representam o erro padrão das amostras e as letras diferentes amostras estatisticamente diferentes, considerando-se *p* menor que 0,10. 79

Lista de Tabelas

Tabela 1: Formulação da ração Aquamar utilizada para alimentar os beijupirás antes do experimento e durante o período de aclimatação. 14

Tabela 2: Dados biométricos de beijupirás cultivados em dois sistemas diferentes durante o experimento final deste trabalho..... 42

Tabela 3: Comparação entre a atividade enzimática do fígado de beijupirás cultivados em tanque-rede e tanque *indoor* entre o pré-teste e experimento final. 51

Tabela 4: Análise estatística do ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). Os valores destacados são estatisticamente significativos, considerando-se *p* menor que 0,10. 77

Tabela 5: Comparação entre os resultados obtidos pelos biomarcadores utilizados no experimento de cultivo de beijupirás em diferentes tanques e injeção de β-naftoflavona (BNF) nesta espécie. 89

Lista de Siglas

BNF: β-naftoflavona

CAT: Catalase

ENA: Anormalidades nucleares eritrocitárias

EROS: Espécies reativas de oxigênio

FAO: Food and Aquaculture Organization of United Nations

FCA: Fator de conversão alimentar

GPx: Glutationa Peroxidase

HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático

HSI: Índice hepato-somático

ICC: Tampão imuno-histoquímico

ID: Índice de danos

K: Fator de condição de Fulton

PBS: Tampão fosfato salino

SGR: Taxa de crescimento somático

SOD: Superóxido Dismutase

Introdução Geral

O consumo *per capita* de peixe vem aumentando desde a década 1960. Nesta época o consumo médio anual era de 9,9kg, passou para 14,4kg nos anos 1990, chegou a 19,7kg em 2013 e, em 2014 e 2015, o consumo deverá ultrapassar os 20kg, de acordo com os cálculos em andamento da FAO (2016). Considerando a situação de produção relativamente estável da pesca desde o final dos anos 1980, a aquicultura assume um papel muito importante na produção de pescado, sendo que a porcentagem de produção de alimentos pela criação encontra-se em franco crescimento: em 1974 ela era responsável por apenas 7% da produção total, em 1994 já havia aumentado para 26%, em 2004 já correspondia a 39% da produção e em 2014 correspondia a cerca de 44% (FAO, 2016). Avaliando-se apenas a produção de peixes, a porcentagem da aquicultura na produção global aumentou ainda mais: em 2004 ela correspondia a 31,1%, em 2012 a 42,1% e em 2014 ela era de 44,1% da produção mundial (FAO, 2016).

A aquicultura marinha no Brasil ainda é incipiente, apesar de seu grande potencial devido ao clima e ao tamanho do litoral brasileiro. Uma das espécies que tem sido estudada por causa do seu grande potencial para a criação comercial é o beijupirá (*Rachycentron canadum*). Esta espécie é considerada de interesse para a aquicultura devido sua alta taxa de crescimento (LIAO; LEAÑO, 2007), facilidade de desova em cativeiro (FRANKS et al., 2001; ARNOLD et al., 2002; SOUZA-FILHO; TOSTA, 2008), resposta positiva à vacinação (LIN et al., 2006), adaptabilidade ao confinamento, aceitação de dietas extrusadas (CRAIG et al., 2006) e carne de excelente qualidade (LIAO et al., 2004; CRAIG et al., 2006; LIAO; LEAÑO, 2007). Países como China, Taiwan, Estados Unidos (WEIRICH et al., 2004), Porto Rico, Belize, Ilhas Reunião (GAUMET et al., 2007), Japão (NAKAMURA, 2007), Indonésia (WAHJUDI; MICHEL, 2007), México, Tailândia, Irã, República Dominicana, Bahamas, Martinica e Panamá (BENETTI et al., 2008) já possuem relatos de criação com esta espécie, porém apenas a China, responsável por cerca de 80% da produção, e o Taiwan são considerados produtores em larga escala desses peixes (KAISER; HOLT, 2007).

Além da extensa aplicação em monitoramento ambiental (VAN der OOST et al., 2003), os biomarcadores podem ser ferramentas muito úteis para o aprimoramento da

aquicultura e monitoramento do estado fisiológico dos organismos em cativeiro. Eles são capazes de detectar alterações nos organismos que podem ocorrer tanto em níveis celulares, bioquímicos, moleculares ou fisiológicos (LAM; GRAY, 2003), devido a fatores endógenos e exógenos de diferentes fontes. Estas alterações podem comprometer o crescimento, a engorda, o desenvolvimento gonadal, a reprodução e a capacidade imunológica (PRUNET et al., 2012; NAKANO et al., 2013; SKULSTAD et al., 2013; GOOD et al., 2014; HOSEINI et al., 2015). Além de ser possível realizar testes para verificar os motivos de uma redução de crescimento dos peixes criados, os biomarcadores podem esclarecer diversos problemas na criação como, por exemplo, a tolerância dos organismos à hipoxia, a compostos nitrogenados, a contaminantes e a variações na qualidade ambiental (RODRIGUES et al., 2011; PRUNET et al., 2012; MAHFOUZ et al., 2015; KALANTZI et al., 2016), mesmo antes que a saúde do animal esteja muito comprometida ou que a mortalidade ocorra. Outra aplicação extremamente promissora dos biomarcadores é no estudo das respostas dos indivíduos a suplementos alimentares e novas formulações das rações (LIU et al., 2010; LIU et al., 2013).

Antes de utilizar os biomarcadores no ambiente é sempre recomendável realizar testes em laboratório com diferentes concentrações de uma substância de referência para avaliar a resposta do organismo em condições controladas (VAN der OOST et al., 2003). Conhecendo-se as respostas fisiológicas em um experimento controlado de laboratório, torna-se mais fácil avaliar as respostas obtidas no ambiente com todas as suas flutuações naturais inevitáveis.

O objetivo inicial deste trabalho foi verificar a eficiência de biomarcadores para avaliar alguns aspectos do estado fisiológico de beijupirás criados em dois sistemas diferentes, utilizando biomarcadores genotóxicos e enzimáticos. Como não foi encontrado nenhum controle de laboratório com esta espécie na literatura, também foi realizado um experimento preliminar com exposição de indivíduos desta espécie a uma substância de toxicidade conhecida em outros peixes, a β-naftoflavona (BNF).

Parte I: Avaliação do estado fisiológico de juvenis de beijupirás durante o período de engorda em dois sistemas de criação diferentes

I. Introdução

A produção proveniente da aquicultura no Brasil teve um grande crescimento nas últimas décadas. Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2012), em 1980 eram produzidas 808,6 mil toneladas de produtos, destas 804,9 mil toneladas provenientes da captura e apenas 3,7 mil toneladas da aquicultura; já em 2011 foram produzidas 1432,6 mil toneladas, sendo 803,3 mil toneladas vindas da captura e 629,3 mil toneladas da aquicultura. Nos últimos 30 anos, a captura de pescado no Brasil se manteve praticamente estável e todo o aumento na produção disponível no mercado foi devido ao crescimento da aquicultura. Em 2014, foram produzidos, em nosso país, 562,2 mil toneladas de derivados da aquicultura, sendo os principais produtos peixes de água doce (474,3 mil toneladas), moluscos (22,1 mil toneladas) e crustáceos (65,1 mil toneladas) (FAO, 2016).

Ainda que a maior parte da aquicultura no Brasil se concentre em peixes de água doce e invertebrados marinhos, há um crescimento na demanda de peixes marinhos, já que entre 1980 e 2011 houve uma diminuição de 10% da produção pesqueira (FAO, 2012). Devido ao tamanho do litoral e à demanda do mercado, a piscicultura marinha apresenta grandes possibilidades, apesar de ainda ser incipiente. Existem iniciativas de pesquisa dirigidas para algumas espécies como beijupirá (*Rachycentron canadum*), robalo-peva e flecha (*Centropomus parallelus* e *C. undecimalis*) e linguado (*Paralichthys orbignyanus*). Existe ainda algum interesse na criação de tainha (*Mugil liza*), cioba (*Lutjanus analis*), garoupa (*Epinephelus marginatus*), pampo (*Trachinotus marginatus* e *T. carolinus*) e peixe-rei (*Odonthestes argentinensis*) (HAMILTON et al., 2013).

O beijupirá foi a espécie alvo deste trabalho, por ser uma das principais candidatas para a criação de peixes marinhos em larga escala no Brasil. Ele é encontrado em todo o litoral do país, e distribui-se em águas tropicais e subtropicais de todos os continentes. É uma espécie nerítica e epipelágica de hábito natatório ativo e comportamento migratório (SHAFFER; NAKAMURA, 1989). Seu hábito alimentar é predador incluindo, em sua dieta, nécton e zoobentos, alimentando-se preferencialmente de peixes e crustáceos, embora possa eventualmente consumir bivalves (MEYER; FRANKS, 1996; ARENDT et al., 2001).

A criação desta espécie foi iniciada em Taiwan em 1995 e, devido ao sucesso, sua produção comercial começou a crescer paralelamente ao desenvolvimento de técnicas para produção em massa de juvenis (LIAO et al., 2004). Atualmente, naquele país, a criação é feita em tanques-rede e a produção é destinada ao mercado interno e à exportação para o Japão (LIAO; LEAÑO, 2007; MIAO et al., 2009). Após o sucesso da criação em Taiwan, a produção de beijupirás começou a se expandir para as demais partes do mundo. Existem relatos de criação e iniciativas de pesquisa na China (ZHOU et al., 2016), Vietnã (HUY et al., 2006), Taiwan (LIAO et al., 2004), Estados Unidos (WEIRICH et al., 2004; RICHE et al., 2013), Porto Rico, Belize, Ilhas Reunião (GAUMET et al., 2007), Japão (NAKAMURA, 2007), Indonésia (WAHJUDI; MICHEL, 2007), México, Tailândia, Irã, República Dominicana, Bahamas, Martinica, Panamá, Austrália, Ilhas Marshall (BENETTI et al., 2008) e Índia (GOPAKUMAR et al., 2012; PHILIPOSE et al., 2013). Trabalhos mais recentes, como os de Benetti et al. (2010), Guo et al. (2015), Petersen et al. (2015), Tien et al. (2016) e Zhou et al. (2016), apenas citam os anteriores.

Houve um crescimento na produção desta espécie nos últimos anos: em 2000, eram produzidas 2,6 mil toneladas sendo o Taiwan o único produtor com dados de produção; em 2003, a China também passou a ter uma produção significativa com o total produzido aumentando para 18,6 mil toneladas e, desde então, ela é o maior produtor da espécie; em 2008, o Vietnã também passou a apresentar uma grande produção e a produção mundial era de 26,5 mil toneladas; em 2012, a produção era de 40,1 mil toneladas e, em 2014, de 40,3 mil toneladas (FAO, 2011-2016). Entre 2001 e 2014, países, como Bahamas, Belize, Colômbia, República Dominicana, Martinica, Mayotte, Panamá, Porto Rico e Singapura, apresentaram uma pequena produção segundo o FishStatJ® (plataforma de dados de pesca e aquicultura da FAO), porém destes apenas o Panamá vinha apresentado um constante crescimento até 2014. No Brasil, foram feitos testes em fazendas *offshore* em Recife e em pequenos empreendimentos próximos à costa no litoral de São Paulo e do Rio de Janeiro e todas essas formas se mostraram economicamente viáveis com produções de cerca de 316 toneladas na primeira e 3,7 toneladas na segunda (BEZERRA et al., 2016). Não há dados da produção brasileira de beijupirás na FAO, mas entre 2013-2014 foram produzidas aproximadamente 25 toneladas nas fazendas pequenas em tanques-rede

costeiros e estima-se que esta produção aumente para cerca de 110 toneladas em 2014-2015 (ROMBENSO et al., 2015).

O grande interesse no desenvolvimento da aquicultura de beijupirás reside principalmente na sua alta taxa de crescimento (LIAO; LEAÑO, 2007), facilidade de desova em cativeiro (FRANKS et al., 2001; ARNOLD et al., 2002; SOUZA-FILHO; TOSTA, 2008), relativa tolerância às variações de salinidade (FAULK; HOLT, 2006), resposta positiva à vacinação (LIN et al., 2006), adaptabilidade ao confinamento, aceitação de dietas extrusadas (CRAIG et al., 2006) e carne de excelente qualidade (LIAO et al., 2004; CRAIG et al., 2006; LIAO; LEAÑO, 2007).

Os maiores problemas encontrados ao longo dos anos de criação se referem principalmente à alimentação, patógenos e necessidade de mais pesquisas para um melhor conhecimento da espécie. Em alguns países, como China, Taiwan e Vietnã, ainda se utilizam restos de peixe e espécies de pequeno tamanho sem valor comercial como alimentação das criações de beijupirás, porém a oferta destes peixes é limitada (TIEN et al., 2016; ZHOU et al., 2016). O desenvolvimento da formulação de rações também está atrasado se comparado com a de outros peixes marinhos que são criados em larga escala, como salmão, e, apesar dos diversos estudos que estão sendo realizados, ainda não se sabe, com maior profundidade, as exigências nutricionais da espécie (TIEN et al., 2016). Com relação aos patógenos, *Photobacterium damselae* e *Streptococcus iniae* são as principais bactérias encontradas que causam grandes taxas de mortalidade e, por esse motivo, estão sendo testados antibióticos que tratam e previnem a contaminação por essas bactérias (GUO et al., 2015). Outros tipos de parasitas, como o dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* e o platelminto *Neobenedenia* sp., também causam redução no crescimento e altas taxas de mortalidade nas criações (LIAO et al., 2004). Apesar dos diversos estudos já realizados, ainda não se sabe as características de um ambiente ótimo para o crescimento de beijupirás, as exigências nutricionais de indivíduos nas diferentes fases do ciclo de vida e as respostas da espécie às diferentes situações de estresse ambiental; por isso ainda são necessários estudos básicos sobre essa espécie para otimizar o processo produtivo (SUN; CHEN, 2014). Este trabalho possui uma vertente principalmente dirigida a um maior conhecimento da espécie, buscando metodologias que permitam avaliar melhor as respostas fisiológicas dos beijupirás em relação a estressores presentes no cultivo.

No Brasil, apesar do interesse na criação do beijupirá, os estudos sobre a piscicultura da espécie ainda são escassos (CAVALLI; HAMILTON, 2009; YASUMARU et al., 2014). A reprodução em cativeiro já ocorre regularmente com o uso de reprodutores capturados no mar, porém a produção de juvenis ainda é limitada, mas suficiente para atender a pequena demanda do mercado. Há, no entanto, necessidade de melhorar a tecnologia de criação de larvas, pois as tentativas de larvicultura em larga escala ainda não alcançaram o sucesso obtido em outros países (CAVALLI; HAMILTON, 2009). Estudos de crescimento do beijupirá em águas brasileiras costeiras vêm apresentando resultados promissores (SAMPAIO et al., 2011). Apesar de o crescimento ainda ser inferior a outros países, como Reino Unido, Indonésia, Japão e Caribe, há como melhorar a qualidade das rações disponíveis, que ainda não são de ótima qualidade, e os processos de larvicultura e produção de juvenis, já que os juvenis produzidos também apresentam um crescimento inferior se comparado ao de outros países (SAMPAIO et al., 2011).

O ciclo produtivo do beijupirá ainda está em estudo, porém o método de criação mais bem estabelecido é o do Taiwan, por ser esse o país onde esta atividade está desenvolvida por um maior período de tempo. Neste país, o período de crescimento de 10-20g até 1000g, peso no qual os peixes podem ser transferidos para tanques-rede *offshore*, é feito em viveiros e tanques-rede, ambos próximos à linha de costa (LIAO et al., 2004). Porém, devido à dependência das condições climáticas destas duas formas de criação, principalmente durante o inverno dos países do hemisfério norte, há tentativas de desenvolvimento de alternativas, em condições ambientais controladas *indoor*, para a criação destes juvenis (WEBB Jr. et al., 2007). Neste nosso trabalho, os organismos foram criados em tanque-rede localizados na região costeira e também em tanque *indoor* com sistema de circulação de água aberto, que por se encontrar em um local fechado facilitaria o controle das condições ambientais, por estar menos exposto às flutuações das mesmas. Ao final do período experimental, foi feita uma avaliação do estado fisiológico dos organismos criados nas duas condições.

Existe uma grande variedade de tipos de tanques-rede, tanto em relação a sua forma, como material utilizado, sendo quatro os tipos básicos principais: fixo, flutuante, submersível e submerso. Beveridge (2004) descreveu estes quatro tipos básicos conforme explicado a seguir. Os tanques fixos consistem em redes suportadas por estruturas que vão da superfície ao fundo de um rio, lago ou enseada, e são comumente

usados em países tropicais, como as Filipinas; seu custo de produção é baixo e sua estrutura é simples de construir, porém são restritos a ambientes abrigados com solo adequado e possuem forma e tamanho limitados. Já os tanques-rede flutuantes, que foram utilizados neste trabalho, são os mais empregados, sendo sua rede suportada por um colar ou um quadro flutuante, com uma grande variação de tamanhos e formas; os colares flutuantes podem ser confeccionados de maneira simples utilizando apenas boias e cordas, porém, desta forma, o manejo é dificultado. Por esse motivo, é mais comum que o colar seja mais largo e rígido de forma a facilitar a manutenção. Caso o local seja muito dinâmico, é mais comum que o colar seja flexível. Os tanques-rede submersíveis, ao contrário dos demais, não possuem um colar e, sim, uma aparelhagem ou um quadro que mantém sua forma; a principal vantagem perante as outras formas é que pode-se mudar a posição do tanque na coluna d'água, não havendo a exploração de só uma região; os tanques são mantidos na superfície em períodos de calmaria e são submersos quando o tempo está com condições adversas ou quando ocorre um *bloom* de algas. Por sua vez, os tanques-rede submersos são mais utilizados na aquicultura *offshore*, possuem um grande número de modelos propostos, porém ainda são pouco utilizados; é uma solução alternativa para minimizar o impacto do estresse mecânico causado pelas ondas, porém possui um maior custo, já que a maior parte do manejo da criação deve ser mecanizado (como o processo de alimentação e o sistema de monitoramento), devido à dificuldade e ao custo de se chegar ao local (PAPANDROULAKIS et al., 2013).

As principais vantagens dos tanques-rede são requerer um investimento mais baixo em relação a outras formas de criação, fácil instalação, em casos de emergência pode ser movido para outro lugar e a despesca é facilitada. Como desvantagens, há a dificuldade de controlar a qualidade da água, pode ocorrer perda de ração, caso ela não seja completamente consumida enquanto passa pelo tanque, e há maior possibilidade de furtos.

Já os tanques *indoor* são aqueles localizados em terra e podem ser construídos de diversos materiais, como fibra de vidro e lona com armações de metal. Esses tanques podem ser abastecidos por um sistema fechado, no qual há um sistema de recirculação e filtração da água utilizada, ou por um sistema aberto, no qual a água é constantemente renovada e não é reaproveitada no sistema. Como vantagem possui uma maior facilidade de manejo e como desvantagem há uma necessidade de um grande volume de água em regiões próximas, gastos com manutenção da qualidade da água e aeração.

As condições de cultura intensiva próprias da aquicultura podem gerar fatores estressantes decorrentes, por exemplo, do aumento da agressividade no sistema de criação. Uma das consequências do estresse é a elevação da atividade metabólica, com consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que interferem nos mecanismos homeostáticos dos animais (SAHIN et al., 2014). Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons com elétrons livres na sua órbita, por isso possuem uma instabilidade muito grande, meia vida muito curta e uma alta capacidade reativa. Os radicais livres são fundamentais para o bom desenvolvimento do organismo, já que são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células para a geração de ATP. Quando em excesso, entretanto, estes compostos podem causar sérios danos, tais como oxidação de membrana lipídica, proteínas, alteração no balanço das reações de redução-oxidação (redox) e nos ácidos nucleicos da célula (BIHARI; FANFADEL, 2004; OLIVEIRA et al., 2008; MACHADO et al., 2014a).

Os agentes estressores podem, portanto, causar efeitos em diversos níveis de organização dos indivíduos, incluindo o DNA que está na base da maioria dos outros processos de níveis mais elevados de organização. Dentre os radicais livres resultantes da aceleração das reações metabólicas, destacam-se o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxilado ($OH^{\bullet}$), o hidroperóxido ($H_2O_2^{\bullet}$), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$) (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Ainda que o radical hidroxilado possua maior reatividade na indução de lesões nas moléculas celulares, o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (ANDERSON, 1996).

Danos ao material genético já foram associados à redução do crescimento, anormalidades no desenvolvimento e diminuição na sobrevivência de larvas, juvenis e adultos de uma grande variedade de organismos aquáticos (LEE; STEINERT, 2003), fatores fundamentais para o bom desenvolvimento de uma criação. O ensaio cometa é um método muito utilizado para a detecção desses danos por ser relativamente rápido, de baixo custo, alta sensibilidade e requerer um pequeno número de células (GOMES et al., 2012; ROCHA et al., 2012; HASUE et al., 2013). Basicamente, ele consiste em uma eletroforese que separa o DNA intacto daquele fragmentado por algum agente estressor. Ao migrar, devido à carga elétrica, o DNA fragmentado forma uma cauda dando ao núcleo um aspecto de cometa. O aspecto e medidas relativas aos cometas podem ser

avaliados visualmente ou em programas de análise de imagens, permitindo que se relacione a quantidade de fragmentos com o grau, o tipo de contaminação, o ambiente, etc (SINGH et al., 1988).

Os danos ao material genético, detectados pelo ensaio cometa, podem ser de diferentes intensidades e, em grande parte, podem ser reparáveis por mecanismos complexos controlados por proteínas específicas, como a p53. Esta é conhecida por ser supressora de tumores e possui um importante papel na regulação da apoptose e proliferação celular, sendo que a geração de EROS, induzida pelo estresse celular, pode regular a atividade da p53 (CHENG et al., 2015). Em células normais, esta proteína encontra-se em estado latente, não interferindo no destino celular. Quando as células são expostas a estressores, a p53 pode ser rapidamente ativada, induzindo a paralisação do ciclo celular na fase *G1*, o que permite o reparo do DNA antes da fase *S* da replicação (OREN et al., 2002). Se o dano for irreparável, mecanismos de apoptose são ativados para eliminar a célula (CARDOSO, 2013). Muitos estudos já provaram que a p53 possui respostas regulatórias relacionadas a uma grande variedade de estressores celulares (IBRAHEM; IBRAHIM, 2014). Neste trabalho, foi analisada a expressão da p53, através de ensaios imuno-histoquímicos.

Outro ensaio confiável e de fácil execução relacionado à genotoxicidade é o de identificação de micronúcleos e outras anormalidades nucleares. Os micronúcleos fazem parte dos danos irreparáveis e consistem de pequenos corpos contendo DNA formados por fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal após a anáfase, na divisão mitótica; a formação dos micronúcleos pode ocorrer espontaneamente ou induzida por variações ambientais e poluição (AL-SABTI; METCALFE, 1995). O ensaio de micronúcleo é uma técnica simples, muito empregada, com a vantagem de poder ser utilizada em qualquer população de células proliferativas (CAMPOS, 2007). Essa técnica consiste, basicamente, em identificar e quantificar os micronúcleos e outras anormalidades genéticas na forma do núcleo (CARRASCO et al., 1990). Apesar de os mecanismos de deformação dos eritrócitos nucleares ainda não serem bem explicados e não haver um consenso sobre suas reais causas, é aconselhável que ao se realizar o ensaio cometa, também se realize o esfregaço para análise de micronúcleos, já que seu procedimento é simples e rápido, além de fornecer uma análise distinta, porém complementar, da genotoxicidade (STRUNJAK-PEROVIC et al., 2009; MARTINS; COSTA, 2015).

Além do micronúcleo, as outras anormalidades nucleares, como núcleos lobados, segmentados e reniformes, também podem ser avaliados, pois, em peixes, já foi demonstrada uma correlação positiva entre micronúcleos e as demais anormalidades, apesar da frequência de ocorrência do primeiro ser bem menor (STRUNJAK-PEROVIC et al., 2009).

Ainda não há registros de trabalhos com ensaio cometa, expressão da proteína p53 e teste de micronúcleo e demais anormalidades nucleares com beijupirás, o que reforça o interesse em aplicá-las para avaliar o potencial de sua utilização na identificação de lesões genotóxicas em indivíduos dessa espécie.

Organismos aeróbicos possuem diferentes mecanismos de defesa antioxidante, os quais podem ser não-enzimáticos ou enzimáticos. Dentre os mecanismos enzimáticos que atuam diretamente na redução e decomposição das EROS, estão incluídas a ação da superóxido dismutase (SOD), da glutationa peroxidase (GPx) e da catalase (CAT). A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, que é subsequentemente transformado pela GPx, que faz uso de alguns redutores e peróxidos como co-substratos produzindo água e produtos reduzidos. A enzima CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio (LESSER, 2006). Estas três enzimas são importantes na defesa da integridade celular, pois verificou-se que uma significativa redução na produção de EROS ocorre quando o nível delas é mais alto (CHENG et al., 2015). Diversos estudos já foram realizados, utilizando a atividade destas enzimas em *R. canadum*, para testar diferentes tipos de ração, diferentes salinidades e temperaturas (YANG et al., 2007; LIU et al., 2010; GUO et al., 2011; ZHOU et al., 2011; ZHOU et al., 2012; LIU et al., 2013), por isso também é importante avaliar se a forma de criação também pode alterar estes níveis.

II. Hipótese

O estado fisiológico, avaliado pelos métodos propostos, de beijupirás, em fase de engorda, mantidos em tanque-rede é melhor do que o daqueles mantidos em tanques *indoor* com sistema aberto de circulação de água.

III. Objetivo

Este trabalho tem como objetivos estabelecer e padronizar metodologias aplicáveis em beijupirás para analisar efeitos do estresse oxidativo e utilizar este protocolo para avaliar o estado fisiológico de indivíduos desta espécie. Para isso foram estipulados os seguintes objetivos específicos:

- Estimar o crescimento dos indivíduos durante o período experimental;
- Avaliar o dano genotóxico dos organismos por meio do ensaio cometa e ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares;
- Quantificar a atividade das enzimas glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase;
- Mensurar a expressão da proteína p53 por meio da técnica imuno-histoquímica;
- Comparar o crescimento, o dano genotóxico e o estresse oxidativo dos peixes criados nos diferentes sistemas, utilizando os resultados obtidos pela aplicação dos métodos selecionados.

Os experimentos foram realizados com animais em período de engorda, mantidos em tanque *indoor* com sistema aberto de circulação de água e em tanque-rede localizado próximo à região costeira.

IV. Materiais e métodos

IV.1. Pré-teste

Foi realizado um pré-teste em abril de 2015 para coleta de amostras visando o estabelecimento da metodologia a ser utilizada no experimento com os beijupirás. Para este teste, foram coletados 10 peixes das duas condições distintas, sendo 5 provenientes do tanque-rede localizado no Saco da Ribeira e 5 do tanque *indoor*. Estes foram os mesmos tanques onde foi realizado o experimento final. Os peixes eram remanescentes de experimentos anteriores e, por esse motivo, não havia dados exatos sobre densidade e período de permanência nos dois locais. Sabe-se apenas que, inicialmente, todos os peixes estavam alocados no tanque *indoor* e foram transferidos para o tanque-rede à medida que foram crescendo.

Em novembro de 2015 foi realizado outro pré-teste para estabelecimento das condições do ensaio cometa, sendo também realizado o controle positivo do método. Apenas os resultados do controle positivo foram apresentados, pois os demais testes de metodologia do ensaio cometa foram referentes apenas ao estabelecimento da melhor diluição para as amostras. Todos os procedimentos estão detalhados abaixo.

IV.2. Experimento

Os beijupirás utilizados para este experimento foram obtidos da Rede Mar Alevinos, localizada em Ilha Bela, em dezembro de 2014. Eles foram mantidos na Base do Instituto Oceanográfico da USP "Clarimundo de Jesus", em Ubatuba. Os alevinos foram mantidos inicialmente no tanque *indoor* até atingirem um tamanho aproximado de 150g, sendo então, transferidos para os tanques-rede. Um maior detalhamento dos tanques será dado nas secções IV.2.2 e IV.2.3.

Com um peso aproximado de 400g, os juvenis de beijupirás foram divididos entre o tanque-rede e o tanque *indoor*, mantendo-se uma densidade média de 1,5kg/m³ nos dois tanques para iniciar a fase experimental realizada de 1° de setembro a 30 de novembro de 2015. Dentro desse período de tempo, 2 semanas foram consideradas como de aclimatação dos organismos aos sistemas de criação após o manuseio. Durante o mesmo, um indivíduo morto era reposto por outro de peso semelhante. Passado esse tempo, as 11 semanas restantes foram consideradas como período experimental, não havendo mais reposição dos mortos.

IV.2.1. Transporte e aclimatação

Antes de serem transferidos para os respectivos tanques os organismos passaram por um banho de água doce com óleo de cravo (1,0mL de óleo de cravo para cada 10L de água) que variou entre 5 a 7 minutos. O banho de água doce possui a função de matar possíveis parasitas que os peixes poderiam ter e o óleo de cravo foi utilizado como anestésico para facilitar a pesagem dos organismos e minimizar o estresse.

Após serem anestesiados e antes de serem colocados nos tanques, os peixes foram pesados em balança digital portátil e seus pesos foram contabilizados de forma que a densidade dos dois tanques fosse aproximadamente 1,5kg/m³ e a média de peso dos indivíduos de cada tanque fosse similar.

A transferência para o tanque *indoor* foi realizada utilizando-se redes de 1m x 1m x 1m e malha 25mm de nó a nó dentro de caixas de água de 200L com água do mar. Já para o tanque-rede, os peixes foram apenas transferidos de um compartimento para outro.

Com relação à alimentação, os organismos, antes de iniciar o experimento, eram alimentados com a ração Aquamar 01 (Tabela 1), desenvolvida pela equipe do Laboratório de Aquicultura Marinha, sob coordenação do Prof. Dr. Daniel Lemos, e, durante o experimento, os peixes foram alimentados com ração comercial Matsuda®. Esta troca de ração foi realizada gradualmente durante o período de aclimatação misturando-se as duas rações até que os peixes se acostumassem com a ração comercial. Essa ração é bastante utilizada em sistemas de criação de peixes.

Tabela 1: Formulação da ração Aquamar utilizada para alimentar os beijupirás antes do experimento e durante o período de aclimatação.

Aquamar 01	
Ingrediente	**%**
Glúten de trigo	5
Farinha de peixe nacional	50
Farinha de vísceras de aves	10
Farinha de lula	10
Farinha de sangue	3
Farinha de trigo	10
Lecitina de soja	1
Óleo de peixe	5
Aquavit	4
Premix de vitaminas e minerais	1
Cr_2O_3	0,5
Taurina	0,5

IV.2.2. Tanque-rede

O tanque-rede era localizado no Saco da Ribeira em frente à Base do Instituto Oceanográfico em Ubatuba, SP. O Saco da Ribeira encontra-se em direção oeste em relação a Enseada do Flamengo, a qual é orientada aproximadamente na direção Norte-Sul e abre-se diretamente para o mar; seu declive é suave com máximo de profundidade de cerca de 25m próximo à Ilha Anchieta; sua linha de costa é constituída predominantemente por costões rochosos bastante recortados; a região de toda a enseada possui uma circulação moderadamente intensa e é protegida das vagas de alto mar, devido à orientação e profundidade; como quase não existem cursos d'água que drenam a região, a água doce que flui para o Saco da Ribeira não possui muita influência na área, sendo que o maior carregamento sedimentar e detrítico ocorre em épocas de maior precipitação (SASSI; KUTNER, 1982).

O tanque-rede possuía um formato quadrado com as dimensões de 3m de largura e comprimento e 1,2m de profundidade, totalizando um volume de 10.000L. A malha de rede utilizada foi de 25mm de nó a nó. Neste tanque, foram colocados 43 peixes com peso médio de 466,98 ± 26,69g.

A alimentação dos organismos do tanque-rede era feita diariamente, até a saciedade, em um horário próximo ao de alimentação do tanque *indoor*. Uma determinada quantidade de ração, em excesso, era pesada antes do oferecimento, e o que restava era também pesado; a diferença entre pesos foi considerada como a quantidade consumida. A alimentação foi feita apenas uma vez ao dia, pois não há diferenças significativas entre o crescimento de *R. canadum* alimentados com uma mesma quantidade fracionada em uma, duas, três, quatro e seis vezes ao dia (COSTA-BOMFIM et al., 2014).

Com relação aos parâmetros ambientais, inicialmente a temperatura da água, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido, porcentagem de saturação de oxigênio (todas feitas com um oxímetro da YSI® modelo "85 *Oxygen, Conductivity, Temperature & Salinity*"), nível de turbidez (medida com Disco de Secchi), pH, concentração de nitrito e concentração de amônia (medidas com kits de aquário da Alfakit® e LabconTest®) eram medidos todos os dias, porém, devido à constância dos três últimos, estes passaram a ser medidos uma vez por semana e os demais continuaram a ser medidos diariamente.

IV.2.3. Tanque *indoor*

O tanque *indoor* está instalado na Base "Clarimundo de Jesus" do Instituto Oceanográfico da USP em Ubatuba, SP. Seu formato é circular com dimensões de 4,95m de diâmetro e 0,7 m de altura (Figura 1), totalizando um volume de água de 13.000L. Nele foram colocados 56 beijupirás com peso médio de 470,71 ± 15,92g.

Figura 1: Tanque *indoor* utilizado para manutenção dos beijupirás durante o período experimental.

Seu sistema de circulação de água era do tipo aberto, com uma bomba para recirculação da água do tanque e aeração da mesma. O tanque também possuía um sistema para entrada e saída constante de água nova do mar com uma vazão de 18L/min. Como sistema de filtração de água haviam dois *skimmers*, um que funcionava como uma barreira de retenção de detritos e o outro como um filtro de água; o primeiro *skimmer* tinha como principal função a retirada de fezes e a capa envoltória das fezes dos organismos e o segundo *skimmer* era utilizado para remoção de compostos nitrogenados, pois era dotado de um sistema de filtração (Figura 2). O tanque foi sifonado diariamente pela manhã com troca de 80% do volume de água no início do experimento e a partir da 7ª semana o sifonamento passou a ser realizado duas vezes por dia, pela manhã e pela tarde.

O alimento foi fornecido uma vez ao dia após o procedimento de limpeza do tanque, sendo a ração pesada em excesso antes do oferecimento e o que restava após

alimentação também era pesado para, pela diferença, calcular o total consumido. A alimentação era realizada apenas uma vez ao dia, pois não foram constatadas diferenças significativas entre o crescimento de *R. canadum* alimentados com uma mesma quantidade fracionada em uma, duas, três, quatro e seis vezes ao dia (COSTA-BOMFIM et al., 2014).

Os parâmetros ambientais foram medidos diariamente antes do procedimento de limpeza dos tanques. A temperatura da água, salinidade, concentração de oxigênio dissolvido e percentual de saturação do oxigênio foram medidos pelo oxímetro da YSI® modelo "85 *Oxygen, Conductivity, Temperature & Salinity*" , a concentração de nitrito e amônia e o pH eram medidas por kits de aquário da Alfakit® e LabconTest®.

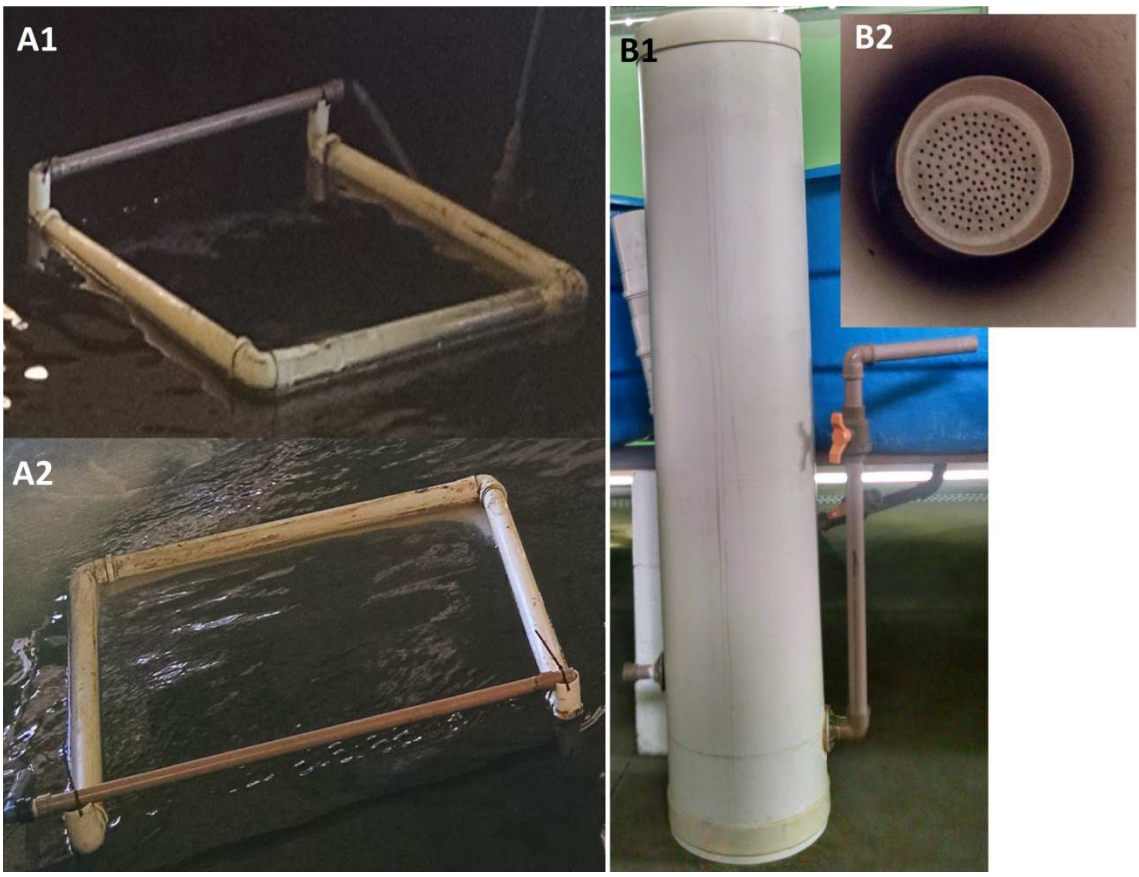

Figura 2: *Skimmers* utilizados durante o período de criação experimental de beijupirás no tanque *indoor*. A1 e A2 correspondem a um *skimmer* que retêm partículas em suspensão; B1 é um *skimmer* que retém compostos nitrogenados; B2 filtro do interior do *skimmer*.

IV.3. Biometria

No início e ao final do experimento todos os organismos tiveram suas massas úmidas medidas em balança digital portátil. Ao final, o comprimento total, o comprimento padrão e a massa úmida do fígado de 10 indivíduos de cada local de criação também foram medidos, os dois primeiros em ictiomêtro e o terceiro em balança digital semi-analítica. No pré-teste, os mesmos parâmetros foram avaliados em 10 peixes, sendo 5 de cada sistema de criação. Todos os organismos amostrados nos dois experimentos eram sexualmente imaturos.

O fator de conversão alimentar (FCA) foi calculado por meio da divisão da quantidade total de ração consumida (kg) pelo ganho de biomassa (kg) após o período experimental.

IV.3.1. Fator de condição de Fulton

O fator de condição de Fulton (K) foi calculado, conforme a seguinte fórmula:

$$K = 100 \times (WW \div L^3)$$

sendo WW a massa corpórea úmida e L o comprimento padrão (RICKER, 1975). Também foram calculados a média e o erro padrão dos conjuntos de indivíduos amostrados provenientes de cada forma de criação.

IV.3.2. Crescimento somático

Com base no peso médio inicial e final do experimento foi calculada a taxa de crescimento somático (SGR) com a média de peso dos peixes para cada sistema de criação, conforme a seguinte expressão:

$$SGR = (e^g - 1) \times 100$$

sendo

$$g = (\ln(W_2) - \ln(W_1)) \div (t_2 - t_1)$$

onde W_2 e W_1 são as médias de massa corpórea nos dias t_2 e t_1, respectivamente (IMSLAND et al., 2001).

IV.3.3. Índice hepato-somático

O índice hepato-somático (HSI) foi calculado para todos os organismos amostrados de cada forma de criação, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{HSI} = \frac{\text{massa total do fígado}}{\text{massa total do indivíduo}} \times 100$$

(BUSACKER et al., 1990). Também foram calculados a média e o erro padrão dos conjuntos de peixes de cada forma de criação.

IV.4. Ensaio cometa

O ensaio cometa detecta quebras na fita do DNA por meio da migração dos fragmentos, durante a eletroforese, formando uma espécie de cauda ao redor do núcleo. Assim, quanto maior a quantidade de quebras no DNA de uma célula, maior será a cauda do cometa, sendo possível analisar qualitativamente o dano ao DNA do indivíduo.

Neste trabalho, o ensaio cometa foi realizado conforme descrito por Singh et al. (1988) com modificações baseadas nos protocolos de Tice et al. (2000) e Gontijo e Tice (2003).

Todo o procedimento do ensaio cometa até a fixação das lâminas foi realizado no escuro, para evitar que ocorram quebras no DNA devido à exposição à luz. O procedimento foi realizado no frio, com soluções geladas, para evitar danos ao material biológico e que o gel descole das lâminas.

IV.4.1. Preparação das lâminas e coleta de sangue

Antes do início do experimento todas as lâminas e lamínulas foram lavadas com detergente, Extran 10%, água destilada e álcool.

As lâminas foram previamente preparadas com uma camada de gel de agarose NMP (*Normal Melting Point*) 1,5%, sendo a agarose dissolvida em água. Para a preparação das lâminas o gel foi mantido em banho de aquecimento a 60°C. Uma lâmina por vez foi colocada sobre placa aquecedora e 200µL de gel foram pipetados

sobre ela. Após o espalhamento do gel por toda a superfície da lâmina por processo de extensão, as mesmas foram colocadas para secar por um período mínimo de 12 horas.

O sangue de 10 peixes de cada sistema de criação foi retirado do Ducto de Cuvier, utilizando-se seringas de insulina, e uma gota deste sangue foi adicionada em um vial âmbar com 1mL de PBS (Tampão Fosfato Salino pH 7,4). Devido ao grande número de eritrócitos, foi realizada uma diluição de 10% desta suspensão também em PBS.

O gel de agarose LMP (*Low Melting Point*) 1,0% foi preparado dissolvendo-se a agarose em PBS e mantido em banho de aquecimento a 37°C. Cerca de 20µL da suspensão celular a 10% foram misturados a 120µL de gel de agarose LMP 1,0%, sendo a mistura colocada em uma lâmina já preparada com a primeira camada de agarose NMP e coberta com uma lamínula para o espalhamento do gel com os eritrócitos. As lâminas foram então levadas à geladeira por 30 minutos para que o gel se solidificasse.

IV.4.2. Lise

Após o gel solidificar, as lamínulas foram retiradas manualmente, deslizando-as delicadamente sobre o gel, e as lâminas foram mergulhadas na solução de lise por 2 horas a 4°C.

A solução de lise foi composta por uma solução estoque (NaCl 2,5M, Na_2EDTA 100mM e Tris 10mM com pH10), na qual foram adicionados Triton X-100 1% e DMSO 10% logo antes do uso. Essa solução tem como principal função romper as organelas, membranas celulares e nucleares e também remover ou dissolver componentes citoplasmáticos e proteínas nucleares.

Com o término do período de lise, as lâminas foram retiradas e colocadas na vertical em uma bandeja, para escorrer o excesso de líquido e depois lavadas 5 vezes com água destilada gelada, com o objetivo de remover completamente a solução de lise e quaisquer componentes celulares que poderiam interferir no ensaio.

IV.4.3. *Unwiding* e Eletroforese

As lâminas foram posicionadas na cuba de eletroforese e imersas em tampão de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH maior que 13), por 5 minutos a 4°C, para o relaxamento do DNA. Esta etapa é conhecida como *unwiding*.

Após o *unwiding*, as lâminas foram submetidas à eletroforese por 20 minutos a uma voltagem de 20V (0,74V/cm) e amperagem de 300mA. A cuba de eletroforese utilizada possui uma distância de 27,0cm entre os eletrodos com as seguintes dimensões: 29,5cm de largura e 21,0cm de comprimento. A cuba tem capacidade para conter 16 lâminas.

Terminada a eletroforese, as lâminas foram colocadas na vertical em uma bandeja para escorrer o excesso de tampão.

IV.4.4. Neutralização e Fixação

Para a neutralização, as lâminas foram lavadas rapidamente com uma solução gelada de Tris 0,4M e pH 7,5 e, a seguir, foram inteiramente cobertas por esta solução por 5 minutos, sendo este procedimento repetido 3 vezes.

As lâminas foram colocadas para escorrer o excesso de solução e por fim mergulhadas em etanol P.A. gelado, por 5 minutos, para fixação. Após este período no etanol, foi necessário deixar as lâminas secarem por no mínimo 2 horas.

IV.4.5. Coloração por prata

A coloração com prata foi iniciada com as lâminas completamente secas. A primeira parte do processo foi uma nova fixação das lâminas com solução de fixação de coloração (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%) por 10 minutos. Depois, as lâminas foram lavadas por 1 minuto com água destilada 3 vezes e deixadas para secar *overnight*.

Para a coloração todas as soluções foram previamente aquecidas a 37°C e mantidas nesta temperatura. As lâminas foram, então, reidratadas por 3 minutos e depois imersas na solução de coloração por um tempo variável entre 1 e 5 minutos. Foi

necessário verificar a coloração das lâminas frequentemente em microscópio óptico até que todas as células estejam coradas.

A solução de coloração foi preparada logo antes de ser utilizada e foi composta de uma mistura de 66mL de uma solução de nitrato de prata (nitrato de amônio 0,1%, nitrato de prata 0,1%, ácido silicotúngstico 0,1%, formaldeído 0,1%) e 34mL de solução de carbonato de sódio 0,5%.

Após as lâminas atingirem a coloração desejada, elas foram rapidamente transferidas para a solução de interrupção (ácido acético glacial 1%), à temperatura ambiente, por 5 minutos. Para finalizar, as lâminas passaram por um banho de água destilada e foram colocadas para secar à temperatura ambiente.

IV.4.6.Controle positivo

O controle positivo foi realizado para testar a eficiência do método em detectar a fragmentação do DNA. Para isso, as células foram expostas *in vitro* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, 5µM, 10µM, 20µM e 40µM (VIGNARDI et al., 2015).

A exposição foi feita antes de as lâminas serem colocadas na lise e foi realizada uma eletroforese apenas com lâminas expostas ao peróxido para evitar contaminação das amostras com este composto.

Após retirar a lamínula do gel solidificado, as lâminas foram cobertas com as soluções de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio por 30 minutos, depois lavadas 3 vezes com PBS e imersas na solução de lise.

IV.4.7. Análise dos cometas

As preparações feitas em campo foram microfotografadas em microscópio óptico de luz para posterior análise. De cada lâmina foram fotografadas um total de 100 células para serem analisadas. As bordas das lâminas, cometas muito próximos ou perto de bolhas de ar foram evitados, pois nessas regiões pode haver uma maior migração de DNA durante a eletroforese, devido a pequenas alterações de corrente elétrica.

Para a análise dos resultados é importante destacar que foram consideradas duas regiões dos cometas: a cabeça e a cauda. Devido à diferença de cargas elétricas da eletroforese, os fragmentos de DNA migram do núcleo formando uma espécie de cauda ao redor do mesmo. Assim, quanto mais intensas forem as quebras do DNA, maior será a migração dos fragmentos e, consequentemente, maior o comprimento da cauda e menor a cabeça do cometa.

A análise dos cometas foi realizada de duas formas distintas. Na primeira, o observador classificou os cometas encontrados com base em um índice de danos e a segunda consistiu em uma análise computadorizada de imagem utilizando-se o *software* CometScore®.

IV.4.7.1. Análise visual

Para realizar a análise visual, foi necessário estabelecer um padrão para a classificação dos danos ao DNA com base no material a ser analisado. Essa etapa foi necessária por se tratar de um material novo, onde a morfologia dos cometas poderia apresentar variações conforme as características celulares típicas da espécie. A análise foi baseada na descrita por Collins (2004).

Utilizando as microfotografias, 100 células de cada lâmina foram classificadas segundo seu grau de dano, variando de 0 (menor grau de fragmentação) a 4 (maior grau de fragmentação), seguindo o padrão de classes de dano estabelecido para o material analisado (Figura 3).

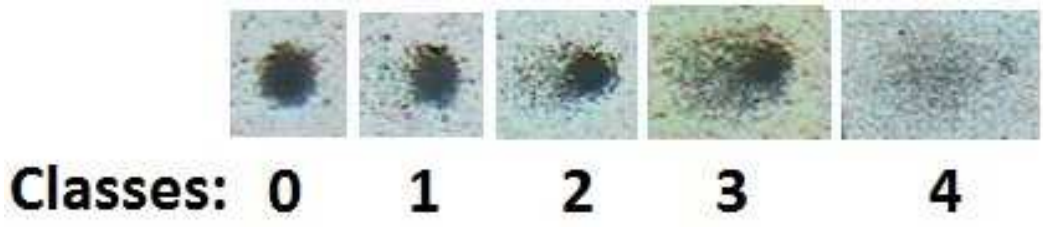

Figura 3: Classes de dano ao DNA obtidas pelo ensaio cometa de beijupirás

Ao terminar a classificação dos cometas, foi calculado o Índice de Dano (ID) de cada lâmina, conforme a seguinte fórmula:

$$\mathrm{ID} = (0 \text{ x } \mathrm{N}_0) + (1 \text{ x } \mathrm{N}_1) + (2 \text{ x } \mathrm{N}_2) + (3 \text{ x } \mathrm{N}_3) + (4 \text{ x } \mathrm{N}_4)$$

sendo N_0 número de cometas classificados como pertencentes a classe 0; N_1 número de cometas classificados como pertencentes a classe 1; N_2 número de cometas classificados como pertencentes a classe 2; N_3 número de cometas classificados como pertencentes a classe 3 e N_4 número de cometas classificados como pertencentes a classe 4.

Com o cálculo do ID de cada lâmina, foi calculada a média para cada organismo.

IV.4.7.2. Análise computadorizada de imagens

A análise computadorizada de imagens foi realizada pelo *software* CometScore®, que gera uma série de parâmetros de medição dos cometas. Os escolhidos para este trabalho foram a porcentagem de DNA da cauda e o momento de cauda, por serem os mais utilizados na literatura.

O momento de cauda é um parâmetro mais completo que a porcentagem de DNA, pois envolve tanto o tamanho da cauda como a porcentagem de DNA na mesma (LEE; STEINERT, 2003):

$$\text{Momento de cauda} = \frac{(\%\ \text{DNA}_{\text{cauda}}\ \text{x Tamanho}_{\text{cauda}})}{100}$$

Antes de se realizar as análises no programa, foi necessário converter cada microfotografia para tons de cinza e inverter suas cores. Para isto foi utilizado o programa ImageConverterCOMET.

Os resultados obtidos pelo programa foram tabulados, sendo também feita uma média dos parâmetros escolhidos por lâmina e, com a média das lâminas, foi feita uma média por organismo.

IV.5. Ensaio de micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocitárias

O sangue para o ensaio de anormalidades nucleares eritrocitárias (ENA) foi retirado, assim como o que foi utilizado para o ensaio cometa, do Ducto de Cuvier utilizando-se seringas de insulina para a realização de extensões sanguíneas. No pré-teste foi coletado sangue de 10 organismos, sendo 5 provenientes de cada forma de criação, e no experimento final o sangue foi coletado de 20 peixes, sendo 10 de cada sistema.

As lâminas utilizadas foram previamente lavadas com Extran 10%, água destilada e álcool. Elas foram deixadas de molho nessas soluções por um período mínimo de 2 horas e abundantemente enxaguadas e esfregadas. Após serem lavadas e secas, as lâminas foram acondicionadas em caixas lacradas.

Com uma gota do sangue coletado foi realizado o esfregaço dos peixes de cada forma de criação, em duplicata. Após as extensões sanguíneas estarem secas, as lâminas foram fixadas em metanol P.A., por 10 minutos.

A coloração foi realizada posteriormente utilizando-se Giemsa 10%, por 30 minutos. Após este período as lâminas foram lavadas com água corrente, a seguir em água destilada e colocadas para secar.

As lâminas foram analisadas no microscópio óptico de luz, sendo contabilizadas 1.000 células por lâmina. Foram calculadas as frequências de células reniformes, lobadas, segmentadas e com micronúcleos (Figura 4). Também foi feito o cálculo do ENA (‰), que consiste na soma de todas as células com micronúcleo e demais anormalidades encontradas.

O ENA e a frequência das anormalidades de cada indivíduo foram calculados por meio da média entre as duplicatas.

Figura 4: Tipos de células encontradas em ensaio de micronúcleo de beijupirás

IV.6. Imuno-histoquímica

Os métodos imuno-histoquímicos permitem detectar e localizar determinadas proteínas, como a p53, por meio da utilização de um anticorpo específico. O método consiste na formação de um complexo entre a proteína e os compostos que são adicionados permitindo sua visualização. Estes compostos são: um anticorpo primário específico à proteína, um anticorpo secundário universal, um composto de

estreptovidina com peroxidase que amplifica o sinal dos anticorpos e um cromógeno que é responsável pela coloração de todo o complexo.

IV.6.1. Coleta e fixação dos tecidos

Os peixes a serem sacrificados foram anestesiados em gelo e a seguir foi feito um corte na coluna vertebral de forma que sofressem o mínimo possível. Foram coletadas amostras de fígado de 5 organismos de cada local de criação no pré-teste e de 10 indivíduos de cada tanque no experimento final. Os tecidos foram cortados, utilizando bisturi, em secções de 0,5cm x 0,5cm e colocados em cassetes para fixação em paraformoldeído 4%.

O processo de fixação durou 24 horas e em seguida os cassetes foram transferidos para tampão fosfato 0,1M e conservados na geladeira até a emblocagem. Os cassetes podem permanecer no tampão fosfato 0,1M por um período de até 2 meses, se estiverem conservados em geladeira com trocas semanais do tampão.

IV.6.2. Confecção de blocos e lâminas para microscopia

Para a emblocagem dos tecidos, os cassetes foram transferidos para álcool 70° por um período de *overnight* e sob agitação. Após o álcool 70°, as amostras foram colocadas em álcool 90°, 100° e uma mistura composta de 50% álcool e 50% xilol; em todas essas soluções os cassetes permaneceram sob agitação e por um período de 2 horas. Este procedimento foi feito para desidratação do tecido.

Para o clareamento do tecido, os cassetes foram deixados em xilol por 2 horas também sob agitação. Após o xilol, as amostras foram transferidas para parafina histológica Erv-Plast® e deixadas em estufa a 60°C. A parafina foi trocada duas vezes, sendo que os cassetes permaneceram em cada uma delas por um período de 2 horas. A emblocagem foi realizada utilizando-se moldes de alumínio próprios para cassetes.

As lâminas a serem utilizadas para as preparações foram previamente banhadas em uma solução de 2% de 3-aminopropiltrietoxi-silano em acetona por 2 minutos, depois banhadas duas vezes em água destilada e secas em estufa. Esta solução reage com o grupo -OH do vidro, o que facilita a aderência do tecido à lâmina por formar uma superfície coloidal.

Foram cortadas secções de 5μm dos blocos para serem colocadas nas lâminas em micrótomo automático de navalhas descartáveis da marca Leica® (RM2255). Cada lâmina recebeu entre 3 e 5 cortes de tecido. As preparações foram colocadas na estufa a 60°C por um período variável entre 1 e 4 horas, com a finalidade de retirar o excesso de parafina dos cortes.

IV.6.3. Ensaio imuno-histoquímico

Para a revelação da proteína, foi necessário, primeiramente, retirar qualquer excesso de parafina que ainda pudesse haver nas lâminas e reidratar os tecidos. Este procedimento foi realizado utilizando-se xilol absoluto para desparafinizar; soluções com concentrações decrescentes de álcool (100% a 70%) e água destilada para reidratar.

Para recuperação dos antígenos bloqueados pela fixação dos tecidos, as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato a pH 6,0 e aquecidas à temperatura de 90°C por 15 minutos. Logo depois, foram lavadas com água destilada e, em seguida, com tampão fosfato salino, contendo Triton® X-100, conhecido como tampão imuno-histoquímico (ICC). As lavagens foram realizadas em cubetas histológicas e repetidas 2 vezes por 2 minutos cada vez, no caso da água, e 1 vez por 5 minutos, no caso do ICC; todas as lavagens foram realizadas sob agitação leve. As lâminas foram, então, mergulhadas em uma solução contendo 225mL de metanol e 25mL de peróxido de hidrogênio 30% por 30 minutos e mantidas a -4°C, sendo que esse procedimento teve por objetivo bloquear as peroxidases endógenas. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas três vezes com ICC por 5 minutos com agitação leve.

Para que cada corte recebesse cerca de 20μL das soluções descritas a seguir, os tecidos foram circundados com caneta histológica. O primeiro tratamento foi com a solução bloqueadora de proteínas composta por caseína, por 20 minutos. Essa solução foi removida com auxílio de ponteira estéril acoplada a uma bomba a vácuo. Depois, os tecidos foram cobertos com o anticorpo primário diluído em tampão citrato (1:8.000) e incubados por 20 horas. O anticorpo primário da marca Sigma® (P5813) utilizado nos experimentos foi monoclonal (BP53-12), tendo o camundongo como hospedeiro.

O primeiro corte de cada lâmina foi utilizado como controle negativo. Para tanto, este teve tratamento semelhante aos outros cortes, mas não recebeu o anticorpo

primário, sendo este substituído pelo tampão citrato, o diluente do mesmo. A função desse corte é validar a eficiência do método.

Assim que o anticorpo primário foi retirado, realizaram-se três lavagens das lâminas com tampão ICC por 5 minutos sob agitação leve; o anticorpo secundário conjugado à biotina foi adicionado a todos os cortes, inclusive ao controle negativo, por 15 minutos e, a seguir, as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes por 5 minutos com o tampão ICC, sob agitação leve. Na sequência, as lâminas receberam solução estreptavidina conjugada com a peroxidase, também por 15 minutos e foram, então, lavadas mais 3 vezes por 5 minutos com o tampão de ICC, sob agitação leve. Por fim, as lâminas receberam o cromógeno DAB por 90 segundos e foram, então, lavadas 2 vezes por 5 minutos em água destilada, sob agitação leve.

Para a coloração do tecido de fundo, os cortes foram corados em hematoxilina, por 30 segundos, e depois lavados em água corrente por 20 minutos. A coloração de fundo dos tecidos com hematoxilina é importante, pois ela facilita a visualização da marcação da proteína, já que ela cora o tecido de fundo em tons de azul e o cromógeno DAB marca as proteínas com diferentes tonalidades de marrom conforme a intensidade da expressão proteica.

As lâminas foram, por fim, desidratadas em banhos de soluções com concentrações crescentes de etanol em água destilada (70% a 100% de etanol). Depois, elas foram banhadas 2 vezes em xilol e montadas com lamínulas fixadas com resina Permount®. É necessário aguardar 72 horas para a secagem da resina nas lâminas.

Antes de aplicar o método nas preparações definitivas, foi necessário realizar testes de diluição do anticorpo primário em tampão citrato para se estabelecer a mais adequada para o tecido hepático desta espécie.

IV.6.4. Análise das lâminas

As lâminas foram microfotografadas em microscópio óptico. Antes de se iniciar a análise, foi estabelecido um critério para ordenar os níveis de intensidade de coloração com base no material que seria analisado (Figura 5).

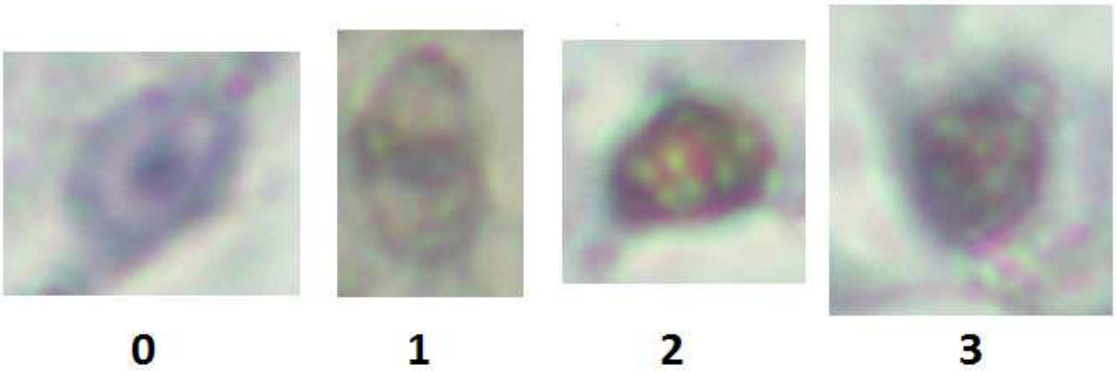

Figura 5: Padrão de análise para a marcação da expressão da proteína p53 em fígado de beijupirás. 0 representa nenhuma expressão; 1 pouca expressão; 2 expressão moderada e 3 expressão intensa.

Para a análise dos resultados, a quantificação das células positivas para a proteína p53 foi feita pelo método Hscore modificado (McCARTY Jr. et al., 1986). A pontuação consiste na soma da porcentagem de células coradas multiplicada por um valor corresponde à intensidade de coloração (0 corresponde a nenhuma, 1 a fraca, 2 a moderada e 3 a forte):

$$\text{Hscore} = (0 \text{ x } I_0) + (1 \text{ x } I_1) + (2 \text{ x } I_2) + (3 \text{ x } I_3)$$

Os resultados, então, variam de 0 a 300, ou seja, de nenhuma a intensa marcação. Em cada corte histológico foram escolhidos, ao acaso, campos que foram microfotografados e tiveram suas células contadas e classificadas. Para cada indivíduo, foram analisadas 3 lâminas, com 3 cortes em cada uma delas.

IV.7. Enzimas da defesa antioxidante

O estresse oxidativo é um bom indicador do estado fisiológico dos organismos, sendo que o metabolismo a ele relacionado possui vias enzimáticas e não-enzimáticas. A catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) foram escolhidas neste trabalho por estarem todas envolvidas na defesa antioxidante. A primeira e a segunda enzimas são responsáveis pela decomposição de peróxidos, enquanto que a terceira está relacionada à dismutação do radical superóxido.

No pré-teste foram coletados fígado, brânquia, coração e músculo de 5 peixes de cada forma de criação para definir o tecido com melhor resposta, a ser utilizado no

experimento final. Com base nos resultados obtidos, o fígado de 10 peixes de cada sistema de criação foi coletado no experimento final.

IV.7.1. Coleta e armazenamento dos tecidos

Os peixes a serem sacrificados foram anestesiados no gelo e depois tiveram sua coluna vertebral seccionada de forma que sofressem o mínimo possível. Os tecidos foram coletados, colocados em *criovials* e armazenados, imediatamente, em nitrogênio líquido. Todo o manuseio das amostras foi realizado sobre placas de gelo em ambiente refrigerado para a conservação das proteínas enzimáticas.

IV.7.2. Preparação do homogeneizado

Para preparar os homogeneizados, os tecidos foram macerados em tampão Tris-HCl 100mM em proporção de 1:5 (massa/volume). As amostras foram, então, sonicadas e depois centrifugadas a 10.000rpm (12.857g) em centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o líquido foi retirado e considerado como extrato bruto e, em seguida, foram feitas as diluições a serem testadas, também utilizando o tampão Tris-HCl.

Foram realizados testes com o tampão Tris-HCl contendo fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), um bloqueador de peroxidases, porém ele influenciou nas leituras da SOD.

IV.7.3. Atividade enzimática da catalase (CAT)

IV.7.3.1. Análise

A mensuração da atividade da CAT foi feita em espectrofotômetro Beckman® com medidas de absorbância a 240nm a 25°C.

O sistema de reação foi composto de peróxido de hidrogênio 12mM, tampão fosfato de sódio 100mM e água ultra pura. Em uma cubeta de 700µL foi adicionado 500µL de sistema de reação e uma alíquota da amostra (10µL), o que permite ler a variação da absorbância com o tempo. As leituras são feitas por um período de 2 minutos com intervalos de 15 segundos entre elas.

Há um decaimento da absorbância com o decorrer do tempo, pois há um consumo do substrato pela enzima, ou seja, a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em gás oxigênio e água:

$$H_2O_{2(l)} \xrightarrow{CAT} O_{2(g)} + H_2O_{(l)}$$

Devido ao início de reação turbulento e a formação de bolhas na cubeta ao final da reação, que interferem na leitura da absorbância, foi escolhido o intervalo de 30 segundos a 1,5 minutos para calcular a variação de absorbância no tempo.

O cálculo da atividade da catalase foi realizado utilizando-se a equação abaixo:

$$U/mg_{CAT} = \frac{(\Delta Abs/min) \times \text{Volume da cubeta} \times \text{Diluição}}{\Sigma_{H2O2} \times \text{Volume da amostra} \times \text{Quantidade de proteínas do extrato}}$$

sendo o ΔAbs/min obtido pela inclinação da reta dos valores de absorbância em função do tempo e o Σ_{H2O2} o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio (ε = 0,04mM^{-1}).

A atividade da enzima foi calculada em unidade internacional (U), considerando que 1U é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1µmol de substrato em produto no período de 1 minuto.

IV.7.3.2. Testes de diluição

Foram realizados testes de diluição (Figura 6) dos homogeneizados de todos os tecidos, com o objetivo de determinar a diluição ideal para as medidas e de verificar a precisão do procedimento, já que as diluições devem contemplar atividades proporcionais aos volumes de amostra.

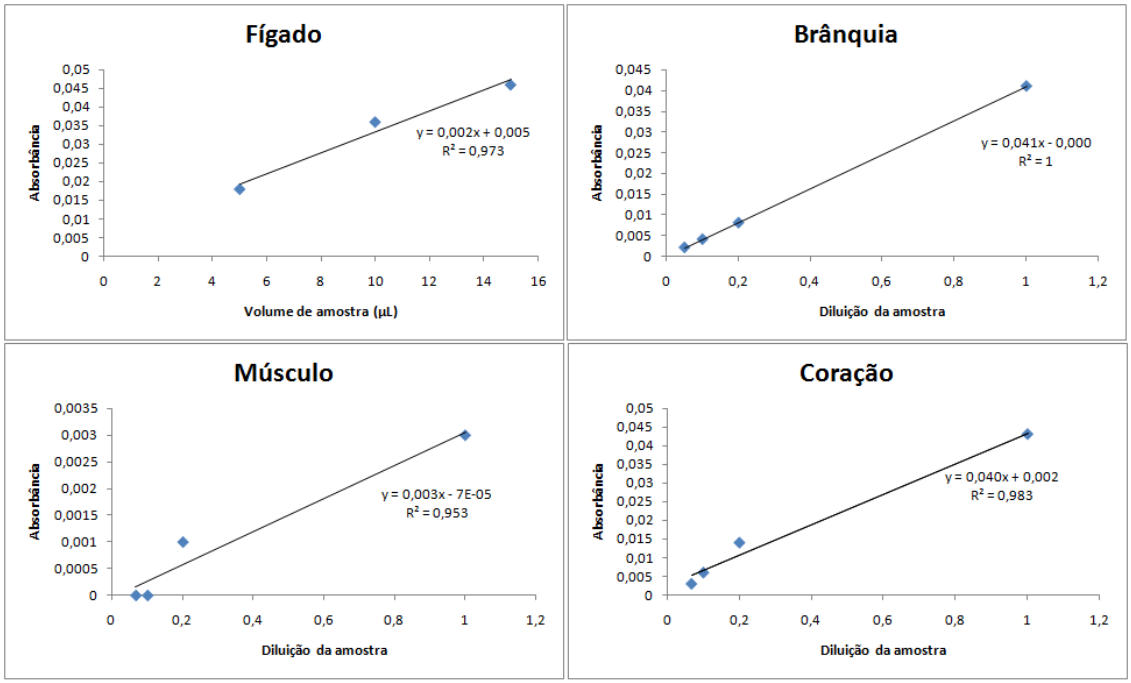

Figura 6: Testes de diluições para medição da atividade enzimática da catalase em fígado, brânquia, músculo e coração de beijupirá.

Por fim, foram definidas as diluições de 1:10 no fígado, 1:5 para brânquia e coração e extrato bruto para o músculo.

IV.7.4. Atividade enzimática da Glutationa Peroxidase (GPx)

IV.7.4.1. Análise

Para a análise da GPx, as medidas foram feitas em espectrofluorímetro de microplacas de 384 poços a 340nm a 25°C.

Como o processo de redução do peróxido de hidrogênio pela GPx não possui nenhum composto que absorva luz, é necessário acoplar um sistema auxiliar para que a absorbância seja determinada. O sistema acoplado para amostras de fígado foi o de redução do $NADPH^+H^+$ em $NADP^+$ por meio da glutationa redutase (GRED), o qual permite leituras de absorbância do $NADPH^+H^+$ restante. Quando a GPx reduz o H_2O_2, gera glutationa oxidada (GS-SG) que é reduzida pelo $NADPH^+H^+$ formando $NADP^+$ e glutationa reduzida (GSH), em reação catalisada pela glutationa redutase (GRED) (Figura 7). Assim, foi possível determinar a variação da concentração do substrato por meio da variação de absorbância em 340nm e, consequentemente, a atividade da GPx.

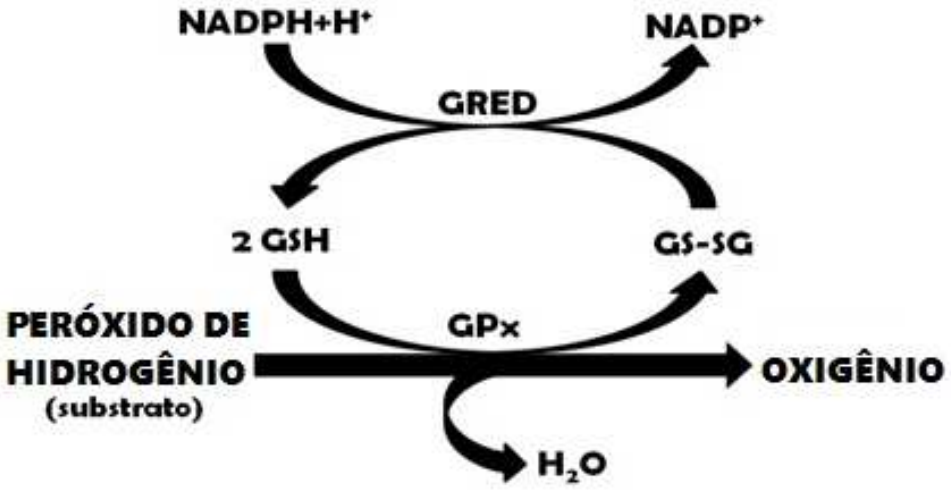

Figura 7: Mecanismo de visualização da atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) através de um sistema acoplado, sendo GRED a glutationa redutase, GSH a glutationa reduzida e GS-SG a glutationa oxidada.

Para medir a atividade da GPx, o sistema de reação utilizado foi composto de tampão fosfato de sódio 50mM, GSH 1mM, NADPH 0,15mM, EDTA 0,5mM, GRED 0,23U/mL, azida sódica 2mM (responsável pela inibição da atividade da catalase) e água ultra pura. Assim, 60µL do sistema de reação, uma alíquota de 10µL de amostra e 10µL do substrato (peróxido de hidrogênio 2,4mM ou hidroperóxido de cumene 8mM) foram adicionados em um poço da microplaca.

O cálculo da atividade da GPx foi realizado descontando a atividade do sistema de reação sem amostra (branco). Para isso, foram adicionados 60µL do sistema de reação, 10µL de água ultra pura e 10µL do substrato. A diferença entre as leituras com e sem amostra corresponde a atividade da GPx.

Também há diferença na metodologia utilizada conforme o tecido. Devido à alta atividade da catalase no fígado, para este tecido foi necessário adicionar azida sódica no sistema de reação para inibir a atividade desta enzima, enquanto que para brânquia, coração e músculo, este composto não foi necessário. Há também diferenças no substrato utilizado, pois para brânquia, coração e músculo foi utilizado o hidroperóxido de cumene, sendo que ele não pode ser utilizado para o fígado por também ser substrato da glutationa-S-transferase, utilizando-se, para este tecido, o peróxido de hidrogênio.

O cálculo da atividade da GPx foi feito com a seguinte equação:

$$U/mg_{GPx} = \frac{\left((\Delta Abs/min_{amostra}) - (\Delta Abs/min_{branco})\right) \times \text{Diluição} \times \text{Volume da cubeta}}{\varepsilon \times \text{Volume de amostra} \times \text{Quantidade de proteínas do extrato}}$$

sendo o $\Delta Abs/min_{amostra}$ a variação da absorbância no tempo obtida utilizando-se o sistema de reação, a amostra e o substrato; $\Delta Abs/min_{branco}$ a variação da absorbância no tempo do endógeno; ε é o coeficiente de extinção molar do $NADPH^{+}H^{+}$ (ε = 6,22mM^{-1}).

A atividade foi calculada em unidade internacional (U), considerando que 1U representa a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1µmol de substrato em produto no período de 1 minuto.

IV.7.4.2. Testes de diluição

Foram realizados testes de diluição (Figura 8) em todos os tecidos, com o objetivo de, além de determinar a diluição das amostras para análise, verificar a precisão do procedimento, já que as diluições devem ter valores de atividade enzimática proporcionais a diluição da amostra.

Além disso, durante a realização dos testes de diluição, constatou-se que a GPx deve ser a primeira enzima a ser analisada, pois sua atividade, após a preparação do extrato, decai rapidamente em função do tempo.

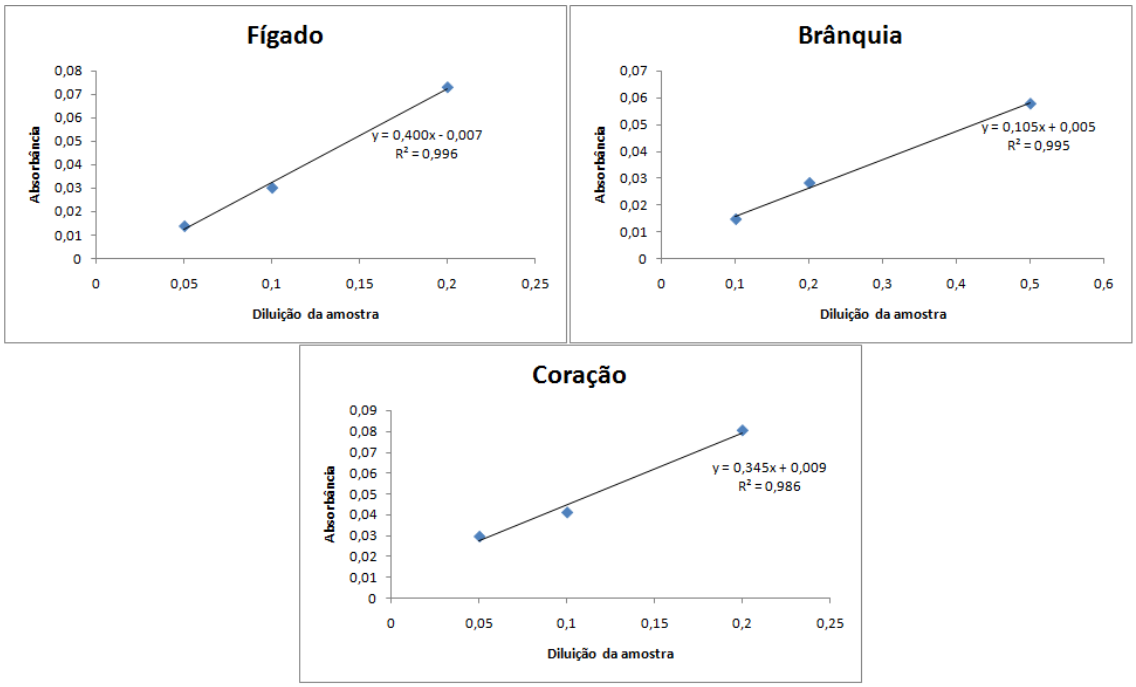

Figura 8: Testes de diluições para medição da atividade enzimática da glutationa peroxidase (GPx) em fígado, brânquia e coração de beijupirá.

Ao final do pré-teste, foram estabelecidas as diluições de 1:10 para fígado e coração, 1:5 para brânquia e extrato bruto para o músculo.

IV.7.5. Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)

IV.7.5.1. Análise

A mensuração da atividade da SOD foi realizada em espectrofluorímetro de leitor de microplacas com 96 poços a 560nm a 25°C.

O método utilizado se baseia na capacidade da SOD de inibir a redução do NBT pelo superóxido, já que a SOD, na defesa antioxidante, é responsável pela dismutação deste radical livre. O superóxido é produzido pela decomposição da hidroxilamina em meio alcalino. A absorbância medida foi do azul de formazan, formado na redução do NBT (Figura 9).

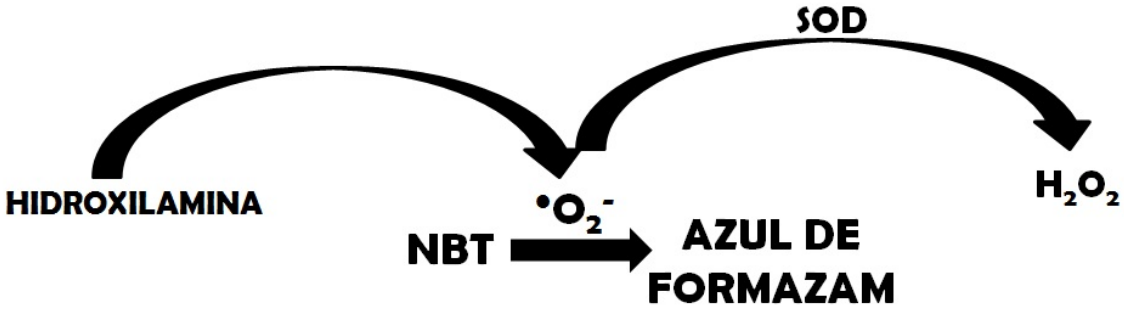

Figura 9: Modelo simplificado para a leitura da atividade da superóxido dismutase (SOD).

O sistema de reação utilizado para medir a atividade desta enzima foi composto por tampão carbonato de sódio 100mM, EDTA 17,5µM, NBT 1mM e água ultra pura. Para as medidas foram adicionados 143µL do sistema de reação, uma alíquota de 20µL de amostra e 37µL de hidroxilamina, que é um gerador de superóxido. Foram feitas duas leituras, a do sistema de reação, hidroxilamina e amostra, e outra apenas com o sistema de reação gerador de superóxido, contendo a hidroxilamina e água. A partir destas duas leituras foi feito o cálculo da inibição do superóxido feita pela SOD.

O cálculo da atividade da SOD foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\mathrm{U}/\mathrm{mg}_{\mathrm{SOD}} = \frac{\left(\frac{\Delta\mathrm{Abs}/\mathrm{min}_{\mathrm{SR\ e\ hidroxilamina}}}{\Delta\mathrm{Abs}/\mathrm{min}_{\mathrm{amostra}}} - 1\right) \times \mathrm{Diluição}}{\mathrm{Volume\ de\ amostra} \times \mathrm{Quantidade\ de\ proteínas}}$$

sendo $\Delta\mathrm{Abs}/\mathrm{min}_{\mathrm{SR\ e\ hidroxilamina}}$ a variação de absorbância do sistema gerador de superóxido no tempo; $\Delta\mathrm{Abs}/\mathrm{min}_{\mathrm{amostra}}$ a variação da absorbância no tempo utilizando, além do sistema de reação e do substrato, a amostra.

A atividade foi calculada em unidade internacional (U), considerando U a quantidade de enzima que inibe em 50% a redução do NBT pelo superóxido.

IV.7.5.2. Testes de diluição

Foram realizados testes de diluição (Figura 10) em todos os tecidos, com o objetivo de, além de determinar a diluição apropriada das amostras para as análises, verificar a precisão do procedimento, já que as atividades enzimáticas devem ser proporcionais às diferentes diluições testadas.

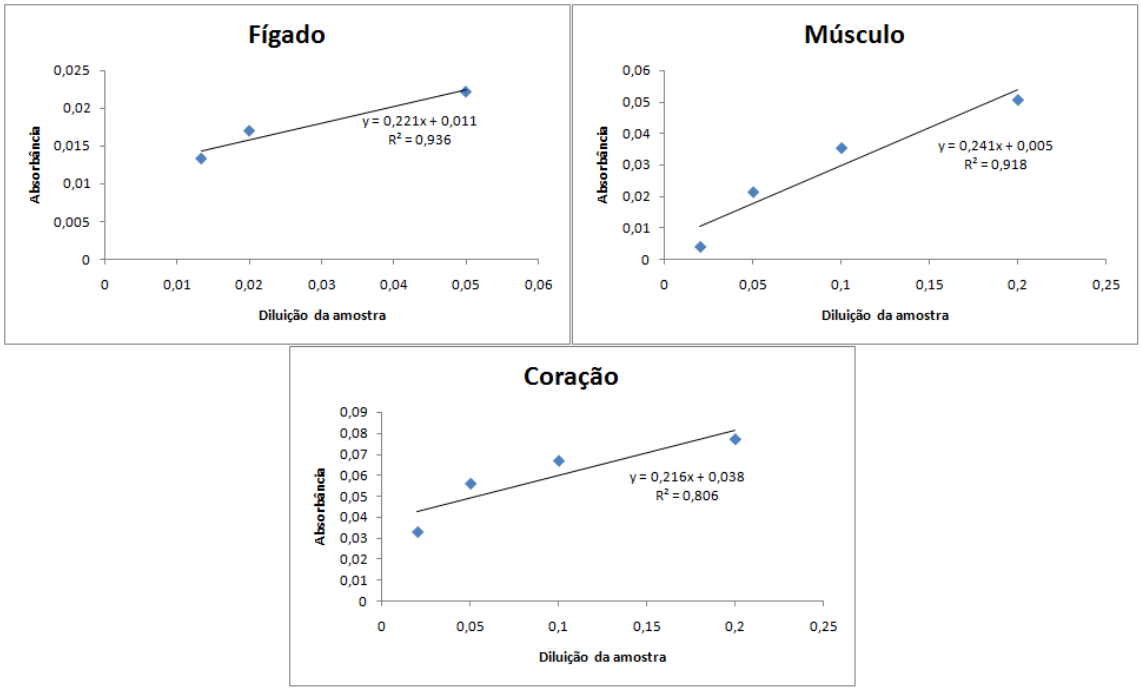

Figura 10: Testes de diluições para medição da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em fígado, músculo e coração de beijupirá.

Ao final do pré-teste foram estabelecidas as seguintes diluições para análise 1:50 para o fígado e 1:20 para coração, músculo e brânquia.

IV.7.6. Quantificação das proteínas totais

A atividade enzimática é normalmente expressa em relação a miligramas de proteínas que a amostra contém, portanto é necessário quantificar as proteínas totais da amostra. A leitura das proteínas totais foi realizada em espectrofluorímetro com leitor de microplacas de 384 poços em 560nm.

O procedimento foi realizado utilizando o Kit de Ensaios QuantiProTM BCA® da Sigma®. Este método se baseia na formação de um complexo entre as proteínas e o íon Cu^{2+} em meio alcalino, seguido da redução do Cu^{2+} para Cu^{+}. A quantidade de cobre reduzido é proporcional à quantidade de proteína da amostra. O BCA forma com o Cu^{+} um complexo azul em ambiente alcalino, o que permite quantificar as proteínas. O limite de detecção deste método é de 0,5 a 30 µg/mL de proteína.

Primeiramente foi preparado o reagente do método, conforme as instruções do kit. Os reagentes foram misturados nas seguintes proporções: 25 partes de reagente QA

(solução de carbonato de sódio, bicarbonato de sódio e tartarato de sódio em NaOH 0,2M e pH 11,25), 25 partes de reagente QB (solução de ácido bicinconínico, conhecido como BCA, 4% e pH 8,5) e 1 parte de reagente QC (solução de sulfato de cobre II pentahidratado 4%). Depois de pronta, esta solução foi, então, misturada com a amostra de proteína em proporção 1:1 e as preparações foram incubadas por 1 hora a 60°C sob agitação.

Antes de realizar a leitura das amostras foi necessário fazer uma curva padrão com concentrações conhecidas de proteína para poder calcular a quantidade de proteínas da amostra. Para esta curva foi utilizada *serum* de albumina bovina nas seguintes concentrações: 2, 5, 10, 15, 25, 30, 40 e 50 µg/ml (Figura 11).

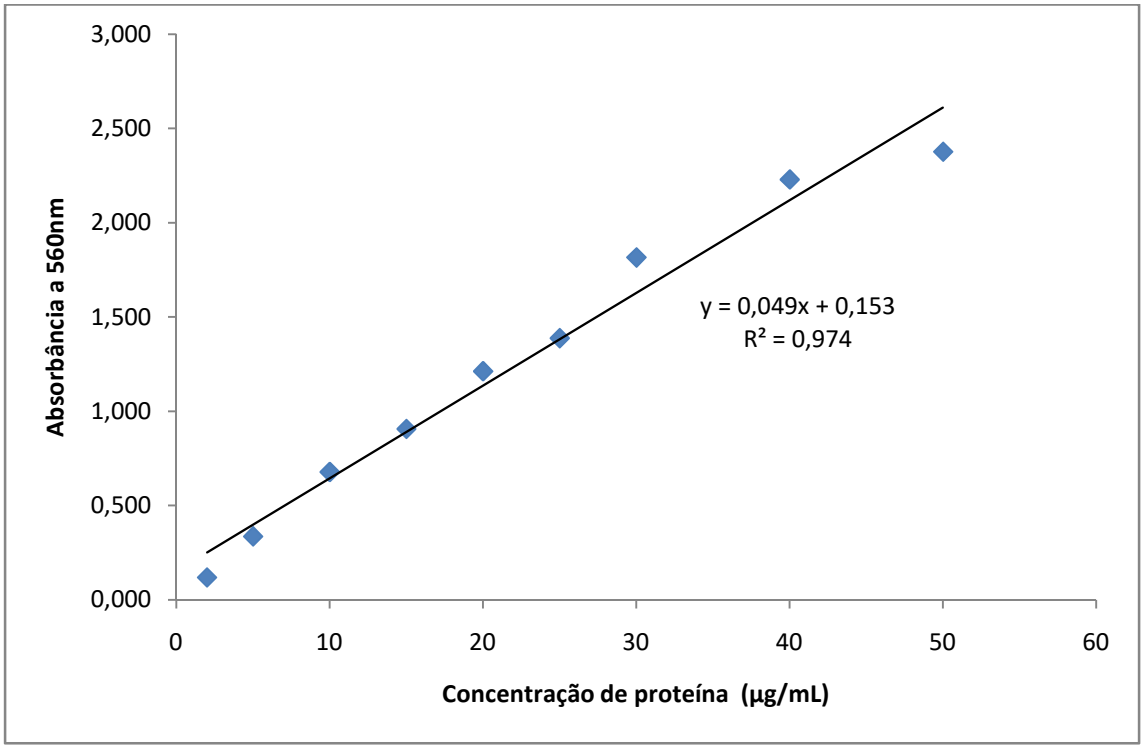

Figura 11: Curva padrão para proteínas totais feita com concentrações conhecidas de albumina bovina para a quantificação das proteínas totais das amostras de tecidos de beijupirá.

Assim como para todas as enzimas testadas, foi necessário realizar um teste de diluição para definir qual delas seria mais adequada para a leitura das amostras, observando o limite de detecção do método. A diluição definida foi de 1:400 para todos os tecidos.

IV.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram tabulados e tiveram suas médias e erro padrão calculados.

Todos os resultados de cada organismo foram submetidos a testes de normalidade de D'Agostino-Pearson. Em caso de distribuição normal dos dados, foi aplicado Teste T, considerando-se p menor que 10% como significativo. Caso os dados não apresentassem distribuição normal, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, também considerando-se $p < 0,1$ como significativo.

V. Resultados

V.1. Parâmetros físico-químicos dos tanques

Apesar de não ser possível controlar a salinidade, temperatura, concentrações de amônia, nitrito e oxigênio do tanque-rede, elas foram medidas diariamente, para conhecer o ambiente onde os organismos estavam sendo criados. Para controlar os parâmetros do tanque *indoor* a taxa de troca de água era regulada, de acordo com a capacidade do sistema.

A concentração de oxigênio e a porcentagem de saturação de oxigênio se mantiveram um pouco mais altas no tanque *indoor* do que no tanque-rede (Figura 12A), devido ao eficiente sistema de aeração do tanque, porém esta diferença não foi significativa. A boa oxigenação no tanque *indoor* é necessária, já que este é um ambiente normalmente considerado como mais estressante do que o do tanque-rede.

As concentrações de oxigênio se mantiveram, na maior parte do tempo, entre 5,00 e 8,00mg/mL, tendo valores mínimos no tanque-rede de 4,30mg/mL e 4,50mg/mL no tanque *indoor* (Figura 12A). A porcentagem de saturação de oxigênio permaneceu entre 70 e 100% na maioria das medidas e os valores mínimos foram 65% no tanque-rede e 75% no tanque *indoor* (Figura 12A).

Não houve grandes variações entre a salinidade e a temperatura do tanque *indoor* em comparação ao tanque-rede (Figura 12B). Os valores de salinidade dos dois tanques permaneceram entre 33 e 36 e a temperatura entre 19,5 e 27,0°C.

As concentrações de amônia e nitrito do tanque-rede permaneceram sempre inalteradas, mantendo-se abaixo do limite de detecção do método e, por esse motivo, foram medidas semanalmente e não todos os dias, como era feito no tanque *indoor*, pois este tanque apresentou valores elevados de amônia no início e valores mais elevados de nitrito do meio para o final do experimento (Figura 12C). Estes valores variaram entre 0 e 1,7mg/mL de nitrito e entre 0 e 1,3mg/mL para amônia.

As medidas de transparência da água realizadas no tanque-rede com Disco de Secchi tiveram como valor mínimo 60cm e máximo de 230cm (Figura 12D). Em média, os valores de transparência foram de 161,29 ± 5,33cm.

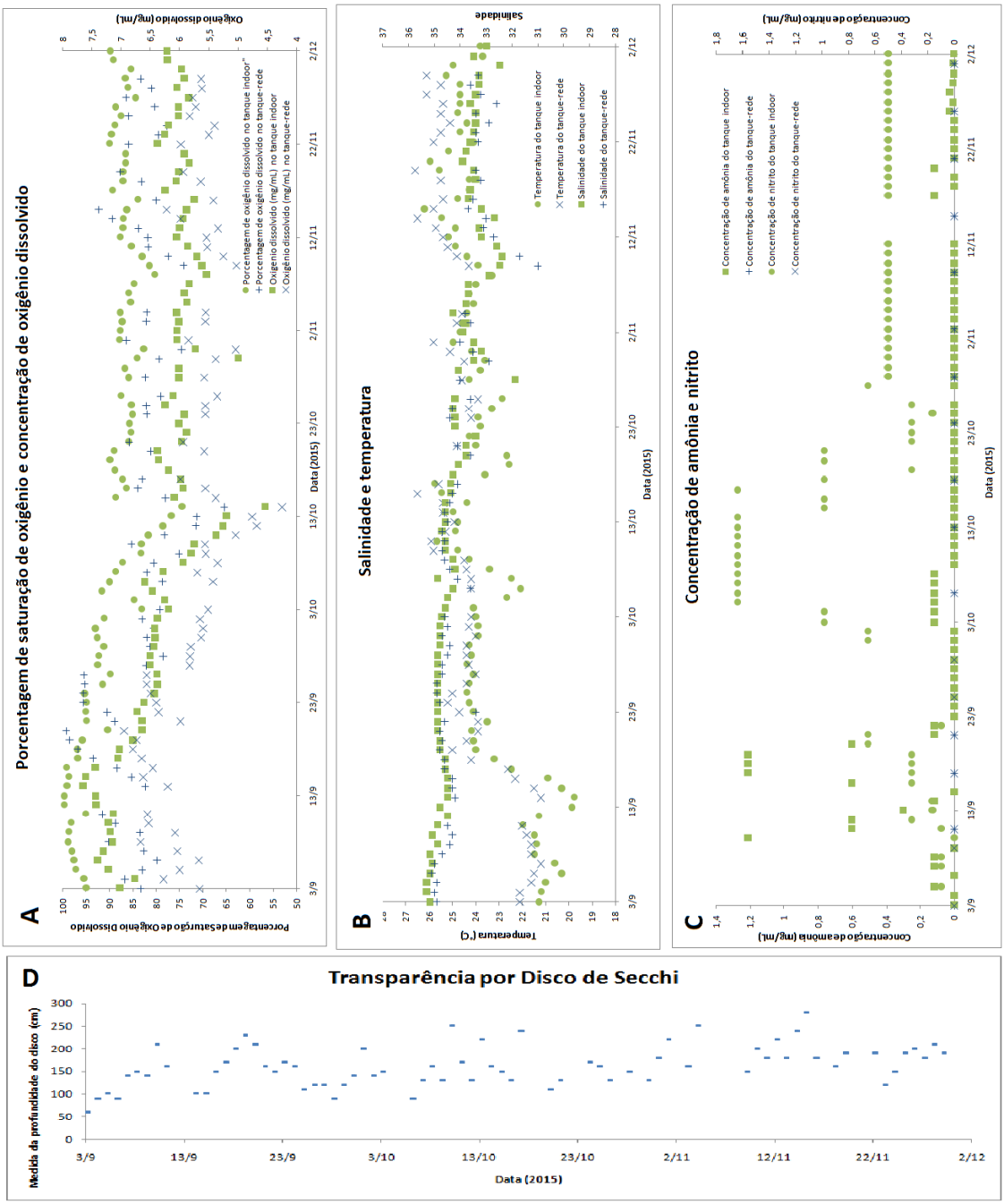

Figura 12: Parâmetros físico-químicos da água dos tanques ao longo do tempo do experimento com beijupirás criados em tanque *indoor* (verde) e tanque-rede (azul). A: Porcentagem de saturação e concentração (mg/mL) de oxigênio dissolvido na água; B: Salinidade e temperatura (°C); C: Concentração de amônia (mg/mL) e nitrito (mg/mL) D: Transparência do tanque-rede medida pela profundidade do Disco de Secchi (cm).

V.2. Biometria

Durante o período de aclimatação, apenas um peixe do tanque *indoor* foi encontrado morto no quinto dia de experimento; ele foi então reposto por outro de peso semelhante.

Ao final do período experimental, os organismos do tanque *indoor* atingiram um peso médio de 884,28 ± 35,80g, sendo o peso máximo de 1519,42g e o mínimo de 421,90g. A taxa de crescimento somático dos organismos foi de 0,66 e o aumento do peso médio de 416,57g. A taxa de mortalidade foi de 12,5% (7 organismos), a densidade final do tanque de 3,25kg/m³, o ganho de biomassa total foi de 16,97kg e o fator de conversão alimentar de 2,74.

Já no tanque-rede, a média de peso final dos indivíduos foi de 929,48 ± 66,49g, sendo o maior organismo de 1292,00g e o menor 450,00g. O crescimento somático dos organismos foi de 0,73 e o aumento do peso médio de 460,50g. A taxa de mortalidade foi de 23,26% (10 organismos), e, além disso, 13 indivíduos escaparam do tanque ou foram retirados indevidamente por outras pessoas, já que o tanque não possuía vigilância de 24 horas. Devido a esse fato, a densidade final foi igual a 1,86kg/m³, não havendo ganho de biomassa e, portanto, o fator de conversão alimentar não pôde ser calculado.

Tabela 2: Dados biométricos de beijupirás cultivados em dois sistemas diferentes durante o experimento final deste trabalho.

	Tanque *indoor*	Tanque-rede
Peso médio inicial (g)	470,71 ± 15,92	466,98 ± 26,69
Peso médio final (g)	884,28 ± 35,80	929,48 ± 66,49
Mortalidade (%)	1250,00%	2326,00%
SGR	0,66	0,73
K	1,32 ± 0,04	1,34 ± 0,05
HSI	3,17 ± 0,16	2,37 ± 0,18

O fator de condição consiste em uma relação entre massa e comprimento que permite identificar o grau de desenvolvimento do peixe. O fator de condição de Fulton considera que os organismos possuem um crescimento isométrico com b = 3,0, ou seja, o peso aumenta com o comprimento elevado ao cubo. Durante o pré-teste (Figura 13), os organismos do tanque-rede apresentaram uma média maior do fator de condição de Fulton (1,12 ± 0,02 no tanque-rede e 1,03 ± 0,03 no tanque *indoor*), havendo diferença significativa entre eles, com *p* igual a 0,029. Porém, no experimento final (Figura 13) não houve diferença significativa entre o fator de condição de Fulton dos dois locais de

criação e seus valores foram bem próximos (1,34 ± 0,05 no tanque-rede e 1,32 ± 0,04 no tanque *indoor*).

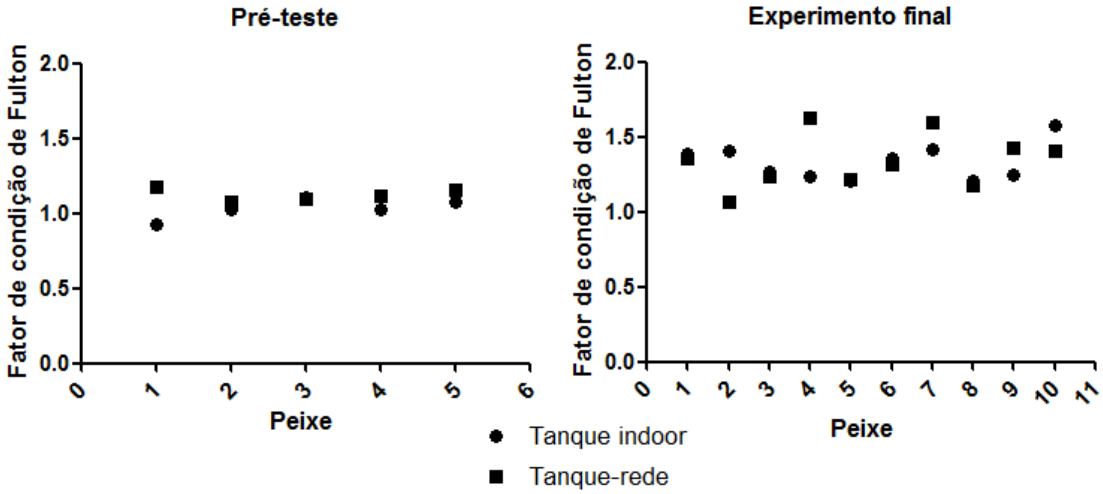

Figura 13: Fator de condição de Fulton de beijupirás mantidos em tanque-rede (quadrado) e tanque *indoor* (círculo) durante o pré-teste e o experimento final.

O índice hepato-somático (HSI) representa o percentual de massa do fígado em relação ao peso corporal, sendo uma forma de quantificar a energia armazenada em forma de glicogênio, já que o fígado é o maior reservatório de glicogênio dos animais (CYRINO et al., 2000; NAVARRO et al., 2006). Observando a Figura 14, percebe-se que, no pré-teste, houve um maior HSI nos peixes coletados no tanque-rede (3,23 ± 0,24 no tanque-rede e 2,21 ± 0,0,09 no tanque *indoor*) e esta diferença se mostra estatisticamente significativa, com *p* igual a 0,0042. Já no experimento final (Figura 14), a diferença continuou sendo significativa com *p* igual a 0,0049, porém valores maiores de índice hepato-somático foram encontrados nos peixes criados no tanque *indoor* (3,17 ± 0,16 no tanque *indoor* e 2,37 ± 0,18 no tanque-rede).

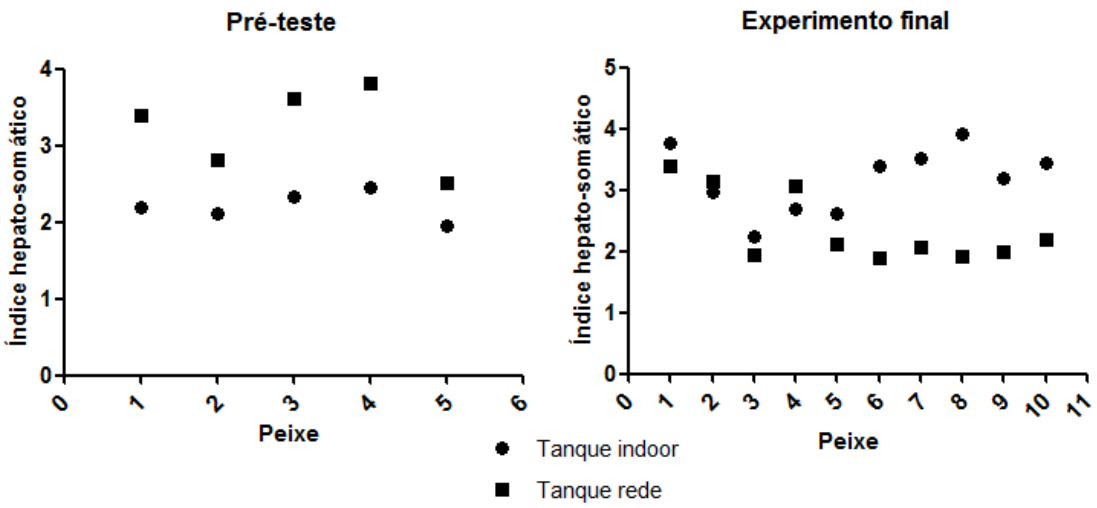

Figura 14: Índice hepato-somático de beijupirás criados em tanque-rede (quadrado) e tanque *indoor* (círculo) durante o pré-teste e o experimento final.

Durante a coleta dos organismos, observou-se a presença de parasitas *Neobenedenia* sp. nos peixes dos dois tanques (Figura 15), porém eles não foram quantificados e nem coletados para identificação de espécie. Eles se concentravam na cabeça e olhos dos beijupirás.

Figura 15: Beijupirás coletados com presença de parasitas *Neobenedenia* sp na cabeça (circuladas em branco).

V.3. Ensaio cometa

O controle positivo do ensaio cometa foi realizado para verificar se o método é capaz de detectar quebras no DNA de beijupirás. Para isso foi feita uma exposição *in vitro* a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (5, 10, 20 e 40µM), um composto reconhecidamente genotóxico. Na análise visual e nos dois parâmetros escolhidos da análise de imagem, o dano ao DNA aumentou gradativamente de acordo com o aumento das concentrações, apenas não sendo significativo entre as concentrações de 5 e 10µM (Figura 16).

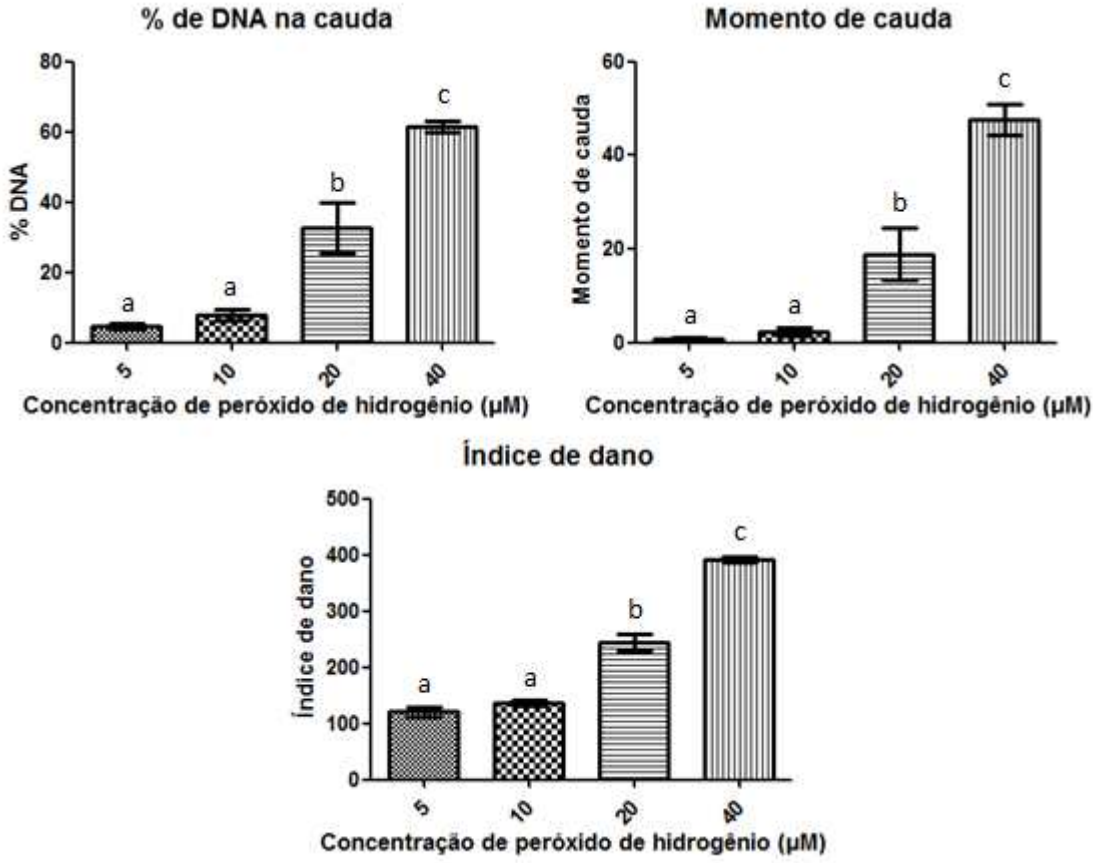

Figura 16: Controle positivo de ensaio cometa em beijupirás. Os dois primeiros gráficos correspondem a análise computadorizada de imagem e o terceiro a análise visual. As barras de erro representam o erro padrão das amostras e letras diferentes indicam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10.

Quanto ao resultado do experimento, observou-se uma tendência de maior dano no DNA dos peixes criados no tanque *indoor* em relação ao tanque-rede (Figura 17). Estatisticamente, o resultado se mostrou significativo na análise visual (p = 0,0225) e

no momento de cauda (p = 0,0400). Quanto à porcentagem de DNA na cauda, o dano dos indivíduos de ambos os tanques não se mostraram estatisticamente diferentes, com p igual a 0,1029.

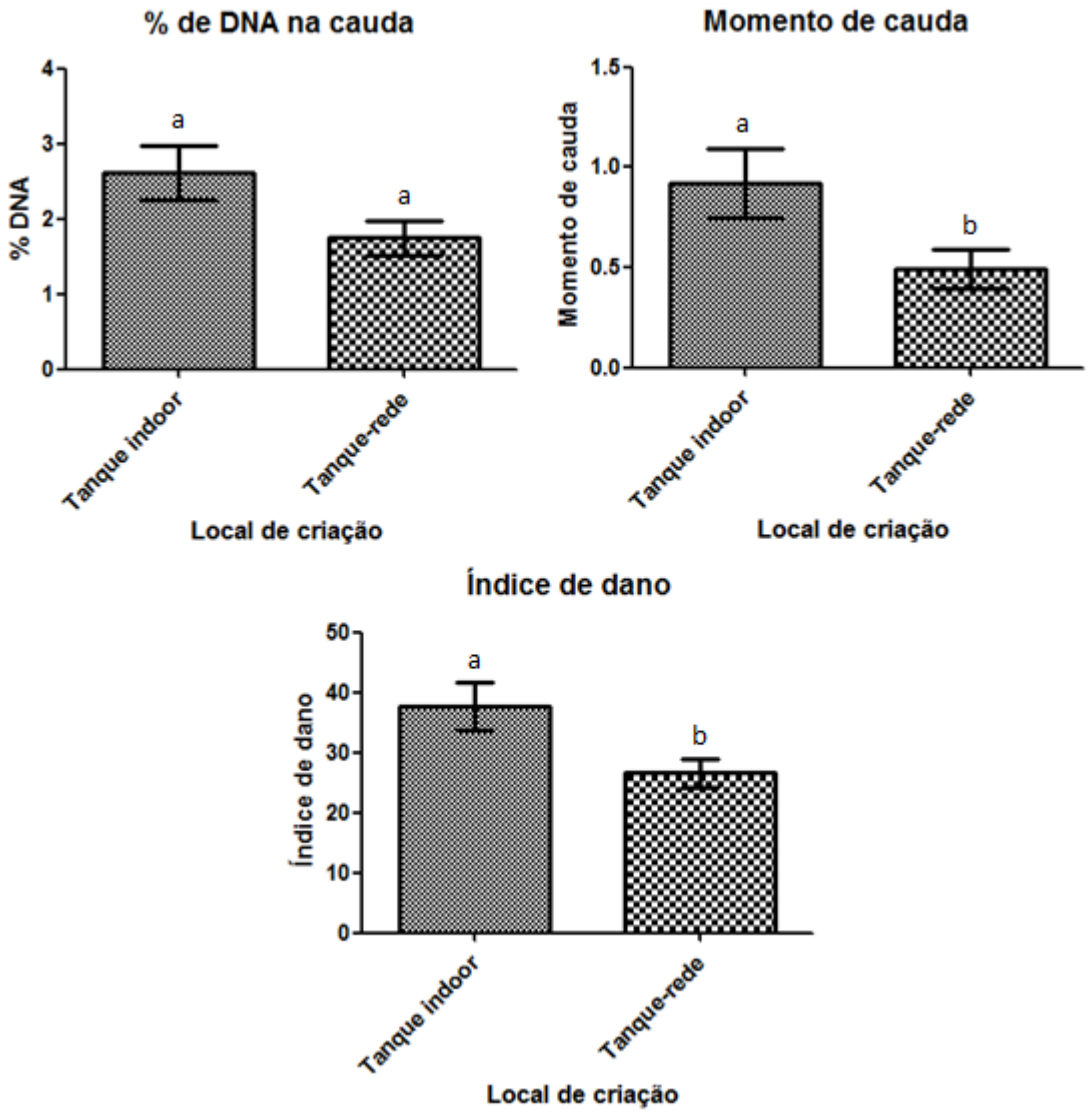

Figura 17: Ensaio cometa de beijupirás mantidos em dois sistemas de criação diferentes (tanque *indoor* e tanque-rede) durante o experimento final do trabalho. Os dois primeiros gráficos representam a análise computadorizada de imagem e o terceiro a análise visual. As barras de erro representam o erro padrão das amostras e letras diferentes representam diferenças significativas, considerando-se p menor que 0,10.

V.4. Ensaio de micronúcleo e anormalidades nucleares

Tanto no pré-teste, como no experimento final do trabalho, observa-se uma tendência de maior frequência de anormalidades nucleares nos eritrócitos dos indivíduos do tanque *indoor* em relação aos do tanque-rede (Figura 18). Os valores das frequências

de anormalidades são próximos nas duas amostragens, porém, provavelmente devido ao aumento de organismos amostrados no experimento final, a segunda coleta apresenta um menor erro padrão e, consequentemente, ocorreram mais diferenças significativas estatisticamente.

No pré-teste, apenas as anormalidades dos tipos reniforme e segmentado apresentaram uma frequência significativamente maior no tanque *indoor*, sendo *p* igual a 0,0574 e 0,0481, respectivamente. No experimento final, os micronúcleos, o ENA e as anormalidades dos tipos lobado e segmentado apresentaram uma frequência significativamente maior no tanque *indoor*, sendo os valores de *p*, respectivamente, iguais a 0,0979; 0,0035; 0,0070 e 0,0021.

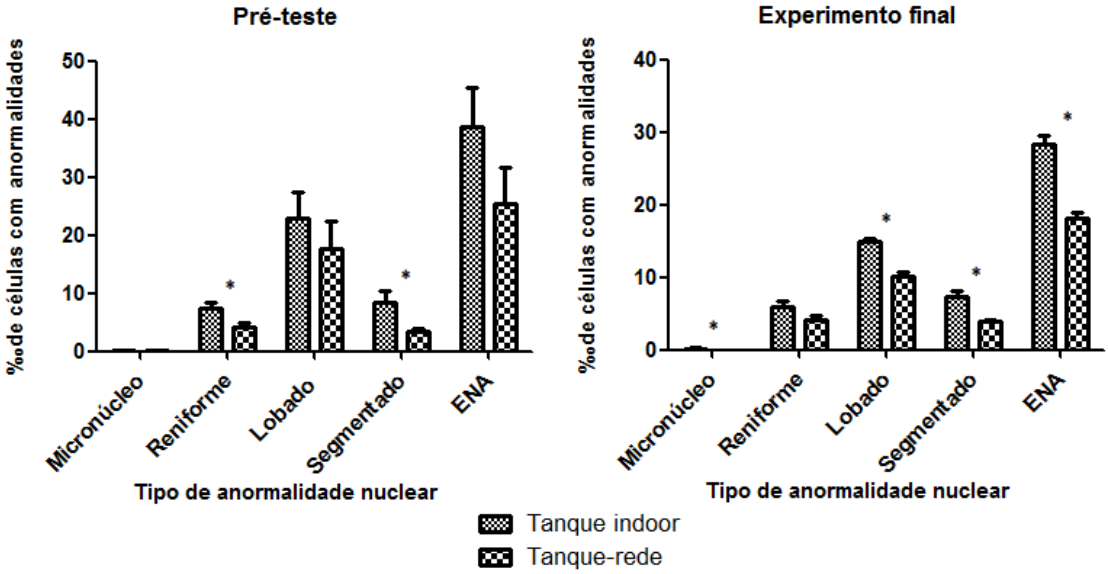

Figura 18: Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares em beijupirás mantidos em dois sistemas de criação diferentes (tanque *indoor* e tanque-rede). As barras de erro representam o erro padrão das amostras e * representam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10.

V.5. Imuno-histoquímica

Os valores encontrados da expressão da proteína p53 são bem próximos nos fígados dos indivíduos dos dois sistemas de criação utilizados, tanto no pré-teste como no experimento final do trabalho (Figura 19), não havendo diferença significativa entre eles (*p* igual a 0,64 no pré-teste e 0,63 no experimento final).

Comparando-se as duas amostragens, os valores de Hscore encontrados no pré-teste foram menores do que os encontrados no experimento final, sendo seus valores médios, respectivamente, 94,36 ± 16,74 e 173,10 ± 4,24 no tanque *indoor* e 105,10 ± 14,97 e 167,8 ± 4,98 no tanque-rede.

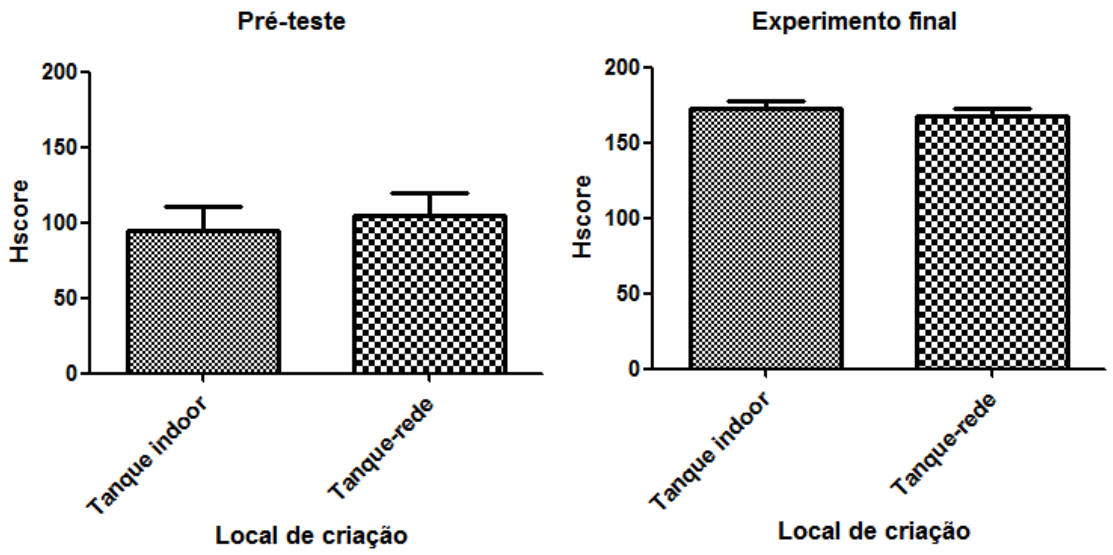

Figura 19: Resultados dos ensaios imuno-histoquímicos realizados para a detecção da expressão da proteína p53 com beijupirás mantidos em dois sistemas de criação diferentes. As barras de erro representam o erro padrão da amostra.

V.6. Enzimas da defesa antioxidante

No pré-teste, foram coletadas amostras de fígado, brânquia e músculo de beijupirás para determinação do tecido a ser utilizado no experimento final com base na melhor resposta de análise. De forma geral, em relação aos tecidos, pode-se observar uma atividade enzimática mais alta no fígado, na maioria das enzimas testadas (Figura 20), sendo, por esse motivo, este o tecido escolhido para serem realizadas as análises do experimento final. O tecido muscular apresenta uma atividade muito baixa tanto de GPx, como de catalase (Figura 20), mostrando sua baixa capacidade para decompor peróxidos.

No pré-teste, a atividade da catalase dos organismos coletados nos dois sistemas diferentes apresentou valores próximos para um mesmo tecido, sendo eles altos para o fígado e baixos para as brânquias e músculo (Figura 20), não havendo diferença significativa em nenhum dos três tecidos coletados nas diferentes condições de criação. Em relação à atividade da GPx, os tecidos muscular e hepático apresentaram atividades semelhantes nas duas condições, com valores baixos de atividade no músculo e altos no

fígado, havendo uma maior variação nos valores da atividade de organismos coletados no tanque *indoor* (Figura 20). Com relação à atividade da GPx nas brânquias, ocorreu uma diferença significativa (p = 0,0175) em relação às duas condições, com uma expressão maior dessa enzima nos organismos coletados nos tanques *indoor*. Já a atividade da SOD foi semelhante nas duas condições para os tecidos branquial e muscular, sendo que o segundo apresentou maior variação de valores nos organismos coletados no tanque *indoor* (Figura 20). A atividade da SOD no fígado apresentou diferença significativa entre as duas condições (p = 0,0166), com uma maior atividade desta enzima nos organismos coletados no tanque-rede.

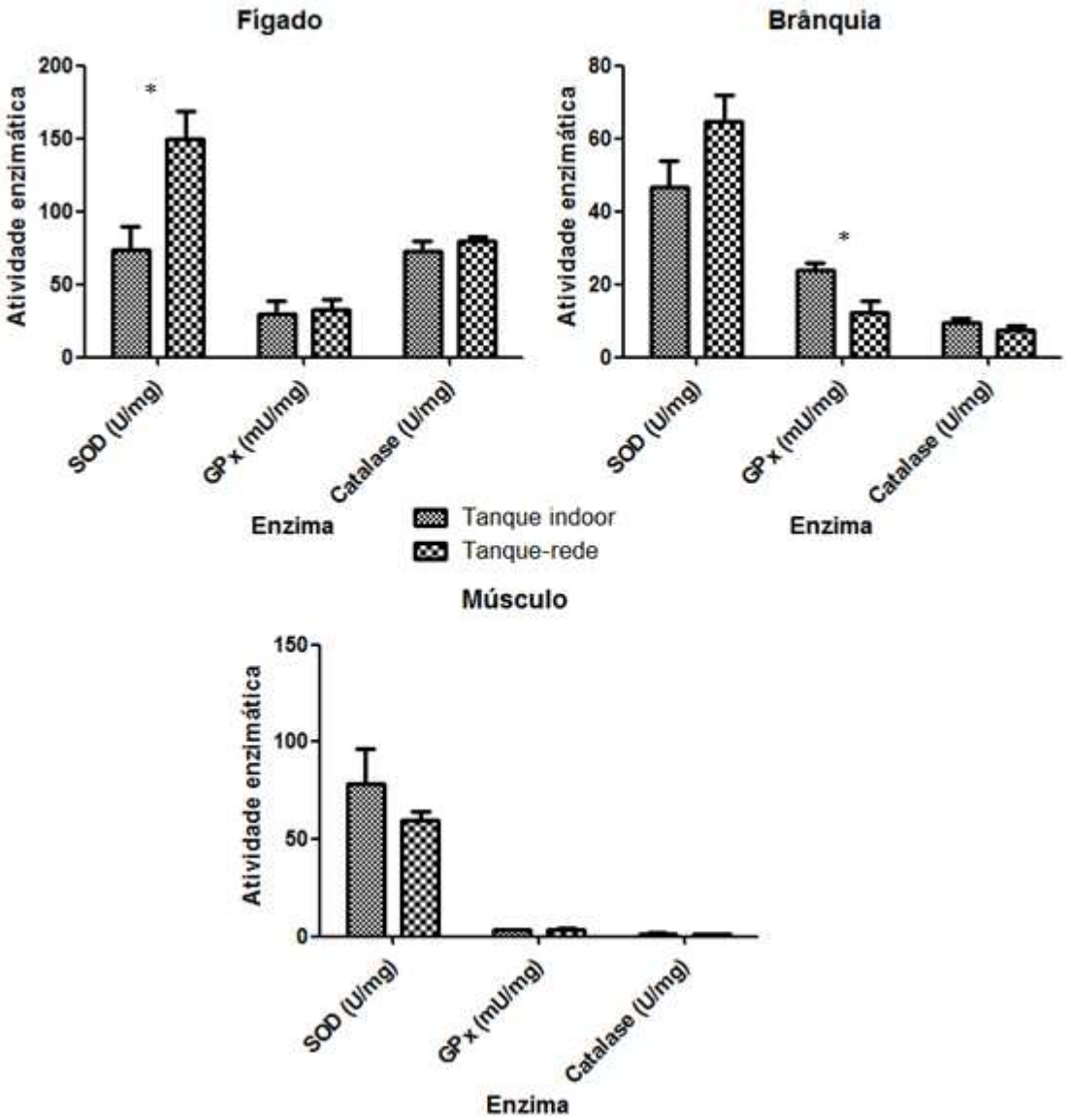

Figura 20: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase em fígado, brânquia e músculo de beijupirás criados em dois sistemas diferentes durante o pré-teste. As

barras de erro representam o erro padrão das amostras e * representam diferenças significativas, considerando-se *p* menor que 0,10.

Em relação ao experimento final, os valores de atividade foram próximos em todas as enzimas, sendo que a GPx e a catalase apresentaram valores de atividades um pouco maiores nos organismos do tanque-rede, enquanto na SOD a atividade mais alta foi em organismos do tanque *indoor* (Figura 21). Nenhuma das enzimas testadas apresentou diferenças significativas em sua atividade entre os organismos coletados no tanque *indoor* e no tanque-rede.

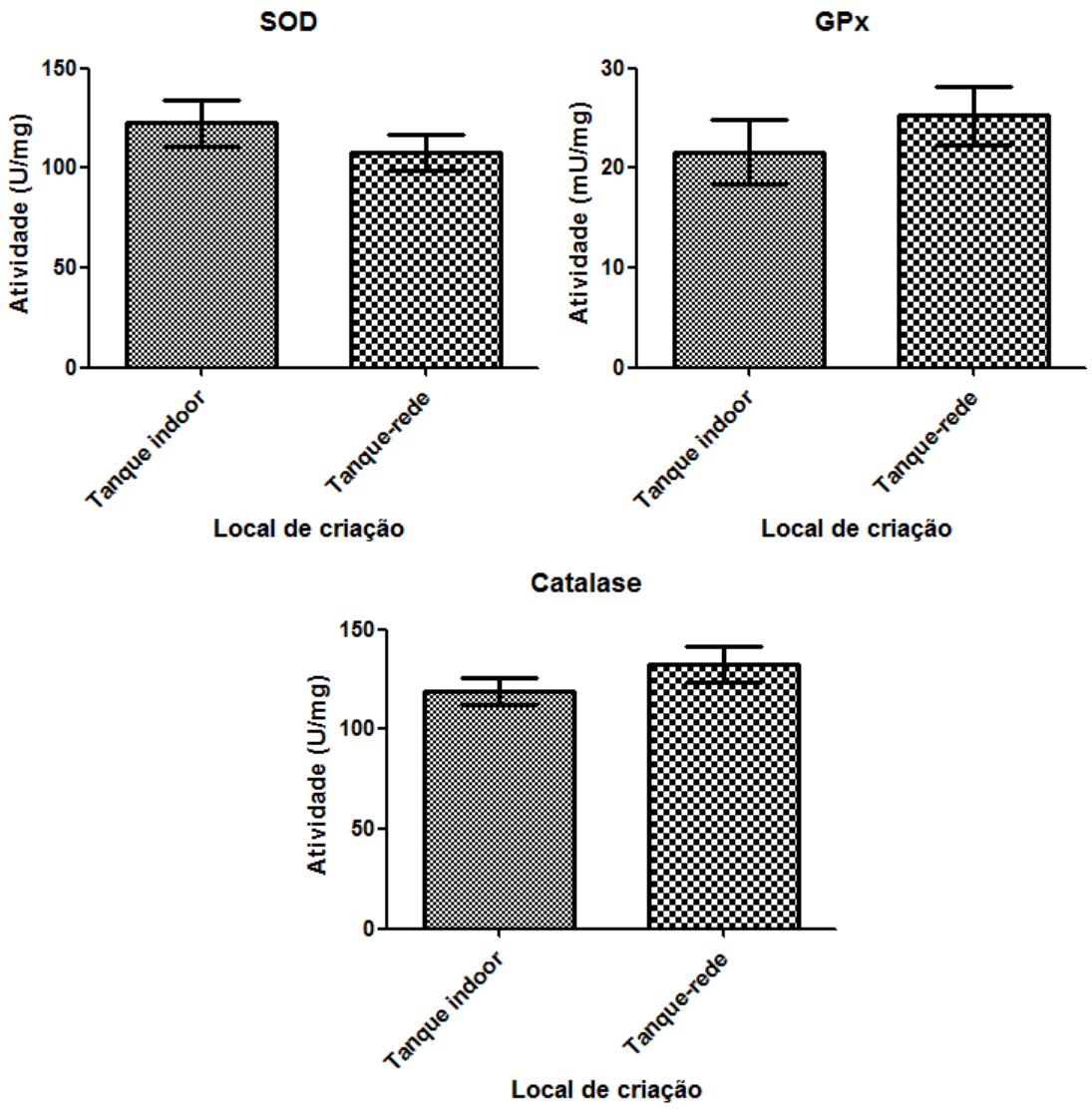

Figura 21: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase no tecido hepático de beijupirás criados em dois sistemas diferentes durante o experimento final deste trabalho. As barras de erro representam o erro padrão das amostras.

Em uma comparação entre o pré-teste e o experimento final (Tabela 3), há um aumento da atividade da catalase nos indivíduos dos dois sistemas de criação (73,08 ± 6,66 U/mg nos organismos do tanque *indoor* e 80,10 ± 2,14 U/mg nos organismos do tanque-rede no pré-teste e 118,80 ± 6,73 U/mg nos organismos do tanque *indoor* e 132,30 ± 9,00 U/mg nos organismos tanque-rede no experimento). Já com relação a GPx, ocorreu uma diminuição da atividade enzimática (29,99 ± 8,59 mU/mg nos organismos do tanque *indoor* e 32,94 ± 6,92 mU/mg nos organismos do tanque-rede no pré-teste e 21,60 ± 3,23 mU/mg nos organismos do tanque *indoor* e 25,25 ± 2,88 mU/mg nos organismos tanque-rede no experimento). Os valores de atividade da SOD aumentaram no tanque *indoor* e diminuíram no tanque-rede (73,72 ± 15,72 U/mg nos organismos do tanque *indoor* e 149,66 ± 18,77 U/mg nos organismos do tanque-rede no pré-teste e 122,40 ± 11,49 U/mg nos organismos do tanque *indoor* e 107,70 ± 9,27 U/mg nos organismos tanque-rede no experimento).

Tabela 3: Comparação entre a atividade enzimática do fígado de beijupirás cultivados em tanque-rede e tanque *indoor* entre o pré-teste e experimento final.

	Tanque-rede			Tanque *indoor*		
	Pré-teste	Exp. Final	Comparação	Pré-teste	Exp. Final	Comparação
SOD (U/mg)	149,66 ± 18,77	107,70 ± 9,27	↓	73,72 ± 15,72	122,40 ± 11,49	↑
GPx (mU/mg)	32,94 ± 6,92	25,25 ± 2,88	↓	29,99 ± 8,59	21,60 ± 3,23	↓
Catalase (U/mg)	80,10 ± 2,14	132,30 ± 9,00	↑	73,08 ± 6,66	118,80 ± 6,73	↑

VI. Discussão

Apesar de que a aquicultura de beijupirás já ser realizada no Taiwan há mais de uma década (LIAO et al., 2004), ainda há muitos aspectos que devem ser aprimorados para o melhor desenvolvimento desta atividade em todo o mundo. Neste país, os juvenis são criados em tanques escavados e tanques-rede próximos à costa, até atingirem tamanho suficiente para serem transferidos para gaiolas *offshore* (LIAO et al., 2004). O crescimento em tanques escavados, porém, limita a produção de juvenis segundo as condições ambientais, reduzindo a produção de indivíduos para engorda (WEBB Jr. et al., 2007). Além disso, a construção de tanques escavados, no Brasil e em vários outros países, está normalmente associada a áreas de manguezais, ameaçando esse importante ecossistema. Por esses motivos, é necessário buscar formas alternativas para a criação. Neste trabalho beijupirás foram criados em tanque-rede próximo à costa e em tanque *indoor*, como uma alternativa aos tanques escavados.

Embora durante o período experimental deste trabalho tenham ocorrido perdas de indivíduos no tanque-rede, acredita-se que elas não afetaram os resultados principais, pois ocorreram ao acaso. A fuga dos peixes dos tanques-rede é um grande problema para a aquicultura que acontece, principalmente, devido a problemas técnicos e operacionais e por buracos na rede causados pelos próprios peixes criados ou por predadores que mordem sucessivamente a rede (MOE et al., 2009; ARECHAVALA-LOPEZ et al., 2012; KALANTZI et al., 2016). Neste trabalho, a fuga pode ter sido ocasionada por pequenos buracos na rede feitos tanto pelos peixes criados, como por tartarugas que vivem na região e se alimentam do *fouling* que cresce na rede, e havendo também a possibilidade dos peixes terem sido levados por pessoas, já que o tanque não possuía vigilância por 24 horas.

Também é importante destacar que os indivíduos do tanque-rede estavam mais sujeitos às variações climáticas do que os do tanque *indoor*, se alimentando menos em dias de chuva e entradas de frente fria, por causa do aumento da turbidez da água. Porém este fato parece não ter afetado o crescimento dos organismos, já que as taxas de crescimento somático dos beijupirás dos dois tanques foram próximas, além de que o peso médio final e a média de ganho de massa por indivíduo dos peixes do tanque-rede foram maiores em relação aos do outro tanque.

Ainda com relação ao crescimento somático, os valores encontrados neste trabalho (0,66% por dia no tanque *indoor* e 0,73% por dia no tanque-rede) são um pouco menores que o único encontrado na literatura para beijupirás (0,82% por dia) na faixa de peso utilizada no experimento (SAMPAIO et al., 2011). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que Sampaio et al. (2011) usaram sardinhas congeladas para alimentação dos beijupirás, enquanto que neste trabalho foi utilizado ração comercial.

Valores de conversão alimentar para beijupirás, na faixa de peso utilizada neste trabalho e em outras fases posteriores do desenvolvimento, não foram encontrados na literatura para comparação. O fator de conversão alimentar (FCA) para indivíduos de 100 a 200g foi de 1,77 (COSTA-BONFIM et al., 2014), ou seja, inferior ao encontrado neste trabalho (2,74). Comparativamente com outras espécies de peixes carnívoros, o FCA encontrado neste trabalho também foi mais alto; Rombenso et al. (2016) encontraram valores de FCA para *Trachinotus carolinus* entre 1,33 e 1,61 conforme a composição da ração testada; Silva-Carrillo et al. (2012) calcularam valores entre 1,22 e 1,31 para a espécie *Lutjanus guttatus* conforme a quantidade de proteína de peixe substituída por soja; Booth et al. (2008) encontraram valores de 1,39 a 1,80 para *Pagrus auratus* conforme o número de vezes e o período em que eram alimentados. Quanto mais próximo a 1 está o FCA, melhor é a eficiência da assimilação do alimento. Os altos valores do fator de conversão dos beijupirás encontrados neste trabalho podem ser diretamente relacionados a menor taxa de crescimento em comparação com a literatura. Esses resultados podem estar relacionados com a fase do ciclo de vida, com a qualidade e tipo de dieta e com as condições de cultivo.

Normalmente, a ração para beijupirás é oferecida com base no percentual do seu peso, em torno de 2 a 3% (LIAO et al., 2004), porém, neste trabalho, optou-se por alimentar os organismos até a saciedade, como forma de garantir que todos os peixes seriam alimentados, não havendo competição por alimento. O consumo de alimento dos beijupirás em relação ao seu peso também é similar ao da espécie *Trachinotus carolinus* que variou entre 3,09 a 3,65% segundo Rombenso et al. (2016) conforme a formulação da ração utilizada.

Organismos criados no oceano são expostos a condições do ambiente e também a todos os organismos que vivem nele, incluindo parasitas. *Neobenedenia* sp. é um dos ectoparasitas mais comuns encontrados em criações de peixes em áreas tropicais e

subtropicais, causando letargia, olhos embaçados, excesso de produção de muco, anorexia e morte (MUELLER et al., 1994; HURLEY-SANDERS et al., 2016). Este parasita se alimenta do muco e das células epiteliais do hospedeiro, e causa alterações no comportamento do peixe como, por exemplo, a tendência de peixes pelágicos e com hábitos natatórios ativos, como o beijupirá, permanecerem no substrato, tornando-os mais vulneráveis a lesões que podem ocasionar infecções secundárias (KERBER et al., 2011).

Antes de iniciar uma criação, devido às possíveis infestações com *Neobenedenia* sp. e a outros possíveis parasitas, recomenda-se submeter os peixes a um banho de água doce de 2 a 5 minutos para matar os parasitas adultos antes que os organismos sejam estocados; também é importante que estes banhos sejam dados com uma certa periodicidade durante a criação (MUELLER et al., 1994). Apesar de todos os beijupirás inicialmente terem sido submetidos a um banho de água doce e os peixes do tanque *indoor* terem passado por um outro banho no meio do período experimental, foi encontrado *Neobenedenia* sp. na maioria dos peixes estocados durante a biometria final, destacando ainda mais a importância de banhos periódicos durante o cultivo. A presença deste parasita pode também ter auxiliado no resultado da pequena diferença entre os valores de crescimento somático encontrados e o da literatura.

O índice hepato-somático (HSI) é considerado por alguns autores um biomarcador para poluição aquática (VAN DYK et al., 2012), sendo que peixes submetidos à adição de compostos carcinogênicos, ambientes contaminados por metais e eutrofizados tiveram um HSI maior em relação aos que não foram expostos a estas condições (VAN DYK et al., 2012; DRAGUN et al., 2013; MACHADO et al., 2014b). Nestes casos, um aumento do HSI é normalmente associado a uma maior atividade de desintoxicação em resposta a presença de compostos tóxicos (PEREIRA et al., 1993). Porém, em condições de criações de altas densidades, um menor HSI é associado a uma menor quantidade de gordura no fígado, devido a um maior consumo das gorduras hepáticas causado pelo estresse das altas densidades, havendo um redirecionamento da energia do peixe para ele conseguir lidar com a situação de estresse causada (BASRUR et al., 2010; TOLUSSI et al., 2010).

Considerando que os beijupirás foram mantidos na mesma densidade de estocagem nos dois tanques no experimento final, acredita-se que o maior HSI

encontrado no tanque *indoor* possa estar relacionado com uma resposta a algum composto tóxico, como a amônia e/ou o nitrito. O HSI pode ser considerado como um bom biomarcador de qualidade de água (VAN der OOST et al., 2003). As concentrações de nitrito e amônia no tanque-rede se mantiveram abaixo do limite de detecção durante todo o período experimental, enquanto que as concentrações do tanque *indoor* permaneceram entre os limites de aceitável e crítico, conforme padrões já estabelecidos, durante a maior parte do período experimental. Apesar de os testes toxicológicos de amônia e nitrito em beijupirás considerarem esta espécie altamente tolerante a altas concentrações desses compostos (ATWOOD et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007), estes podem ocasionar respostas tais como alterações em alguns parâmetros fisiológicos, incluindo o HSI, para compensar a situação e evitar a mortalidade.

Com relação ao pré-teste, por não se ter conhecimento da densidade de estocagem dos indivíduos e dos parâmetros físicos da água, não é possível afirmar que o maior HSI dos indivíduos do tanque-rede esteja relacionado a uma menor condição de estresse resultante de uma densidade de estocagem mais baixa ou à pior qualidade da água, visto que o pré-teste foi realizado em um período de feriado, no qual há uma maior movimentação de barcos próximos ao tanque-rede, podendo aumentar as concentrações de óleo no ambiente.

Os índices morfométricos são normalmente utilizados para estimar as condições de saúde, com base no princípio de que mudanças no peso e comprimento do corpo de um peixe implicam em alterações nas condições fisiológicas dos organismos, e um dos índices mais utilizados é o fator de condição de Fulton (K) (SUTTON et al., 2000). Este fator de condição pressupõe que os indivíduos testados possuem um crescimento isométrico, assumindo que, comparando-se peixes de um mesmo comprimento, o mais pesado será aquele com melhores condições de saúde; assim, quanto maior o valor de K, melhor seria o estado fisiológico do organismo (KERAMBRUN et al., 2013). Também está estabelecido que peixes saudáveis apresentam um K maior que 1 (SARAIVA et al., 2015).

Considerando os resultados de K obtidos no experimento final do trabalho, os peixes dos dois tanques encontravam-se em boas condições de saúde ($K > 1$) e seu estado fisiológico era semelhante (o K encontrado para o tanque *indoor* foi de 1,33 ± 0,11 e para o tanque-rede 1,34 ± 0,17), apesar da diferença encontrada pelo HSI. Com

relação ao pré-teste, os organismos dos dois tanques também se encontravam em um bom estado de saúde, porém os peixes do tanque-rede apresentaram um K significativamente maior (o K do tanque-rede foi 1,12 ± 0,04 e do tanque *indoor* 1,03 ± 0,07), estando, então, comparativamente em melhores condições que os indivíduos do tanque *indoor*. É importante destacar que os beijupirás do experimento final possuem um K significativamente maior que aqueles do pré-teste, o que é um indicativo de melhores condições de saúde.

Comparando HSI e K, percebe-se que o HSI é uma medida mais sensível a variações fisiológicas de beijupirás que o K. No experimento final, o HSI demonstrou uma diferença nas condições fisiológicas entre os organismos do tanque-rede e do tanque *indoor*, enquanto o K não detectou diferenças entre eles. Já no pré-teste, as duas medidas detectaram diferenças entre os tanques e, devido a este fato, é possível associar os dois parâmetros para inferir que o menor HSI do tanque *indoor* provavelmente está relacionado ao estresse decorrente da maior densidade de estocagem, já que o maior K do tanque-rede é um indicativo de que os organismos estão em melhor estado do que os do tanque *indoor*. Portanto, apesar de o HSI aparentar ser mais sensível que o K, as duas medidas estão certamente relacionadas e, quando analisadas em conjunto, permitem um melhor entendimento das condições gerais do peixe.

Danos ao DNA em organismos aquáticos podem interferir negativamente nas taxas de crescimento, provocar desenvolvimento anormal e ocasionar maior mortalidade (LEE; STEINERT, 2003); portanto, a avaliação de danos genotóxicos em organismos de criação pode ser uma importante ferramenta para monitorar a qualidade do sistema de criação. O ensaio cometa está entre as técnicas de avaliação de genotoxicidade mais empregadas atualmente, pois apresenta uma série de vantagens tais como: a possibilidade de medição do dano ao DNA em cada célula individualmente; a necessidade de apenas um pequeno número de células para o procedimento experimental; poder ser realizado em qualquer organismo eucarioto; o fato de ser um método muito sensível e por gerar medidas conclusivas sobre as condições de estresse (LEE; STEINERT, 2003; MARTINS; COSTA, 2015).

No ensaio cometa pode-se realizar dois tipos de análises distintas, a análise visual e a análise computadorizada de imagens. A análise visual possui como maior vantagem a possibilidade de analisar lâminas com menor definição no contorno das

células, enquanto que para utilizar a análise computadorizada de imagens os contornos de todas as células devem estar bem definidos. A análise computadorizada de imagens gera uma série de parâmetros, porém os mais utilizados são o momento de cauda e a porcentagem de DNA na cauda (LEE; STEINERT, 2003). Além disso, estas medidas, por serem relativas, contornam os problemas de diferenças entre núcleos e células de um indivíduo, que seriam retratados em medidas absolutas, como o tamanho da cauda (MARTINS; COSTA, 2015).

Como foi a primeira vez que a técnica do ensaio cometa foi aplicada em beijupirás, houve a necessidade de realizar um controle positivo, que também tem como função verificar a eficácia do método. Foram utilizadas concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (5, 10, 20 e 40µM) e o dano ao DNA encontrado foi aumentando conforme as concentrações, tanto na análise visual, como na computadorizada de imagem, indicando, assim, que a técnica é confiável e pode ser bem estabelecida para esta espécie. É importante destacar também que o beijupirá teve uma resposta bem definida e precisa, com baixos valores de erro padrão, modulando os danos conforme a concentração da substância de referência, o que indica que esses peixes podem ser indicadores sensíveis de genotoxicidade ambiental.

Os resultados demonstraram que os peixes criados no tanque *indoor* apresentaram um dano genotóxico significativamente maior que os do tanque-rede. O dano encontrado em todos os parâmetros analisados (ID, momento de cauda e porcentagem de DNA na cauda) é baixo até mesmo se comparado com a concentração de 5µM de peróxido de hidrogênio, indicando que os organismos ainda possuem pouca fragmentação do DNA. Apesar de pequeno este dano existe, indicando a necessidade de monitoramento para evitar as consequências que uma exposição prolongada a fatores genotóxicos podem ocasionar. Além disso, os valores de dano genotóxico encontrados são próximos aos valores de dano de indivíduos utilizados como controles de experimentos com testes de toxina ou monitoramento ambiental de outras espécies de peixes marinhos (ANDRADE et al., 2004; VIGNARDI et al., 2015), indicando novamente um baixo dano ao DNA. Mesmo que esse dano tenha sido baixo, a técnica do ensaio cometa conseguiu detectá-lo, reforçando ainda mais a hipótese de que esta espécie responde bem a estressores genotóxicos.

Neste trabalho, a análise visual e a análise computadorizada de imagem tiveram resultados similares, com a mesma tendência e significância, indicando que qualquer uma das duas pode ser utilizada para futuros trabalhos com esta técnica e espécie, desde que o observador seja bem treinado. Com relação aos parâmetros analisados, o momento de cauda e o ID apresentaram resultados significativamente maiores de dano no tanque *indoor*. O momento de cauda é um parâmetro um pouco mais preciso que a porcentagem de DNA na cauda, por envolver tanto a porcentagem de DNA, como o tamanho da cauda no seu cálculo. Apesar de não ter apresentado um resultado significativo no experimento de criação nos tanques, a porcentagem de DNA na cauda apresentou a mesma tendência das outras medidas e o p apresentado foi bem próximo ao limite considerado de significância (p foi igual a 0,1029).

Outra técnica também bastante utilizada para avaliação de genotoxidade é o ensaio de micronúcleos e demais anormalidades nucleares. É recomendável que ambas as técnicas sejam aplicadas em conjunto, pois seus dados são complementares (MARTINS; COSTA, 2015). Por representarem diferentes tipos de lesão ao DNA, anormalidades nucleares são resultantes de danos aos cromossomos e normalmente relacionadas a falhas na divisão celular e quebras no DNA que acontecem no próprio polímero de DNA. Por isso, o emprego dessas técnicas em conjunto permite uma visão mais ampla da atuação dos estressores genotóxicos. Além disso, um composto que ocasionou quebras na fita de DNA detectadas pelo ensaio cometa, não necessariamente ocasionará lesões cromossômicas (MARTINS; COSTA, 2015).

Em peixes, as anormalidades nucleares já foram relacionadas a deficiências nutricionais (COWEY; WOODWARD, 1993) e poluição (GRAVATO; SANTOS, 2002a; ÇAVAŞ; ERGENE-GOZUKARA, 2003; VIGNARDI et al., 2015). Como os mecanismos de formação das anormalidades nucleares ainda é pouco conhecido e não há consenso para explicar sua formação, alguns autores sugerem a inclusão das demais anormalidades nos ensaios ao invés de utilizar apenas os micronúcleos em testes de genotoxidade (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2001; STRUNJAK-PEROVIC et al., 2009).

Tanto no pré-teste como no experimento final, observou-se uma tendência a maior frequência de anormalidades nucleares nos organismos criados no tanque *indoor* em relação aos do tanque-rede. Esta tendência mostrou-se significativamente diferente

nas anormalidades reniforme e segmentada no pré-teste e nos micronúcleos, anormalidades lobada, segmentada e reniforme e no total de anormalidades no experimento final. Diferenças significativas entre os dois períodos de amostragem e a mesma forma de criação só foram encontradas no ENA do tanque *indoor*. Esta técnica também permitiu detectar como os beijupirás são sensíveis e possuem uma boa reposta a estressores genotóxicos.

Os resultados encontrados no teste de anormalidades nucleares e no ensaio cometa são complementares, mostrando um maior dano genotóxico, tanto em relação a lesões cromossômicas como a fragmentos de DNA, nos indivíduos criados no tanque *indoor*. Os dados de genotoxicidade também podem ser relacionados ao maior HSI (VAN der OOST et al., 2003) também encontrado nos organismos do tanque *indoor* no período experimental, o que pode estar relacionado, entre outros fatores não detectados, à maior concentração de amônia e/ou nitrito do tanque *indoor*.

A proteína p53, conhecida como supressora de tumores, realiza um importante papel na regulação da apoptose e proliferação celular (CHENG et al., 2015). Vários estudos já identificaram respostas do seu mecanismo de regulação, em relação a diversos estressores celulares, como dano ao DNA, estresse oxidativo, hipóxia e exposição a compostos tóxicos (IBRAHEM; IBRAHIM, 2014; CHENG et al., 2015; INOUE et al., 2005). A principal função desta proteína é restringir o número de células anormais ou expostas a alguma fonte de estresse antes que o dano causado ao seu DNA seja convertido em alguma mutação irreparável (IBRAHEM; IBRAHIM, 2014).

Os beijupirás do pré-teste e do experimento final não apresentaram diferenças significativas em relação aos dois sistemas de criação, porém a expressão da p53 encontrada nos organismos do experimento final foi alta comparativamente com a observada em outros peixes. O peixe *Trachinotus carolinus* só apresentou expressão da p53 em valores próximos ao encontrado em beijupirás quando expostos a 32° e 34°C nas brânquias e de 30 a 36°C no coração (CARDOSO et al., 2015). Com relação ao pré-teste, os valores de expressão da p53 encontrados foram similares ao da temperatura controle (22°C) para o peixe *Trachinotus carolinus* (CARDOSO et al., 2015).

Esta expressão mais alta da p53 no experimento final pode indicar que as células estão submetidas a situações de estresse e a p53 está sendo ativada para regular os danos. A expressão pode ser associada ao ensaio cometa que demonstrou haver quebras

reparáveis no DNA dos beijupirás do experimento final e ao ensaio de micronúcleo que demonstrou haver também anormalidades nucleares permanentes. No pré-teste, a expressão da p53 foi mais baixa e, também, foram detectados danos permanentes no DNA pelo ensaio de micronúcleos com uma menor quantidade de diferenças significativas entre os tanques.

Apesar de possuir uma expressão mais baixa no pré-teste, a p53 em nenhum indivíduo dos sistemas e no período amostrado apresentou valores próximos de zero, indicando que, mesmo em pequena quantidade, estava expressa nas células. Uma hipótese possível de se elaborar é que o DNA do beijupirá é afetado por estressores genotóxicos, como foi observado nos ensaios cometa e de anormalidades nucleares, mas que seus mecanismos de reparo, como a p53, estariam sempre prontos para serem utilizados. Essa seria uma das possíveis explicações do fato de que o DNA apresenta quebras proporcionais ao estressor, como no caso da água oxigenada, mas que os valores de ID e de ENA são relativamente baixos.

Um dos principais causadores de danos ao DNA nos seres vivos são as espécies reativas de oxigênio (EROS). As EROS são fundamentais para o bom funcionamento do organismo, porém, em excesso, podem ocasionar diversos problemas. As condições de cultura intensiva, um fundamento básico da aquicultura, podem gerar fatores estressantes que ocasionam no aumento da atividade metabólica dos organismos e, consequentemente, elevam a produção de EROS (SAHIN et al., 2014).

Em um organismo, as EROS são principalmente combatidas pelas enzimas da defesa antioxidante, tais como a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), sendo a primeira responsável pela transformação do radical superóxido em H_2O_2 e as outras duas por degradarem peróxidos em compostos sem efeitos toxicológicos (CHENG et al., 2015). Portanto, as mudanças na atividade dessas três enzimas são consideradas como bons marcadores do estresse oxidativo (JIN et al., 2011).

Os beijupirás criados neste trabalho tiveram valores de atividade enzimática da SOD, GPx e CAT similares nos dois sistemas de criação e sem diferenças significativas entre eles. Apesar de danos genotóxicos demonstrarem prováveis relações com o estresse oxidativo (JIN et al., 2011; CHENG et al., 2015), estas não puderam ser comprovadas neste trabalho. A atividade da SOD nas amostras do pré-teste foi

significativamente maior nos beijupirás do tanque-rede em relação aos do tanque *indoor*. No experimento final, entretanto, a atividade da SOD, em termos absolutos, diminuiu nos peixes do tanque-rede e aumentou nos do tanque *indoor*, tornando a diferença não significativa. Não podemos pensar em uma hipótese do porquê dessas diferenças, pois não temos dados sobre, por exemplo, qualidade da água, de densidade e do histórico dos peixes do pré-teste. Entretanto, a magnitude das diferenças de atividade encontradas parecem indicar que a SOD pode ter tido sua expressão modulada de acordo com condições bióticas e/ou abióticas dos sistemas nas duas ocasiões distintas. As atividades mensuradas das demais enzimas não apresentaram diferenças significativas.

As atividades enzimáticas da SOD, GPx e CAT em peixes ainda estão sendo estudadas, pois há diferenças de respostas entre as diferentes espécies e em uma mesma espécie quando em seu habitat natural ou laboratório. Em vários casos as respostas não são detectadas ou são opostas ao esperado (VAN der OOST et al., 2003). Ainda em sua revisão do assunto, Van der Oost et al. (2003) encontraram trabalhos de exposição de diversas espécies de peixes em laboratório e campo a variados poluentes, como PCBs e HPAs, porém as atividades das enzimas foram bastante variáveis, não seguindo um padrão coerente. Por exemplo, a atividade da SOD, ao contrário do esperado, não apresentou nenhuma alteração significativa de atividade em peixes expostos a contaminantes em diversos estudos de laboratório, enquanto que em estudos de campo apresentou um aumento significativo na maioria dos casos frente a estressores ambientais. Em outros trabalhos de campo ocorreu, inclusive, uma diminuição significativa da atividade desta enzima, quando o esperado seria o aumento. Quanto à GPx, na literatura pesquisada pelos autores, em vários trabalhos não foram detectadas alterações significativas da atividade desta enzima, tanto em campo como em laboratório, enquanto que em outros trabalhos foram constatados casos de aumento e de diminuição significativa da atividade em relação a fatores considerados como controle. Com relação a CAT, sua atividade se manteve sem alterações significativas na maioria dos estudos de laboratório pesquisados, enquanto que a maioria dos estudos de campo apresentou um aumento significativo da atividade desta enzima. Como nos demais casos, alguns estudos de campo também apresentaram uma diminuição significativa da atividade quando o esperado seria o oposto. Portanto são necessários mais estudos, tanto

em campo quanto em laboratório, para melhor compreender as atividades bioquímicas dessas enzimas em peixes.

Considerando todas as metodologias empregadas neste trabalho e seus resultados, foi possível padronizar as técnicas utilizadas, cumprindo um dos objetivos iniciais deste trabalho. Apesar de nem todas as metodologias apresentarem diferenças significativas conforme era esperado, foi possível obter resultados consistentes em todas elas. Com relação a um monitoramento do cultivo, o HSI aliado ao K, o ensaio cometa e o ensaio de anormalidades nucleares mostraram-se muito sensíveis para avaliar o estado fisiológico de beijupirás em cativeiro, sendo que as duas últimas podem ser realizadas sem sacrificar o organismo. Apesar de ser esperada uma correlação entre o dano genotóxico e a atividade das enzimas relacionadas à defesa antioxidante, esta não foi detectada neste caso. Estudos bioquímicos são necessários para melhor compreender a atividade enzimática da SOD, GPx e CAT em beijupirás.

VII. Conclusão

O sistema de criação não afetou significativamente a taxa de crescimento dos indivíduos, já que os peixes dos tanques *indoor* e rede apresentaram valores próximos de SGR. O ganho de massa médio individual dos peixes também foi próximo, sendo o do tanque-rede um pouco maior.

Com relação aos danos genotóxicos e aos fatores morfométricos (HSI), a hipótese deste trabalho foi confirmada, pois, os beijupirás do tanque-rede apresentaram um menor dano genotóxico e um menor HSI, mostrando-se em um estado fisiológico aparentemente melhor do que os peixes do tanque *indoor*.

As enzimas da defesa antioxidante (SOD, GPx e catalase) e a p53 não detectaram diferenças entre os peixes dos dois sistemas de criação. Porém, devido ao padrão de resposta pouco conhecido destas enzimas ao estresse e a alta expressão encontrada de p53, seriam necessários mais estudos para compreender com maior profundidade os seus mecanismos de ação.

O ensaio cometa e o de micronúcleo e demais anormalidades nucleares se mostraram como as melhores ferramentas para monitoramento de animais de criação, já que sua metodologia é relativamente rápida e apresentaram um bom resultado com beijupirás. É também importante destacar que para a realização destas técnicas não é necessário sacrificar os organismos, pois estes podem ser apenas anestesiados para a retirada do sangue.

Parte II: Avaliação de dano genotóxico e de atividade enzimática de juvenis de beijupirás (*Rachycentron canadum*) expostos a um hidrocarboneto policíclico aromático de referência (β-naftoflavona)

I. Introdução

O termo biomarcadores foi definido pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos como sendo uma variação de componentes, processos, estruturas ou funções celulares ou bioquímicas induzidas xenobioticamente que é medida por uma amostra ou sistema biológico (GOLDSTEIN et al., 1987). Basicamente, biomarcadores são resultados finais de testes ecotoxicológicos que fazem um efeito em um organismo vivo, podendo ocorrer em níveis celulares, bioquímicos, moleculares ou fisiológicos e medidos em células, fluídos corporais, tecidos ou órgãos de um indivíduo que indicam exposição a um composto deletério ou seu efeito (LAM; GRAY, 2003).

Apesar de normalmente serem utilizados em trabalhos de monitoramento ambiental, pois possibilitam avaliar a qualidade do ambiente e seu estado de contaminação relacionando-os com os organismos que vivem no local, os biomarcadores também podem ser de grande utilidade para estudos de aquicultura e aprimoramento de técnicas de criação. Por exemplo, utilizando-se biomarcadores pode-se testar o grau de tolerância dos indivíduos a problemas que podem acontecer durante a criação, como exposição a compostos nitrogenados (RODRIGUES et al., 2011) e hipoxia (MAHFOUZ et al., 2015). Conhecendo-se os limites fisiológicos nos quais estas exposições ainda não causam danos, há uma maior facilidade e segurança no controle desses parâmetros. Além disso, biomarcadores podem ser ferramentas úteis para análise do efeito de mudanças na formulação da ração utilizada para alimentar os organismos criados (LIU et al, 2010; LIU et al., 2013).

Os efeitos genotóxicos de estressores ambientais podem ser detectados por diversos métodos experimentais. O material genético pode apresentar alterações basicamente em dois aspectos, mudanças estruturais e mutações, sendo o segundo um dano mais grave decorrente de uma exposição mais prolongada e com efeitos a longo prazo (SHUGART, 1996). Danos ao DNA em peixes de criação foram associados à redução do crescimento, anormalidade no desenvolvimento e à sobrevivência de larvas, juvenis e adultos de diversos organismos aquáticos (LEE; STEINERT, 2003). Como esses fatores são fundamentais para o sucesso de uma atividade de criação, o desenvolvimento e aplicação de métodos que detectam alterações provocadas por agentes genotóxicos têm interesse prático.

Mudanças estruturais no DNA são, principalmente, rupturas no filamento do DNA e mudanças na composição das bases menores (SHUGART et al., 1992). As quebras podem ser detectadas qualitativamente pelo ensaio cometa. Nesta técnica, por meio de uma eletroforese, os fragmentos de DNA migram formando uma espécie de uma cauda ao redor da cabeça (que é onde o DNA não fragmentado permanece), tornando possível comparar o grau de fragmentação do DNA de células de diferentes peixes. Como os eritrócitos são nucleados, o tecido sanguíneo é bastante prático como material para esse ensaio. O ensaio cometa é muito empregado por ser uma técnica relativamente fácil, rápida e de baixo custo (VAN der OOST et al., 2003).

Uma outra forma de se avaliar alterações genotóxicas consiste na identificação e quantificação de alterações permanentes na molécula de DNA, por meio de ensaios citogênicos, como o da estimativa das anormalidades nucleares eritrocitárias (ENA), por meio da identificação de alterações morfológicas dos núcleos celulares (lobado, segmentado, reniforme e micronúcleos) e quantificação da frequência de ocorrência dos mesmos. Ensaios avaliando-se apenas micronúcleos são menos sensíveis, porém são capazes de identificar anomalias de fuso e quebras cromossômicas (VAN der OOST et al., 2003).

Outro tipo de análise utilizada como biomarcador é a estimativa do estresse oxidativo, principalmente a atividade das enzimas ligadas aos mecanismos de defesa antioxidante, como a catalase, a superóxido dismutase (SOD) e a glutationa peroxidase (GPx). As atividades destas enzimas antioxidantes são fundamentais para a defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) e possuem um papel importante na transformação de radicais em moléculas não-reativas (VAN der OOST et al., 2003). Nas práticas de aquicultura intensiva, há um aumento do estresse dos organismos criados e, consequentemente, da sua taxa metabólica e da produção de EROS (SAHIN et al., 2014).

Para utilizar com segurança os métodos que mensuram os biomarcadores, é sempre importante realizar um controle positivo das técnicas em condições controladas de laboratório para avaliar sua sensibilidade, aplicabilidade e intensidade das respostas dos indivíduos testados (VAN der OOST et al., 2003). Neste controle positivo, os organismos podem ser expostos a um composto reconhecidamente tóxico para outras espécies e verificar se seus efeitos podem ser avaliados pelos biomarcadores em

questão. Resultados de ensaios de laboratório e campo normalmente podem ter pequenas diferenças, devido a grande interferência de fatores bióticos e abióticos presentes no campo e não reproduzidos em laboratório (McCARTHY; SHUGART, 1990). Além disso, ensaios de laboratório geram medidas mais padronizadas que podem ser utilizadas como referência para trabalhos de campo.

Um dos compostos utilizados para esse tipo de ensaios de laboratório é a β-naftoflavona (BNF), hidrocarboneto comumente utilizado para avaliar respostas de biotransformação de compostos policiclícos aromáticos (HPA) em peixes (PACHECO; SANTOS, 2002). Esses autores consideram a BNF como um composto não cancerígeno, o que justifica sua ampla utilização, porém assumir que este composto não é mutagênico e cancerígeno é prematuro quando os dados conhecidos são extrapolados para outros grupos que não são mamíferos.

Apesar de a BNF ser normalmente utilizada para indução de atividade da EROD, devido ao seu potencial de indução do citocromo P450 (BELLO et al., 2007), há trabalhos que demonstram aumento de anormalidades nucleares (PACHECO; SANTOS, 2002; GRAVATO; SANTOS, 2002a; GRAVATO; SANTOS, 2002b), de danos ao DNA após 7 dias de exposição (NIGRO et al., 2002), um aumento na atividade da catalase e GPx após exposição (AHMAD et al., 2005) e também um aumento do índice hepato-somático (GRAVATO; SANTOS, 2002b) em diferentes espécies de peixes expostas a este composto.

Assim como na Parte I deste trabalho, a espécie escolhida para este teste com BNF foi o beijupirá (*Rachycentron canadum*) para avaliar como parte dos parâmetros que também foram analisados na Parte I se comportam após exposição, em laboratório, a um composto reconhecidamente tóxico. Não foram encontrados trabalhos com beijupirás expostos a BNF ou a nenhum outro composto xenobiótico na literatura.

II. Hipótese

A exposição ao composto BNF por 7 dias nas concentrações de 2mg/kg e 10mg/kg é capaz de induzir danos genotóxicos e alterar a atividade enzimática de enzimas da defesa antioxidante de beijupirás.

III. Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar a ação da BNF em beijupirás após 7 dias de exposição às seguintes concentrações: 2mg/kg e 10mg/kg. Para isso foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Quantificar a atividade enzimática da SOD, GPx e catalase do fígado de beijupirás submetidos a diferentes concentrações de BNF;
- Avaliar o dano genotóxico de beijupirás expostos à BNF por meio do ensaio cometa;
- Quantificar o número de eritrócitos nucleares anormais (ENA) de beijupirás expostos a diferentes concentrações de BNF;
- Comparar o dano genotóxico e o metabolismo do estresse oxidativo em beijupirás sem exposição a BNF e expostos a baixa e alta concentração do mesmo composto.

IV. Metodologia

Os beijupirás utilizados neste experimento de exposição foram obtidos na Rede Mar Alevinos, localizada em Ilha Bela, em fevereiro de 2016. Eles foram mantidos na Base "Clarimundo de Jesus" do Instituto Oceanográfico da USP, em Ubatuba, em um tanque *indoor* com aeração e trocas diárias de água até adquirirem um peso aproximado de 150g, quando foram retirados do tanque para serem submetidos à exposição à BNF.

A exposição dos peixes foi feita por meio de uma injeção de BNF dissolvida em óleo de milho, já que é um composto lipossolúvel, de forma a atingir as concentrações de 2mg de BNF para 1kg de peixe e 10mg de BNF para 1kg de peixe. Essas concentrações foram escolhidas pra analisar o efeito da exposição de uma concentração relativamente baixa de BNF (2mg/kg) e outra alta (10mg/kg). Pacheco e Santos (1998) usaram uma concentração de 4mg/kg em *Anguilla anguilla* por um período de 3 dias porém não obtiveram nenhum resultado significativo de ENA e Nigro et al. (2002) utilizaram como maiores concentrações 10 e 50mg/kg com a mesma espécie obtendo resultados significativos no ensaio cometa. Por esses motivos, optou-se por aumentar o tempo de exposição em relação ao primeiro trabalho, reduzindo a concentração, e estipulando a mais alta em 10mg/kg.

Para a dissolução da BNF em óleo de milho foi realizado um pré-teste apenas agitando a solução, porém a dissolução da BNF não foi completa, assim optou-se por agitar e sonicar as mesmas logo antes da injeção. A quantidade de solução injetada em cada peixe foi calculada no momento da injeção, conforme o peso do organismo, seguindo a proporção de 1µL de solução para cada 1g de peixe.

Além da injeção das concentrações de BNF, foram feitos dois controles, o primeiro no qual os organismos apenas foram pesados e trocados de tanque, denominado controle água, e no outro foi injetado óleo de milho puro nos peixes seguindo o padrão da injeção da BNF (1µL para cada 1g de peixe), denominado controle óleo.

Para cada condição de exposição, foram injetados 3 peixes e os mesmos foram colocados em tanques de 500L separados. Este procedimento foi realizado 2 vezes (Figura 22). Todos os tanques estavam em um sistema de recirculação de água fechado com filtração da água e taxa de troca de água de 200L/hr.

Foram feitas medidas diárias de salinidade, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e porcentagem de oxigênio na água com oxímetro da YSI® modelo "85 *Oxygen, Conductivity, Temperature & Salinity*" em apenas um dos tanques escolhido aleatoriamente, pois o sistema utilizado era fechado. Foi oferecido ração comercial Matsuda®, a mesma utilizada no experimento de comparação entre os beijupirás criados em tanque-rede e tanque *indoor* (Parte 1), até a saciedade dos peixes.

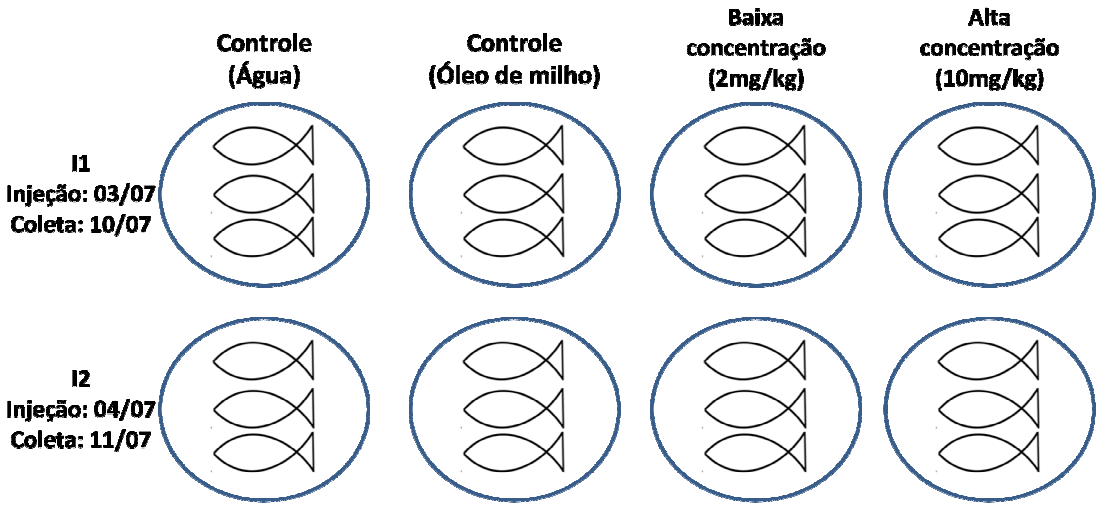

Figura 22: Desenho experimental da exposição de beijupirás à β-naftoflavona (BNF) nos dois experimentos realizados (I1 e I2): controle água, controle óleo de milho e exposição à BNF nas concentrações de 2mg/kg e 10mg/kg.

A amostragem foi realizada após 7 dias de exposição, pois foram encontrados danos genotóxicos a partir desse período em outras espécies de peixes expostas à BNF (NIGRO et al., 2002). Os peixes foram anestesiados no gelo para coleta de sangue utilizado no ensaio cometa e teste de anormalidades nucleares, sendo depois sacrificados com secção da coluna vertebral, de forma que sofressem o mínimo possível. Dados de massa corpórea úmida, comprimento padrão, comprimento total e peso do fígado foram tomados e amostras de fígado foram retiradas e armazenadas em nitrogênio líquido para análises enzimáticas.

A metodologia utilizada para o ensaio cometa, ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares e da atividade enzimática está descrita no Parte 1 deste trabalho nas secções IV.4 (ensaio cometa), IV.5 (ensaio de micronúcleos e demais anormalidades nucleares) e IV.7 (atividade enzimática). Também foram calculados o

índice hepato-somático (HSI) e o fator de condição de Fulton (K) dos indivíduos coletados, conforme descrito na Parte 1 (secção IV.3).

Para realização do ensaio cometa, enzimas da defesa antioxidante e cálculo do HSI foram utilizados 4 organismos de cada condição de exposição provenientes das duas réplicas. Para o teste de micronúcleo e cálculo do K foram utilizados 6 beijupirás de cada condição das duas réplicas, sendo analisadas 2 lâminas de cada indivíduo no caso do micronúcleo.

Para análise estatística, os resultados foram primeiramente testados quanto à normalidade, com o Teste de Kolmogorov-Smirnov. Amostras paramétricas foram submetidas ao teste de variância ANOVA seguido de Teste de Newman-Keuls e amostras não-paramétricas foram submetidas à teste de variância não-paramétrico seguido de Teste de Kruskall-Wallis, considerando-se p menor que 10% como significativo.

V. Resultados

V.1. Biometria e parâmetros físico-químicos dos tanques

Todos os tanques estavam em um mesmo sistema de circulação fechado de água, portanto, as possíveis variações diárias eram sempre as mesmas pra todos eles, minimizando, assim, a influência desses fatores no experimento. Foram feitas medidas diárias de salinidade, temperatura, porcentagem de saturação de oxigênio e concentração de oxigênio dissolvido na água.

Durante todo o período de exposição à BNF, a porcentagem de saturação de oxigênio dissolvido na água foi mantido acima de 85% e as concentrações de oxigênio dissolvido variaram entre 6,05 e 7,13mg/mL (Figura 23), de forma que os tanques estivessem bastante aerados e não houvesse falta de oxigênio, já que os peixes já estavam sendo expostos a um composto tóxico.

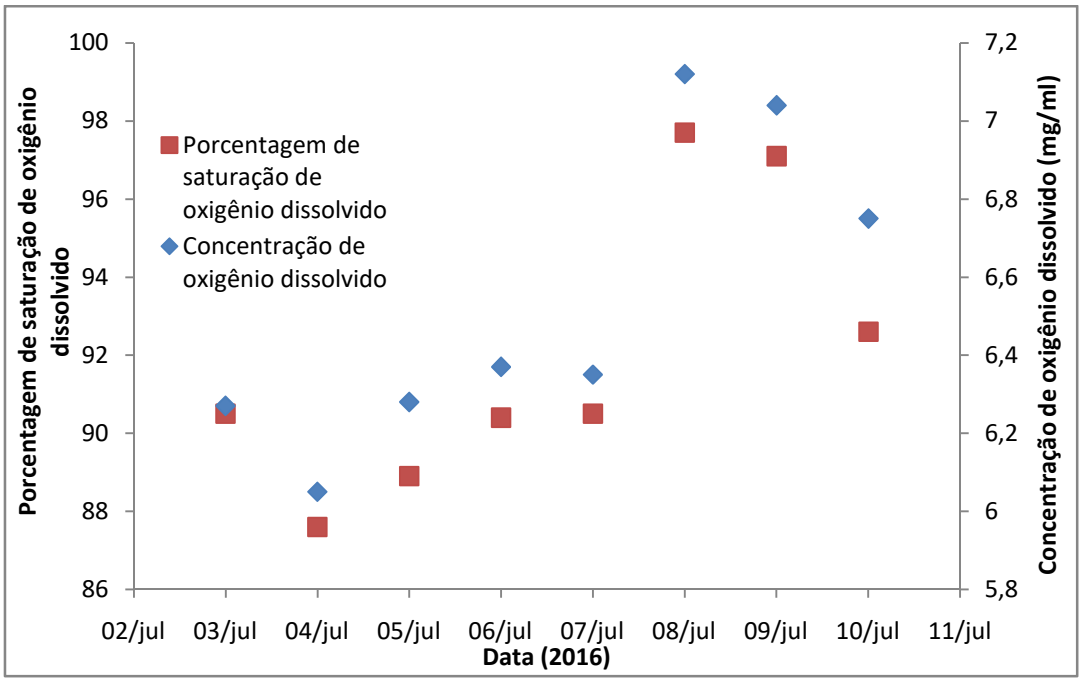

Figura 23: Porcentagem e concentração (mg/mL) de oxigênio dissolvido no sistema de tanques de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF).

A salinidade dos tanques foi mantida praticamente constante, durante todo o período, em valor médio de 30,1, com variação total de 0,6. A temperatura média foi de 23,9°C, com valor máximo de 25,6°C e mínimo de 22,2°C (Figura 24).

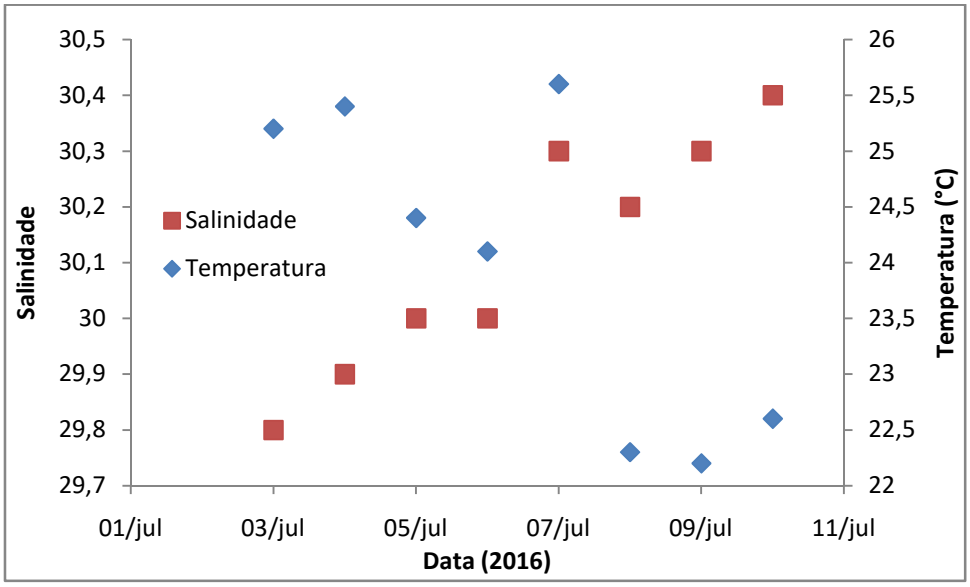

Figura 24: Salinidade e temperatura do sistema de tanques de manutenção dos beijupirás durante o período de exposição à β-naftoflavona (BNF).

O peso médio inicial dos beijupirás antes da injeção era de 150,441 ± 5,23g e após a injeção o peso foi de 125,11 ± 4,07g. Essa diminuição no peso pode ser explicada pela redução da ingestão de alimento pelos organismos, pois mesmo os peixes das condições controle demoraram aproximadamente 3 dias para voltarem a se alimentar após a injeção. O peso úmido final, comprimento padrão e comprimento total dos beijupirás de cada condição de exposição não tiveram diferenças significativas e nem uma variação grande de valores (Figura 25).

O fator de condição de Fulton (K) estabelece uma relação entre massa e comprimento que permite identificar o grau de desenvolvimento dos peixes, supondo que os mesmos possuem um crescimento isométrico. Não houve diferença significativa entre as condições de exposição testada e seus valores médios foram bem próximos: controle água 1,04 ± 0,03, controle óleo 1,09 ± 0,03, BNF 2mg/kg 1,05 ± 0,02 e BNF 10mg/kg 1,07 ± 0,05 (Figura 26).

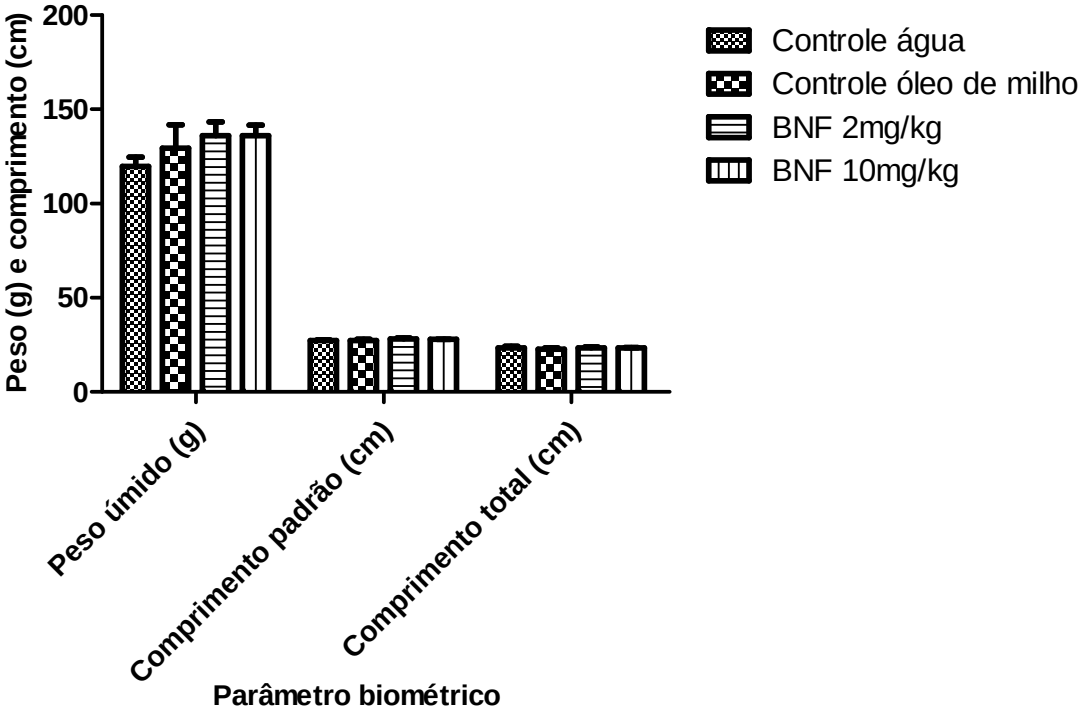

Figura 25: Peso úmido, comprimento total e comprimento padrão de beijupirás após o período de exposição à β-naftoflavona (BNF). As barras de erro representam o erro padrão das amostras.

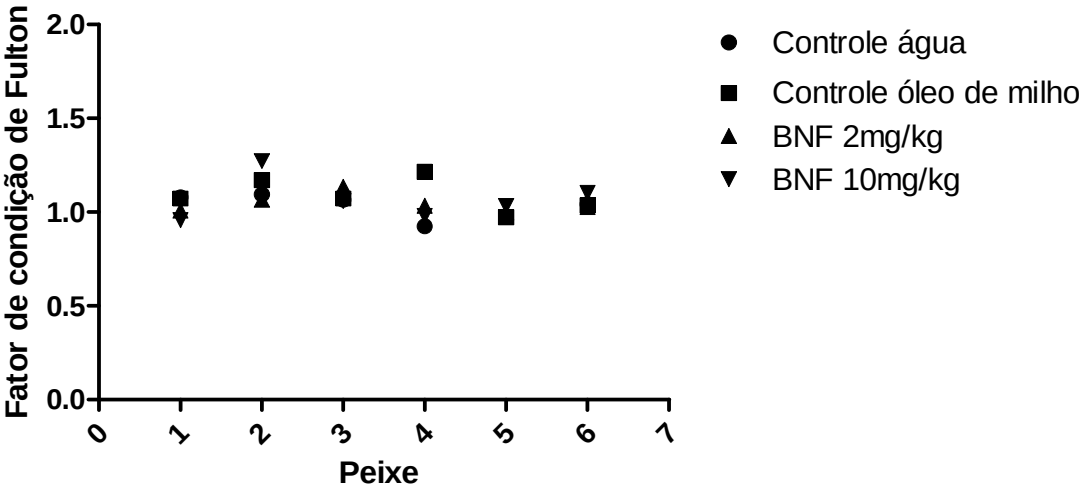

Figura 26: Fator de condição de Fulton de beijupirás expostos à β-naftoflavona **(**BNF).

O índice hepato-somático (HSI) é uma medida utilizada para quantificar a energia armazenada em forma de glicogênio do organismo, já que representa o

percentual de massa do fígado em relação à massa corpórea e este órgão é o maior reservatório de glicogênio dos animais (CYRINO et al., 2000; NAVARRO et al., 2006). Assim como K, os valores do HSI foram similares: controle água 5,58 ± 0,36, controle óleo 5,69 ± 0,49, BNF 2mg/kg 5,30 ± 0,44 e BNF 10mg/kg 5,47 ± 0,26 (Figura 27). Também não houve diferença significativa entre as diferentes condições de exposição.

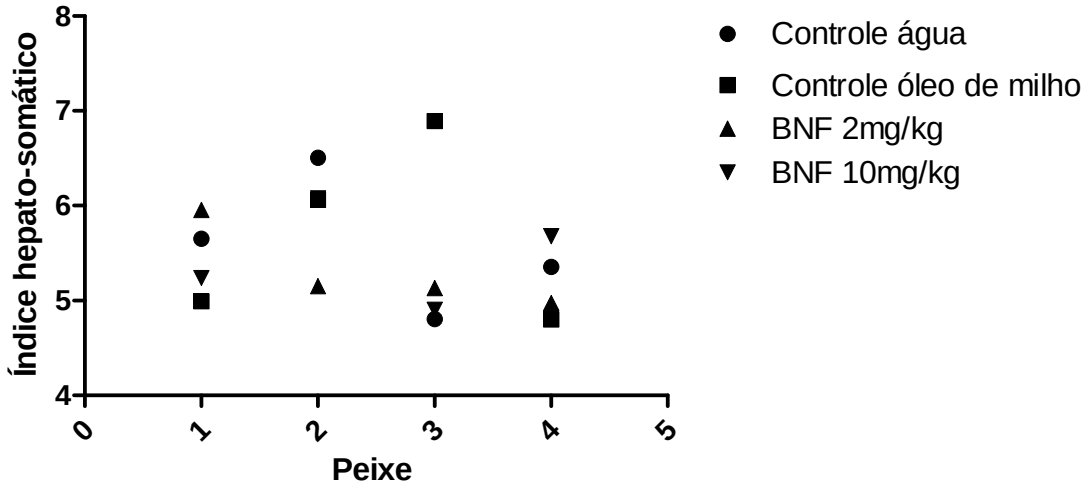

Figura 27: Índice hepato-somático de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF).

V.2. Ensaio cometa

No ensaio cometa, tanto na análise visual como na computadorizada de imagem, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao se compararem os dados de animais expostos às diferentes condições (Figura 28). Os parâmetros escolhidos na análise computadorizada de imagem foram o momento de cauda e a porcentagem de DNA na cauda por serem os mais utilizados na literatura.

Todos os parâmetros analisados, índice de dano (análise visual), momento de cauda e porcentagem de DNA na cauda (ambos da análise computadorizada de imagem), apresentaram valores relativamente baixos de danos.

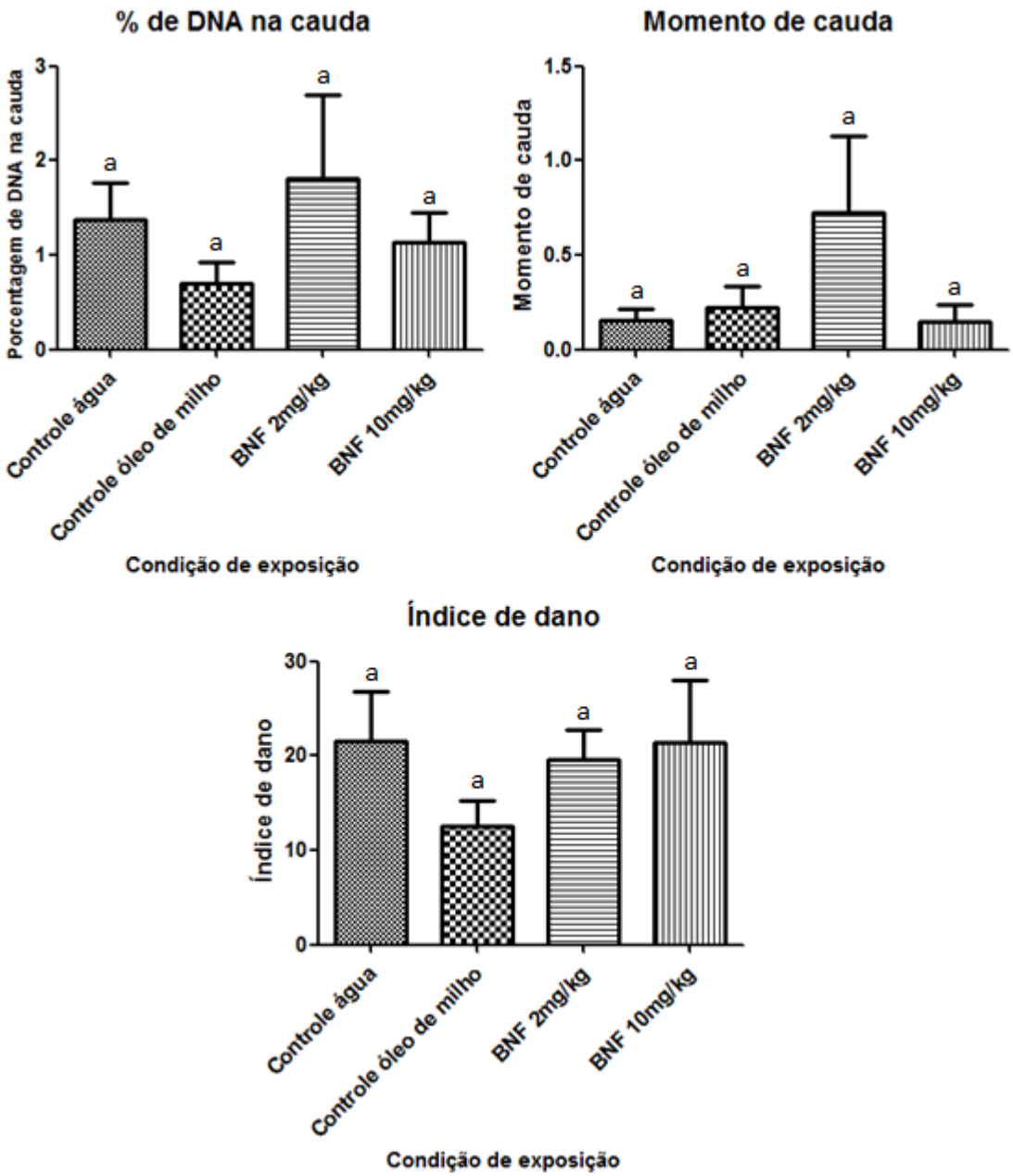

Figura 28: Ensaio cometa de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). Os dois primeiros gráficos são resultantes da análise computadorizada de imagem e o terceiro gráfico apresenta o resultado da análise visual. As barras de erro representam o erro padrão das amostras e as letras amostras estatisticamente diferentes, considerando-se *p* menor que 0,10.

V.3. Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares

Foi observado uma tendência de maior frequência de núcleos reniformes, lobados e ENA em peixes expostos a BNF em relação aos dois controles (Figura 29); essa diferença se mostrou significativa em núcleos reniforme e no ENA nas duas condições de exposição em relação aos controles e em núcleos lobados também nas duas condições de exposição, porém, apenas em relação ao controle água (Tabela 4). A

frequência de micronúcleos e núcleos segmentados foi muito pequena em todas as condições de exposição (Figura 29).

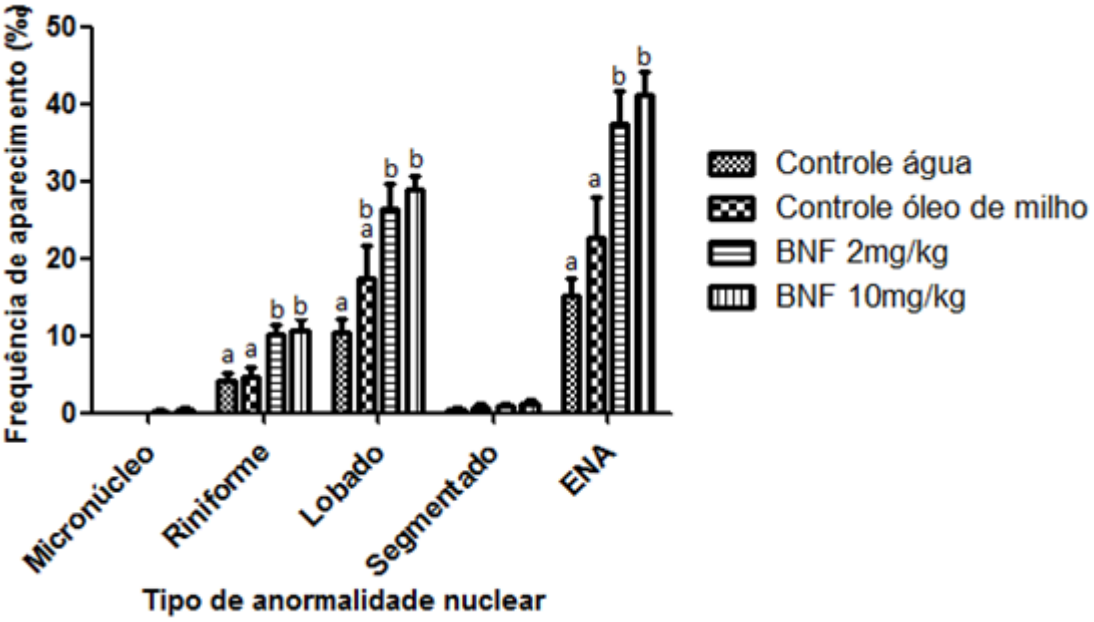

Figura 29: Ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares em beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). As barras de erro representam o erro padrão das amostras e as letras amostras estatisticamente diferentes, considerando-se *p* menor que 0,10.

Tabela 4: Análise estatística do ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). Os valores destacados são estatisticamente significativos, considerando-se *p* menor que 0,10.

Reniforme				
	Água	Óleo	BNF [2]	BNF [10]
Água	-	0,98	**0,008**	**0,01**
Óleo	0,98	-	**0,02**	**0,02**
BNF [2]	**0,008**	**0,02**	-	0,83
BNF [10]	**0,01**	**0,02**	0,83	-
Lobado				
	Água	Óleo	BNF [2]	BNF [10]
Água	-	0,37	**0,06**	**0,05**
Óleo	0,37	-	0,13	0,15
BNF [2]	**0,06**	0,13	-	0,69
BNF [10]	**0,05**	0,15	0,69	-
ENA				
	Água	Óleo	BNF [2]	BNF [10]
Água	-	0,46	**0,03**	**0,02**
Óleo	0,46	-	**0,06**	**0,06**
BNF [2]	**0,03**	**0,06**	-	0,65
BNF [10]	**0,02**	**0,06**	0,65	-

V.4. Enzimas da defesa antioxidante

A atividade da catalase apresentou uma tendência de maiores valores nos beijupirás das condições de controle em relação às exposições à BNF (Figura 30). Esta tendência se mostrou significativa para a concentração de 10mg/kg de BNF em relação ao controle óleo (p = 0,044).

A SOD apresentou valores de atividade similares entre indivíduos do controle água e da menor concentração de BNF e valores mais baixos de atividade para beijupirás do controle óleo e da exposição mais alta de BNF (Figura 30), não havendo diferenças significativas entre nenhuma das condições (p = 0,41). Dentre as enzimas analisadas, foram os resultados que apresentaram um maior erro padrão nas condições.

A GPx apresentou valores de atividade similares em peixes de todas as condições de exposição, não apresentando grandes variações de resultados (Figura 30). Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as condições.

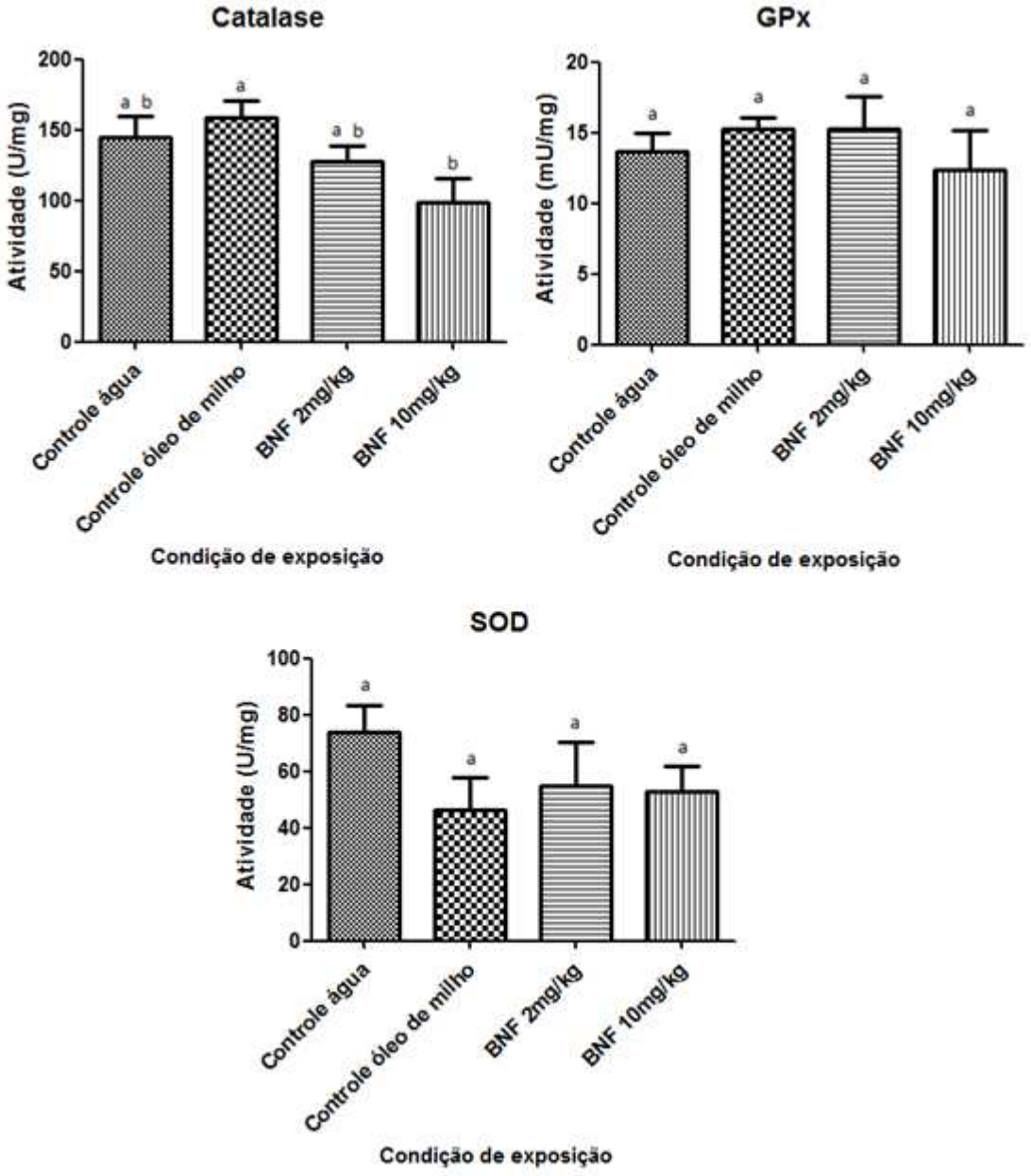

Figura 30: Atividade enzimática das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx) no fígado de beijupirás expostos à β-naftoflavona (BNF). As barras de erro representam o erro padrão das amostras e as letras diferentes amostras estatisticamente diferentes, considerando-se *p* menor que 0,10.

VI. Discussão

Apesar de os resultados poderem apresentar divergências em relação aos obtidos diretamente no campo, experimentos com exposições conhecidas em condições controladas de laboratório são importantes para entender os mecanismos de reação de cada espécie a situações de estresse. As diferenças normalmente encontradas entre experimentos de laboratório e de campo se referem às características próprias do ambiente e suas variações.

Em experimentos de laboratório, os parâmetros físico-químicos da água, como salinidade, temperatura e concentração de oxigênio, devem ser controlados, para que haja a menor variabilidade possível de forma a não afetar os resultados do experimento. As variações na temperatura e na concentração de oxigênio foram pequenas durante o período de exposição dos peixes deste trabalho, sendo que o percentual de saturação de oxigênio na água foi sempre mantido acima de 85%, o que está dentro dos valores ideais.

A BNF é o hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) sintético normalmente utilizado em estudos para avaliação de biotransformação de peixes expostos a HPAs, pois sua ação é similar a destes compostos, porém possui a vantagem de não ser considerado cancerígeno na maioria dos casos (PACHECO; SANTOS, 2002). Estudos com diversas espécies de peixes foram encontrados na literatura utilizando a exposição a esse composto seguida de ensaio cometa, quantificação de micronúcleos e demais anormalidades nucleares e medidas de atividade de enzimas relacionadas à defesa antioxidante (PACHECO; SANTOS, 1998; PACHECO; SANTOS, 2002; NIGRO et al., 2002; AHMAD et al., 2005; GRAVATO; SANTOS, 2002a; GRAVATO; SANTOS, 2002b).

Tanto o fator de condição de Fulton (K), como o índice hepato-somático (HSI), não apresentaram diferenças significativas em relação às diferentes exposições à BNF realizadas. Ambas as medidas são indicadores mais simples do estado do organismo, sendo K relacionado a mudanças de peso e comprimento do indivíduo, que consequentemente afeta suas condições fisiológicas (SUTTON et al., 2000), e HSI está relacionado a uma maior metabolização de compostos tóxicos no fígado (VAN DYK et al., 2012). Além de serem menos elaborados, esses biomarcadores também podem ser

afetados por fatores não relacionados com o composto tóxico, como estado nutricional, doenças e variabilidade sazonal de fatores abióticos (VAN der OOST et al., 2003).

Peixes considerados saudáveis e com um bom desenvolvimento possuem um valor de K maior que 1 (SARAIVA et al., 2015). Tanto os peixes das condições de controle como os expostos à BNF apresentaram, em média, valores maiores que 1, porém, quando analisados individualmente, em todos os grupos havia beijupirás apresentando K menor que 1. Como os indivíduos com K menor que 1 não ocorreram exclusivamente nos grupos expostos à BNF, acredita-se que este fato esteja relacionado a alguma outra condição, principalmente a dieta (já que eles eram alimentados com ração comercial) ou algum fator abiótico não controlado durante o período experimental.

O HSI médio encontrado neste trabalho para todas as condições de exposição (5,58 ± 0,36 e 5,69 ± 0,49 para os controles água e óleo, 5,30 ± 0,44 para a concentração mais baixa de BNF e 5,47 ± 0,26 para a concentração mais alta de BNF) é alto se comparado aos valores da literatura encontrados para beijupirás. Em Zhou et al. (2012), valores de HSI variaram de 2,14 ± 0,12 a 2,73 ± 0,12 conforme a suplementação de vitamina C utilizada na dieta; no trabalho de Wang et al. (2016), a variação do mesmo parâmetro foi de 1,12 ± 0,04 a 1,64 ± 0,11 conforme a concentração da suplementação do aminoácido metionina; em Zhou et al. (2011), o HSI variou entre 3,02 ± 0,14 e 3,58 ± 0,04 conforme a porcentagem de proteína de peixe substituída por proteína de ave; em Trushenski et al. (2012), este parâmetro variou de 1,46 a 2,74 conforme a porcentagem de substituição de proteína de peixe por soja e suplementação alimentar com os ácidos graxos eicosapentaenóico e docosa-hexaenóico (ambos do tipo ômega-3). Os resultados de HSI encontrados neste trabalho são próximos ao que Wang et al. (2005) encontraram alimentando beijupirás com uma dieta composta com 25% de gordura (HSI = 5,02 ± 0,32). Esta comparação mostra que o HSI dos beijupirás não conseguiu modular em relação à BNF, provavelmente por já se encontrar alto, devido a outros fatores, como, por exemplo uma dieta rica em gordura, conforme constatado no trabalho de Wang et al. (2005).

O ensaio cometa é capaz de detectar quebras simples e duplas na fita do DNA, sendo um dano primário e reparável (SHUGART et al., 1992). Em enguias (*Anguilla anguilla*) expostas à BNF 10mg/kg, também por 7 dias, foi observado um maior dano

genotóxico em relação às condições controles do experimento (NIGRO et al., 2002), porém o mesmo resultado não foi observado em beijupirás, não havendo diferenças significativas em nenhuma das análises realizadas do ensaio cometa (índice de dano, porcentagem de DNA na cauda e momento de cauda).

Outro tipo de dano que ocorre ao DNA são alterações permanentes na molécula que podem gerar mutações, sendo que estas modificações podem ser detectadas pelo ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares (VAN der OOST et al., 2003). Ensaios com apenas micronúcleos são menos sensíveis, apesar de serem capazes de detectar anomalias de fuso e quebras cromossômicas (VAN der OOST et al., 2003). Porém, como não há consenso para explicar o mecanismo de formação das anormalidades nucleares e ele ainda não é totalmente conhecido, sugere-se a utilização das demais anormalidades nucleares em conjunto com os micronúcleos (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2001; STRUNJAK-PEROVIC et al., 2009). A experiência do nosso laboratório indica que o parâmetro de maior importância nestes testes é o ENA, que consiste no somatório de todos os tipos de anormalidades e micronúcleos encontrados.

Houve diferença significativa no ENA e também no tipo de anormalidade lobado nas duas concentrações de exposição de BNF em relação aos dois controles utilizados, indicando que a BNF causou um dano genotóxico permanente nos eritrócitos dos beijupirás. Este resultado condiz com o já encontrado para as espécies *Anguilla anguilla* (PACHECO; SANTOS, 2002) e *Dicentrarchus labrax* (GRAVATO; SANTOS, 2002b), apesar de essas espécies terem sido expostas à BNF dissolvida na água.

Pacheco e Santos (1998) realizaram um experimento com injeção peritoneal de BNF a 4mg/kg por um período de exposição de 3 dias com *A. anguilla*, porém não foi detectado um aumento significativo de ENA sendo sugerido um maior tempo de exposição. Apesar de o beijupirá ser uma espécie diferente, com um maior tempo de exposição (7 dias) foi detectado um aumento significativo na frequência de anormalidades nucleares com uma concentração mais alta (10mg/kg) e outra mais baixa (2mg/kg) em relação a utilizada por estes autores.

As técnicas de ensaio cometa e de anormalidades nucleares possuem resultados complementares e é recomendável que sejam utilizadas em conjunto (MARTINS; COSTA, 2015). Comparando-se os resultados do ensaio cometa e de ENA, pode-se

inferir que a BNF provavelmente também causou quebras ao DNA que poderiam ter sido detectadas pelo ensaio cometa, já que foram detectadas alterações na estrutura do DNA pelo ensaio de micronúcleo e demais anormalidades. Porém ao longo dos 7 dias de exposição é possível que tenha havido reparo das quebras na fita do DNA (SHUGART et al., 1992), impossibilitando a percepção de diferenças significativas no ensaio cometa. Por sua vez, as anormalidades nucleares que ocorreram permaneceram nas células ainda presentes na circulação sanguínea, já que essas são alterações permanentes (VAN der OOST et al., 2003). Esse resultado indica, mais uma vez, que os beijupirás são sensíveis à fatores genotóxicos, mas que possuem mecanismos eficientes de reparo, conforme hipótese levantada na Parte I deste trabalho.

Enzimas são consideradas bons indicadores do estresse oxidativo, como a SOD, GPx e catalase (JIN et al., 2011). Tanto a SOD, responsável pela transformação do radical superóxido em H_2O_2, como a GPx, responsável pela degradação de peróxidos, apresentaram valores de atividade similares em todas as condições, sem diferenças significativas. Já a catalase, responsável pela degradação do H_2O_2, apresentou valores significativamente menores de atividade em beijupirás expostos à BNF na concentração de 10mg/kg em relação aos peixes dos dois controles realizados.

Apesar de enguias (*Anguilla anguilla*) expostas à BNF diluída na água a concentração de 2,7µM por 48 horas terem aumentado significativamente a atividade da catalase e da GPx nas brânquias (AHMAD et al., 2005), o mesmo padrão de resposta não foi observado no fígado dos beijupirás deste trabalho, já que a atividade da GPx se manteve a mesma e a da catalase reduziu. Não há uma regra generalizada de que o aumento da concentração dos xenobióticos ativa a síntese de enzimas das defesas antioxidantes em peixes (QU et al., 2014). As respostas das enzimas ligadas à defesa antioxidante à contaminantes ainda não foi totalmente esclarecida nos peixes, ocorrendo em vários trabalhos respostas até mesmo opostas àquelas esperadas (VAN der OOST et al., 2003). Na revisão realizada por Van der Oost et al. (2003), na maioria dos trabalhos com peixes expostos em laboratório a poluentes, principalmente HPAs e PCBs, a SOD e GPx não apresentaram respostas significativamente diferentes em relação às diferentes exposições e às condições controle. No caso da catalase, apesar de a maioria dos trabalhos também não apresentar uma diferença significativa nos resultados, há mais casos nos quais ocorreu uma inibição da atividade após a exposição, como ocorreu nos beijupirás, do que uma indução da mesma.

Em diferentes espécies de peixes expostos a poluentes foram realizados relativamente poucos estudos comparando as respostas em níveis moleculares e bioquímicos, e os mesmos normalmente apresentam resultados inconsistentes (BENEDETTI et al., 2015). Na revisão realizada por Benedetti et al. (2015), os trabalhos compilados não apresentavam necessariamente uma relação entre a atividade mensurada das enzimas catalase, GPx e SOD e o nível de transcrição de mRNA (RNA mensageiro) relacionado a mesma. Este fato ressalta ainda mais a necessidade de mais estudos para entender as respostas destas enzimas não só em beijupirás, mas em peixes de modo geral.

Como não houve diferenças significativas entre o controle água e o controle óleo em nenhuma das técnicas utilizadas, pode-se concluir que o óleo de milho é um bom solvente para a BNF por não causar alterações no estado fisiológico do organismo.

Dentre todas as técnicas realizadas, o ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares foi o que apresentou resultados mais consistentes, sendo assim o mais indicado para um monitoramento desta espécie. Como esta técnica e o ensaio cometa possuem resultados complementares, é interessante que ambas sejam empregadas, tendo em vista que não é necessário sacrificar os organismos. Apesar de serem indicadores mais simples e pouco elaborados, o HSI e o K fornecem uma visão mais ampla do estado do animal e por serem de simples coleta de dados também é aconselhável que sejam realizados. Com relação às enzimas, são necessários mais estudos para entender seu funcionamento em peixes, antes de serem utilizadas como biomarcadores. Apesar de que pouco se comenta na literatura sobre a falta de dados sobre o funcionamento de enzimas em peixes, é evidente que estudos mais aprofundados são necessários para compreender as diferenças de suas atividades em relação à de mamíferos. Este foi um teste preliminar, portanto é preciso realizar novos experimentos com beijupirás expostos a BNF com uma maior variedade de concentrações e tempos de exposição.

Para este teste com a BNF não foram empregadas todas as técnicas utilizadas na primeira parte deste trabalho. Foram selecionadas as técnicas ligadas à genotoxicidade e às enzimas da defesa antioxidante, pois as primeiras apresentaram bons resultados na primeira parte do trabalho e as enzimas, por serem bastante controversas em peixes,

ainda precisam ser melhor estudadas à procura de padrões de respostas para as diferentes espécies.

VII. Conclusão

Após 7 dias de exposição, o ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares detectou uma maior frequência de anormalidades nos eritrócitos dos peixes injetados com BNF, nas duas concentrações utilizadas, em relação aos controles. Como esta técnica e o ensaio cometa são complementares, acredita-se que repetindo-se o teste com uma maior variação de tempos de exposição, principalmente com exposições inferiores a 7 dias, as duas técnicas possam apresentar resultados significativos, já que o ensaio cometa detecta danos ao DNA reparáveis e o ENA danos permanentes.

O HSI e o K são indicadores mais simples, porém de fácil realização e de quase nenhum custo, podendo dar uma indicação do estado dos organismos, principalmente quando utilizados em conjunto.

Apesar de a BNF ter causado uma inibição da atividade da catalase na maior concentração do composto e não ter ocorrido variação na atividade da GPx e da SOD, são necessários mais estudos sobre os mecanismos de inibição e indução destas enzimas em beijupirás.

Este trabalho é preliminar e, portanto, para se estabelecer um controle positivo de laboratório para esta espécie é necessário realizar testes mais completos, com exposições a diferentes concentrações de BNF em uma maior variação de tempo.

Considerações Finais

A exposição de beijupirás à BNF foi realizada com o objetivo de estabelecer um controle de laboratório das técnicas utilizadas para avaliar o estado fisiológico desta espécie em dois sistemas de criação diferentes; uma comparação entre os resultados dos experimentos está apresentada na Tabela 5. Para um controle de laboratório ideal seria necessário expor os peixes a uma maior variedade de concentrações de BNF por diferentes períodos de tempo. Como esse procedimento era inviável devido a problemas logísticos, optou-se por expor os peixes a uma concentração baixa e outra alta de BNF por um intervalo de 7 dias, como uma forma exploratória do tema.

Os parâmetros morfométricos (HSI e K) se mostraram menos sensíveis à exposição à BNF, porém já haviam apresentado resultados significativos no experimento de criação. É importante destacar que os valores de HSI encontrados no experimento com BNF foram maiores que os do experimento de criação e o contrário aconteceu com o K. Os valores altos de HSI dos beijupirás do experimento com a BNF em relação aos encontrados na literatura e valores de K menores do que 1, indicam que os peixes, mesmo os do controle, não estavam em perfeito estado fisiológico, o que pode ter afetado a modulação dos parâmetros estudados em relação à BNF. O manuseio, a mudança de ambiente, a possível deficiência alimentar devido à falta de apetite dos peixes nos primeiros dias da transferência, além de outras desconhecidas, podem estar entre as causas que explicariam esses valores diferentes do esperado. Em experimentos futuros, para o estabelecimento de um padrão de laboratório com beijupirás, esses fatores devem ser levados em consideração.

No ensaio cometa não foram encontrados resultados significativos nos indivíduos expostos a diferentes concentrações de BNF, diferentemente do encontrado no experimento de criação. Além disso, os valores de momento de cauda, porcentagem de DNA na cauda e ID dos beijupirás de todas as condições do teste com BNF são baixos e similares aos obtidos para os peixes do tanque-rede, que apresentaram um menor dano em relação ao tanque *indoor*. Este fato fortalece ainda mais a hipótese de que as quebras de DNA que a BNF pode ter causado tiveram tempo de serem reparadas ao longo dos 7 dias de exposição. Para comprovar essa hipótese, ressalta-se a importância de se repetir o experimento com tempos menores de exposição.

O ensaio de micronúcleo e demais anormalidades nucleares detectou diferenças significativas tanto nos testes com a BNF quanto no experimento de criação. A frequência de anormalidades nos tanques foi semelhante a das condições controles do experimento com BNF, sendo que os beijupirás expostos às duas concentrações de BNF apresentam uma frequência de anormalidades comparativamente maior. Esta técnica se mostrou sensível e de rápida execução sendo um bom biomarcador para monitorar organismos criados, havendo ainda a vantagem de não ser necessário sacrificar o indivíduo para amostragem.

Com relação às enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, apenas a catalase, em beijupirás expostos à concentração mais alta de BNF, apresentou uma indução significativa. Com a presença de um composto tóxico ou de condições intensivas de criação era esperado que houvesse uma indução na atividade destas enzimas para elas diminuírem o excesso de radicais livres no interior do organismo, porém este resultado não foi encontrado em beijupirás expostos à BNF e nem nos dois sistemas de criação diferentes. Como o processo de indução e inibição da atividade da SOD, GPx e catalase ainda não é bem conhecido em peixes são necessários mais estudos para sua melhor compreensão. Apesar de que o assunto é pouco discutido na literatura, acreditamos que ainda são necessários muitos estudos para compreender a ação de enzimas em peixes, pois essas parecem agir de forma muito diferente da que é conhecida para mamíferos. O termo peixe não tem caráter taxonômico, pois engloba organismos muito diversos, o que certamente se reflete na sua fisiologia.

Experimentos de laboratório e amostragens de campo não apresentam necessariamente o mesmo resultado, devido às variações ambientais que não são possíveis de controlar e nem de reproduzir exatamente em laboratório. A importância dos controles de laboratório está no fato de possibilitar uma maior compreensão dos mecanismos de respostas dos organismos. Com beijupirás, ainda é necessário realizar um controle de laboratório mais consistente com uma maior variedade de concentrações e tempos de exposição à BNF.

Tabela 5: Comparação entre os resultados obtidos pelos biomarcadores utilizados no experimento de cultivo de beijupirás em diferentes tanques e injeção de β-naftoflavona (BNF) nesta espécie.

Técnica	**Exp. Tanques**	**Exp. BNF**	**Considerações**
K	Significativo; ↓ tanque *indoor*; ↑ 1.	Não significativo; ↓ 1.	Simples; Ideia geral.
HSI	Significativo; ↑ tanque *indoor*.	Não significativo; Valores muito altos.	Simples; Ideia geral.
Ensaio cometa	Significativo; ↑ tanque *indoor*.	Não significativo; Valores muito baixos.	Dano genotóxico tem resposta rápida.
Anormalidades nucleares	Significativo; ↑ tanque *indoor*.	Significativo; ↑ 2 e 10mg/kg.	ENA tanques ≈ controle BNF; Bom biomarcador.
Enzimas	Não significativo.	Catalase ↓ 10mg/kg	Padrão de resposta pouco conhecido; Mais estudos

Referências bibliográficas

AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β-naphthoflavone pre-exposure. Chemosphere, v. 61, n. 2, p. 267–275, 2005.

AL-SABIT, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. Res., v. 343, p. 121-135, 1995.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. Mutat. Res., v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil* sp.) and sea catfish (*Netuma* sp.) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. Mutat. Res., v. 560, n.1, p. 57-67, 2004.

ARECHAVALA-LOPEZ, P.; UGLEM, I.; FERNANDEZ-JOVER, D.; BAYLE-SEMPERE, J. T.; SANCHEZ-JEREZ, P. Post-escape dispersion of farmed seabream (*Sparus aurata* L.) and recaptures by local fisheries in the Western Mediterranean Sea. Fish. Res., v. 121-122, p. 126-135, 2012.

ARENDT, M. D.; OLNEY, J. E.; LUCY, J. A. Stomach content analysis of cobia, *Rachycentron canadum*, from lower Chesapeake Bay. Fish Bull., v. 99, p. 665-670, 2001.

ARNOLD, C. R.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Spawning of cobia (*Rachycentron canadum*) in captivity. J. World Aquac. Soc., v. 33, p. 205-208, 2002.

ATWOOD, H. L.; YOUNG, S. P.; TOMASSO, J. R.; SMITH, T. I. J. Resistance of cobia, *Rachycentron canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high environmental nitrite concentrations. J. Appl. Aquacul., v. 15, p. 191-195, 2004.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 49, p. 221–225, 2001.

BASRUR, T. V.; LONGLAND, R.; WILKINSON, R. J. Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem., v. 36, p. 445–450, 2010.

BELLO, D. D.; VACCARO, E.; LONGO, V. REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; GERVASI, P. G.; PRETTI, C. Presence and inducibility by β-naphthoflavone of CYP1A1, CYP1B1 and phase II enzymes in *Trematomus bernacchii*, an Antarctic fish. Aquat. Toxicol., v. 84, n. 1, p. 19-26, 2007.

BENEDETTI, M.; GIULIANI, M. E.; REGOLI, F. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 1340, p. 8-19, 2015.

BENETTI, D. D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J. A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUN, M. R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. Aquaculture, v. 302, p. 195–201, 2010.

BENETTI, D. D.; ORHUN, R.; SARDENBERG, B.; O'HANLON, B.; WELCH, A.; HOENIG, R.; ZINK, I.; RIVERA, J. A.; DENLINGER, B.; BACOAT, D.; PALMER, K.; CAVALIN, F. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus). Aquacult. Res., v. 39, p. 701-711, 2008.

BEVERIDGE, M. **Cage aquaculture.** 3rd Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 368p.

BEZERRA, T. R. Q.; DOMINGUES, E. C.; MAIA FILHO, L. F. A.; ROMBENSO, A. N.; HAMILTON, S.; CAVALI, R. O. Economic analysis of cobia (*Rachycentron canadum*) cage culture in large- and small-scale production systems in Brazil. Aquacult. Int., v. 24, p. 609–622, 2016.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Rev. Nutr., v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIHARI, N.; FANFAĐEL, M. Interspecies differences in DNA single strand breaks caused by benzo[*a*]pyrene and marine environment. Mutat. Res., v. 552, p. 209-217, 2004.

BOOTH, M. A.; TUCKER, B. J.; ALLAN, G. L.; FIELDER, D. S. Effect of feeding regime and fish size on weight gain, feed intake and gastric evacuation in juvenile Australian snapper *Pagrus auratus*. Aquaculture, v. 282, n. 1-4, p. 104-110, 2008.

BUSACKER, G. P.; ADELMAN, I. R.; GOOLISH, E. M. Growth. *In*: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Eds.). **Methods for fish biology.** Bethesda, USA: American Fisheries Society, 1990. p. 363-382.

CAMPOS, D. Y. F. Análise das respostas citogenotóxicas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto a água do mar diante da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", Ilha Rei George, Antártica. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 2007. 112 p.

CARDOSO, C. M. Expressão histoimunológica de proteínas de reparo celular e comportamento de juvenis *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) durante aumento gradual de temperatura. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 2013. 94 p.

CARDOSO, C. M.; SARTORIO, P. V.; MACHADO, A. S. D.; VIGNARDI, C. P.; ROJAS, D. C. G. C.; PASSOS, M. J. A. C. R.; ROCHA, A. J. S.; PHAN, V. N.; GOMES, V. Hsp70 and p53 expressions and behavior of juvenile pompano, *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae), at controlled temperature increase. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., v. 470, p. 34-42, 2015.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish. Aquat. Sci., v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl., v. 6, p. 64-69, 2009.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. Environ. Mol. Mutagen., v. 46, p. 64-70, 2005.

CHENG, C. H.; YANG, F. F.; LING, R. Z.; LIAO, R. Z.; MIAO, Y. T.; YE, C. X.; WANG, A. L. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). Aquat. Toxicol., v. 164, p. 61–71, 2015.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol., v. 25, p. 249-261, 2004.

COSTA-BOMFIM, C. N.; PESSOA, W. V. N.; OLIVEIRA, R. L. M.; FARIAS, J. L.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S.; CAVELLI, R. O. The effect of feeding frequency on growth performance of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). J. Appl. Ichthyol., v. 30, p. 135–139, 2014.

COWEY, C. B.; WOODWARD, B. The dietary requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for folic acid. J. Nutr., v. 123, p. 1594–1600, 1993.

CRAIG, S. R.; SCHWARZ, M. H.; McLEAN, E. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. Aquaculture, v. 261, p. 384-391, 2006.

CYRINO, J. E. P.; PÓRTZ, L.; MARTINO, R. C. I. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus salmoides*. Sci. agric., v. 57, p. 609-616, 2000.

DRAGUN, Z.; MARIJIC, V. F.; KAPETANOVIC, D.; VALIC, D.; SMRZLIC, I. V.; KRASNICI, N.; STRIZAK, Z.; KURTOVIC, B.; TESKEREDZIC, E.; RASPOR, B. Assessment of general condition of fish inhabiting a moderately contaminated aquatic environment. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., v. 20 (7), p. 4954–4968, 2013.

FAO, 2011-2016. Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series. *In*: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 21 July 2016. [Cited 4 October 2016].

FAO, 2012. Fishery and aquaculture country profiles: the Federative Republic of Brazil. <http://www.fao.org/fishery/facp/BRA/en#CountrySector-Statistics> Acesso em: 16/03/2015

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2016: Contributing to food security and nutrition for all.** Rome, Italy, 2016. 200 p.

FAULK, C. K.; HOLT, G. J. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity. Aquaculture, v. 254, p. 275-283, 2006.

FRANKS, J. S.; OGLE, J. T.; LOB, J. M.; NICHOLSON, L. C.; BARNES, D. N.; LARSEN, K. M. Spontaneous spawning of cobia, *Rachycentron canadurn*, induced by human chorionic gonadotropin (HCG), with comments on fertilization, hatching, and larval development. Proc. Gulf Caribb. Fish Inst., v. 52, p. 598-609, 2001.

GAUMET, F.; BABET, M. C.; BETTES, A.; LE TOULLEC, A.; SCHIRES, G.; BOSC, P. Advances in cobia, *Rachycentron canadum*, research in La Reunion Island (France):

problems and perspectives. *In*: LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. (Eds.). **Cobia Aquaculture: research, development and commercial production.** Taiwan: Asian Fisheries Society, 2007. p. 115-129.

GOLDSTEIN, B.; GIBSON, J.; HENDERSON, R.; HOBBIE, J. LANDRIGAN, P.; MATTISON, D.; PERERA, F.; PFITZER, E.; SILBERGELD, E.; WOGAN, G. Biological markers in environmental health research. Environ. Health Perspect., v. 74, p. 3-9, 1987.

GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. C. A.; CAMPOS, D. Y. F.; USSAMI, K. A.; HASUE, F. M.; PHAN, V. N. DNA strand breaks in caged Antarctic coastal fish (*Trematomus newnesi*), following exposure to the waters in front of the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz". Pesq. Antárt. Bras., v. 5, p. 61-70, 2012.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagênese ambiental.** Canoas (RS): Editora Ulbra, 2003. p. 247-279.

GOOD, C.; DAVIDSON, J.; EARLEY, R. L.; LEE, E.; SUMMERFELT, S. The impact of water exchange rate and treatment processes on water-borne hormones in recirculation aquaculture systems containing sexually maturing Atlantic Salmon *Salmo salar*. J. Aquac. Res. Development, v. 5, n. 5, p. 1-7, 2014.

GOPAKUMAR, G.; NAZAR, A. K. A.; TAMILMANI, G.; SAKTHIVEL, M.; KALIDAS, C.; RAMAMOORTHY, S.; PALANICHAMY, S.; MAHARSHI, V. A.; RAO, K. S.; RAO, G. S. First experience in the larviculture of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1752) in India. Indian J. Fish., v. 59, n. 1, p. 59-63, 2012.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. Ecotoxcol. Environ. Saf., v. 51, p. 115–127, 2002a.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. β-Naphthoflavone liver erod and erythrocytic nuclear abnormality induction in juvenile *Dicentrarchus labrax* L. Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 52, n. 1, p. 69-74, 2002b.

GUO, J. J.; KUO, C. M.; HONG, J. W.; CHOU, R. L.; LEE, Y. H.; CHEN, T. I. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in Cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture, v. 435, p. 111-115, 2015.

GUO, Z.; LIN, H.; XU, L.; SU, Y.; FENG, J. Effects of galacto-oligosaccharides in feed on growth performance, serum immunological and biochemical factors of cobia. South China Fish. Sci., v. 7, n. 1, p. 56-61, 2011.

HAMILTON, S.; SEVERI, W.; CAVALLI, R. O. Biologia e aquicultura do beijupirá: uma revisão. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 461-477, 2013.

HASUE, F. M.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. C. A.; ROCHA, A. J. S.; VIGNARDI, C. P.; SARTORIO, P. V.; GOMES, V.; PHAN, V. N. Assessment of

genotoxicity and depuration of anthracene in juvenile coastal fish *Trachinotus carolinus* using the comet assay. Braz. J. Oceanogr., v. 61, p. 243-249, 2013.

HOSEINI, S. M.; TORT, L.; ABOLHASANI, M. H.; RAJABIESTERABADI, H. Physiological, ionoregulatory, metabolic and immune responses of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin, 1897) to stress. Aquacult. Res., p. 1-11, 2015.

HURLEY-SANDERS, J.; HARMS, C.; CHRISTIANSEN, E.; CLARKE III, E.; LAW, J. Exuberant granulation tissue response associated with *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae) infestation in two cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus). J. Fish Dis., v. 39, p. 277–283, 2016.

HUY, N. Q.; MINH, D. V.; LUU, L. T. Status of cobia *Rachycentron canadum* seed production in Vietnam with focus on method production, constrains and potential. *In:* World Aquaculture Society Annual Meeting, 2006, Florence, Italy. **Abstracts...** Florence, 2006. p. 659.

IBRAHEM, M. D.; IBRAHIM, M. A. The potential effects of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on tissue protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through estimation of P53 level. J. Adv. Res., v. 5, p. 133–136, 2014.

IMSLAND, A.; FOSS, A.; GUNNARSSON, S.; BERNTSSEN, M. H. G.; FITZGERALD, R.; BONGA, S. W.; HAM, V. E.; NAEVDAL, G.; STEFANSSON, S. O. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, v. 198, p. 353-367, 2001.

INOUE, T.; WU, L.; STUART, J.; MAKI, C. G. Control of p53 nuclear accumulation in stressed cells. FEBS Lett., v. 579, p. 4978–4984, 2005.

JIN, Y.; ZHENG, S.; PU, Y.; SHU, L.; SUN, L. LIU, W.; FU, Z. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere, v. 82, p. 398–404, 2011.

KAISER, J. B.; HOLT, J. G. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Rachycentron canadum*. Cultured Aquatic Species Information Programme. *In*: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. 2007.

KALANTZI, I.; ZERI, C.; CATSIKI, V.; TSANGARIS, C.; STROGYLOUDI, E.; KABERI, H.; VERGOPOULOS, N.; TSAPAKIS, M. Assessment of the use of copper alloy aquaculture nets: potential impacts on the marine environment and on the farmed fish. Aquaculture, v. 465, p. 209-222, 2016.

KERAMBRUN, E.; HENRY, F.; CORNILLE, V.; COURCOT, L.; AMARA, R. A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. Chemosphere, v. 91, n. 4, p. 498–505, 2013.

KERBER, C. E.; SANCHES, E. G.; SANTIAGO, M.; LUQUE, J. L. First record of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in sea-farmed cobia (*Rachycentron canadum*) in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v. 20, n. 4, p. 331-333, 2011.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Pollut. Bull., v. 46, p. 182-186, 2003.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res., v. 544, p. 43-64, 2003.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Ann. Rev. Physiol., v. 68, p. 253-278, 2006.

LIAO, I. C.; HUANG, T. S.; TSAI, W. S. ; HSUEH, C. M.; CHANG, S. L.; LEANO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. Aquaculture, v. 237, p. 155–165, 2004.

LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. **Cobia aquaculture: research, development and commercial production.** Taiwan: Asian Fisheries Society, 2007. 178 p.

LIN, J. H.; CHEN, T. Y.; CHEN, M. S.; CHEN, H. E.; CHOU, R. L.; CHEN, T. I.; SU, M. S.; YANG, H. L. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. Aquaculture, v. 255, p. 125-132, 2006.

LIU, K.; AI, Q. H.; MAI, K. S.; ZHANG, W. B.; ZHANG, L.; ZHENG, S. X. Dietary manganese requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Aquacul. Nutr., v. 19, n. 4, p. 461–467, 2013.

LIU, K.; WANG, X. J.; AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, W. Dietary selenium requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Aquac. Res., v. 41, n. 10, p. 594-601, 2010.

MACHADO, A. A. S.; HOFF, M. L. M.; KLEIN, R. D.; CORDEIRO, G. J.; AVILA, J. M. L.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A. Oxidative stress and DNA damage responses to phenanthrene exposure in the estuarine guppy *Poecilia vivipara*. Mar. Environ. Res., v. 98, p. 96-105, 2014a.

MACHADO, S.; CUNHA, V.; REIS-HENRIQUES, M. A.; FERREIRA, M. Histopathological lesions, P-glycoprotein and PCNA expression in zebrafish (*Danio rerio*) liver after a single exposure to diethylnitrosamine. Environ. Toxicol. Pharmacol., v. 38, n. 3, p. 720–732, 2014b.

MAHFOUZ, M. E.; HEGAZI, M. M.; MOHAMMED, A.; MAGD, E.; KASEM, E. A. Metabolic and molecular responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* during short and prolonged hypoxia. Mar. Freshw. Behav. Phy., v. 48, n.5, p. 319-340, 2015.

MARTINS, M.; COSTA, P. M. The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. Mutagenesis, v. 30, p. 89–106, 2015.

McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R.. Biological markers of environmental contamination. *In*: McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Eds.). **Biomarkers of environmental contamination.** Boca Raton (USA): Lewis Publishers, 1990. p. 3-16.

McCARTY Jr., K. S.; SZABO, E.; FLOWERS, J. L.; COX, E. B.; LEIGHT, G. S.; MILLER, L.; KONRATH, J.; SOPER, J. T.; BUDWIT, D. A.; CREASMAN, W. T.;

SEIGLER, H. F.; McCARTY, K. S. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. Cancer Res., v, 46, n. 8, p. 4244s-4248s, 1986.

MEYER, G. H.; FRANKS, J. S. Food of cobia *Rachycentron canadum*, from the north central Gulf of Mexico. Gulf Res. Rep., v. 9, p. 161-167, 1996.

MIAO, S.; JEN, C. C.; HUANG, C. T.; HU, S. H. Ecological and economic analysis for cobia *Rachycentron canadum* commercial cage culture in Taiwan. Aquacult. Int., v. 17, p. 125–141, 2009.

MOE, H.; GAARDER, R. H.; OLSEN, A.; HOPPERSTAD, O. S. Resistance of aquaculture net cage materials to biting by Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquacult. Eng., v. 40, n. 3, p. 126-134, 2009.

MUELLER, K. W.; WATANABE, W.; HEAD, W. D. Occurrence and control of *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) in cultured tropical marine fish, including three new host records. Prog. Fish-Cult., v. 56, n. 2, p. 140-142, 1994.

NAKAMURA, H. Cobia culture in Okinawa. *In*: LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. (Eds.). **Cobia Aquaculture: research, development and commercial production.** Taiwan: Asian Fisheries Society, 2007. p. 97-103.

NAKANO, T.; AFONSO, L. O. B.; BECKMAN, B. R.; IWAMA, G. K.; DEVLIN, R. H. Acute physiological stress down-regulates mrna expressions of growth-related genes in Coho Salmon. Plos One, v. 8, n. 8, p. e71421, 2013.

NAVARRO, R. D.; SILVA, R. F.; RIBEIRO FILHO, O. P.; CALADO, L. L.; REZENDE, F. P.; SILVA, C. S.; SANTOS, L. C. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas do lambari prata (*Astayanax scabripinni*s Jerenyns, 1842) em diferente sistema de cultivo. Zootecnia Trop., v. 24, p. 22-33, 2006.

NIGRO, M.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; GORBI, S.; REGOLI, F. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. Mar. Environ. Res., v. 54, n. 3–5, p. 517–520, 2002.

OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. Sci. Total Environ., v. 396, p. 70-78, 2008.

OREN, M.; DAMALAS, A.; GOTTLIEB, T.; MICHAEL, D.; TAPLICK, J.; LEAL, J. F.; MAYA, R.; MOAS, M.; SEGER, R.; TAYA, Y.; BEN-ZE'EV, A. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. Biochem. Pharmacol., v. 64, p. 865-871, 2002.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities induction by cyclophosphamide and PAHs. Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 40, p. 71–76, 1998.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene and β-naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. Environ. Int., v. 28, n. 4, p. 285–293, 2002.

PAPANDROULAKIS, N.; MESA-RODRIGUEZ, A.; ANASTASIADIS, P.; LISAC, D.; ASDERIS, M.; PAVLIDIS, M. Installation, operation and evaluation of a submerged cage at 45M depth in crete for the rearing of red porgy *Pagrus pagrus*. Aquacult. Res., v. 44, p. 1196–1205, 2013.

PEREIRA, J. J.; MERCALDO-ALLEN, R.; KUROPAT, C.; LUEDKE, D.; SENNEFELDER, G. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin level sand hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., v. 24, p. 259–266, 1993.

PETERSEN, E. H.; GLENCROSS, B. D.; TIEN, N. V.; TUAN, L. A.; PHUONG, T. H. Recent changes in the bioeconomic of finfish mariculture in Vietnam. J. Aquacult. Res. Development, v. 6, n. 3, p. 311, 2015.

PHILIPOSE, K. K.; LOKA, J.; SHARMA, S. R. K.; DIVU, D.; RAO, K. S.; SADHU, N.; DEBE, P.; GOPAKUMAR, G.; RAO, G. S. Farming of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766) in open sea floating cages in India. Indian J. Fish., v. 60, n. 4, p. 35-40, 2013.

PRUNET, P.; ØVERLI, Ø.; DOUXFILS, J.; BERNARDINI, G.; KESTEMONT, P.; BARON, D. Fish welfare and genomics. Fish Physiol. Biochem., v. 38, n. 1, p. 43-60, 2012.

QU, R.; FENG, M,; WANG, X.; QIN, L.; WANG, C.; WANG, Z.; WANG, L. Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. Aquat. Toxicol., v. 150, p. 9-16, 2014.

RICHE, M. A.; WEIRICH, C. R.; WILLS, P. S.; BAPTISTE, R. M. Stocking density effects on production characteristics and body composition of market size cobia, *Rachycentron canadum*, reared in recirculating aquaculture systems. J. World Aquacult. Soc., v. 44, n. 2, p. 259 -266, 2013.

RICKER, W. E. Computational and interpretation of biological statistics of fish populations. Bull. Fish. Res. Board Can., v. 191, p. 1-367, 1975.

ROCHA, A. J. S.; SANTOS, T. C. A.; GOMES, V.; BÍCEGO, M. C.; BARBOSA, A. C. R. A.; PASSOS, M. J. A. C. R.; HASUE, F. M.; PHAN, V. N. Assessment of trophic transfer of benzo[a]pyrene genotoxicity from the post-larval pink shrimp *F. brasiliensis* to the juvenile Florida pompano *T. carolinus*. Environ. Toxicol. Pharmacol., v. 34, p. 969-976, 2012.

RODRIGUES, R. V.; SCHWARZ, M. H.; DELBOS, B. C.; SAMPAIO, L. A. Acute toxicity and sublethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture, v. 271, p. 553–557, 2007.

RODRIGUES, R. V.; SCHWARZ. M. H.; DELBOS, B. C.; CARVALHO, E. L.; ROMANO, L. A.; SAMPAIO, L. A. Acute exposure of juvenile cobia *Rachycentron canadum* to nitrate induces gill, esophageal and brain damage. Aquaculture, v. 322-323, p. 223–226, 2011.

ROMBENSO, A. N.; ARAÚJO, A. L.; SAMPAIO, L. A. Update on cobia production in Southern Brazil: current limitations and opportunities. *In:* FENACAM & LACQUA/SARA (WAS) '15, 2015, Fortaleza, Brasil. **Abstracs...** Fortaleza, 2015.

ROMBENSO, A. N.; TRUSHENSKI, J. T.; SCHWARZ, M. H. Fish oil replacement in feeds for juvenile Florida Pompano: Composition of alternative lipid influences degree of tissue fatty acid profile distortion. Aquaculture, v. 458, p. 177-186, 2016.

SAHIN, K.; YAZLAK, H.; ORHAN, C.; TUZCU, M.; AKDEMIR, F.; SAHIN, N. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. Aquaculture, v. 418-419, p. 132-138, 2014.

SAMPAIO, L. A.; MOREIRA, C. B.; MIRANDA-FILHO, K. C.; ROMBENSO, A. N. Culture of cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the Brazilian coast. Aquacult. Res., v. 42, p. 832-834, 2011.

SARAIVA, A.; COSTA, J.; SERRÃO. J.; EIRAS, J. C.; CRUZ, C. Study of the gill health status of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) using different tools. Aquaculture, v. 441, p. 16–20, 2015.

SASSI, R.; KUTNER, M. B. B. Variação sazonal do fitoplâncton da região do Saco da Ribeira (LAT, 23°30'S; LONG, 45°07'W), Ubatuba, Brasil. Bolm Inst. Oceanogr., São Paulo, v. 31, n. 2, p. 29-42, 1982.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). FAO Fisheries Synopsis 153, NOAA Technical Report NMFS 82. Washington DC: US Department of Commerce, 1989. 21p.

SHUGART, L. R. Molecular markers to toxic agents. *In:* NEWMAN, M. C.; JAGOE, C. H. (Eds.). **Ecotoxicology: a hierarchial treatment.** Boca Raton (USA): CRC Press, 1996. p. 133-161.

SHUGART, L. R.; BICKHAM, J.; JACKIM, G.; MCMAHON, G.; RIDLEY, W.; STEIN, J.; STEINERT, S. DNA alterations. *In*: HUGGETT, R. J.; KIMERLY, R. A.; MEHRLE, P. M.; JR. BERGMAN, H. L. (Eds.). **Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** Chelsea (USA): Lewis Publishers, 1992. p.155-210.

SILVA-CARRILLO, Y.; HERNÁNDEZ, C.; HARDY, R. W.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, B.; CASTILLO-VARGASMACHUCA, S. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Aquaculture, v. 364-365, p. 180-185, 2012.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res., v. 175, p. 184-191, 1988.

SKULSTAD, O. F.; KARLSEN, Ø.; FOSSEIDENGEN, J. E.; KRISTIANSEN, T. S.; TARANGER, G. L.; OPPEDAL, F. Vertical distribution and sexual maturation in cage-farming of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed to natural or continuous light. Aquacult. Res., v. 44, n. 6, p. 903-917, 2013.

SOUZA-FILHO, J. J.; TOSTA, G. A. M. Bijupirá: As primeiras desovas da geração F1. Panor. Aquicult., v. 18, p. 50-53, 2008.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; POPOVIC, N. T.; COZ-RAKOVAC, R.; JADAN, M. Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. J. Fish Biol., v. 74, p. 2239–2249, 2009.

SUN, L.; CHEN, H. Effects of water temperature and fish size on growth and bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture, v. 426-427, p. 172-180, 2014.

SUTTON, S. G.; BULT, T. P.; HAEDRICH, R. L. Relationships among fat weight, body weight, water weight, and condition factors in wild Atlantic Salmon Parr. Trans. Am. Fish. Soc., v. 129, n. 2, p. 527-538, 2000.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen., v. 35, p. 206-221, 2000.

TIEN, N. V.; CHINH, D. T. M.; HUONG, T. T. M.; PHUONG, T. H.; IRVIN, S.; GLENCROSS, B. Development of a nutritional model to define the energy and protein requirements of cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture, v. 463, p. 193-200, 2016.

TOLUSSI, C. E.; HILSDORF, A. W. S.; CANEPPELE, D.; MOREIRA, R. G. The effects of stocking density in physiological parameters and growth of the endangered teleost species piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1877**)**. Aquaculture, v. 310, n. 1-2, p. 221–228, 2010.

TRUSHENSKI, J.; SCHWARZ, M.; BERGMAN, A.; ROMBENSO, A.; DELBOS, B. DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n−3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture, v. 326–329, p. 81–89, 2012.

VAN der OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol., v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN DYK, J. C.; COCHRANE, M. J.; WAGENAAR, G. M. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. Chemosphere, v. 87, p. 301–311, 2012.

VIGNARDI, C. P.; HASUE, F. M.; SARTORIO, P. V.; CARDOSO, C. M.; MACHADO, A. S. D.; PASSOS, M. J. A. C. R.; SANTOS, T. C. A.; NUCCI, J. M.; HEWER, T. L. R.; WATANABE, I.; GOMES, V.; PHAN, N. V. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). Aquat. Toxicol., v. 158, p. 218-229, 2015.

WAHJUDI, B.; MICHEL, A. Cobia culture in Indonesia. *In*: LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. (Eds.). **Cobia Aquaculture: research, development and commercial production.** Taiwan: Asian Fisheries Society, 2007. p. 105-114.

WANG, J. T.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; MAI, K. S.; DU, Z. Y.; WANG, Y.; YANG, H. J. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture, v. 249, p. 439-447, 2005.

WANG, Z.; MAI, K.; XU, W.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; AI, Q. Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture, v. 454, p. 148–156, 2016.

WEBB JR.; K. A.; HITZFELDER, G. M.; FAULK, C. K.; HOLT, G. J. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture system. Aquaculture, v. 264, p. 223–227, 2007.

WEIRICH, C. R.; SMITH, T. I. J.; DENSON, M. R.; STOKES, A. D.; JENKINS, W. E. Pond culture of larval and juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, in the Southeastern United States: initial observations. J. Appl. Aquacult., v. 16, p. 27-44, 2004.

YANG, J.; CHEN, G.; HUANG, J. S.; ZHANG, J. D.; SHI, G.; TANG, B. G.; ZHOU, H. Effects of temperature and salinity on the growth and activities of antioxidant enzymes of cobia (R*achycentron canadum*) juveniles. J. Guangdong Ocean University, v. 27, n. 4, p. 25-29, 2007.

YASUMARU, F. A.; PASSOS, M. J. A. C. R.; GOMES, V.; RAGGI, T.; OTA, R. H.; LEMOS, D. Conteúdo e disponibilidade de nutrientes em ingredientes proteicos para dietas de beijupirá, *Rachycentron canadum*: desenvolvimento de metodologia in vitro e aplicação com matérias-primas regionalmente disponíveis. *In*: NUNES, A. J. P. (Org.). **Nutrição, sanidade e valor do beijupirá, *Rachycentron canadum*, cultivado no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: MPA/CNPq/UFC, 2014. p. 85-95.

ZHOU, H.; CHEN, G.; GU, B. H.; LIN, X. T. Relative contribution of alternative proteins to the growth of Juvenile Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus). Aquacult. Res., v. 47, n. 5, p. 1639 -1651, 2016.

ZHOU, Q. C.; ZHAO, J.; LI, P.; WANG, H. L.; WANG, L. G. Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture, v. 322–323, p. 122-127, 2011.

ZHOU, Q.; WANG, L.; WANG, H.; XIE, F.; WANG, T. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Fish Shellfish Immunol., v. 32, p. 969-975, 2012.