
JENNIFER LIMA DE OLIVEIRA

**Capacidade de elongação e dessaturação de ácidos graxos
polinsaturados com 18 carbonos e sua relação com a resposta imune
não-específica de *Psalidodon fasciatus***

Elongation and desaturation capacity of 18-carbon polyunsaturated fatty
acids and their relation with the non-specific immune response of
Psalidodon fasciatus

São Paulo

2024

JENNIFER LIMA DE OLIVEIRA

VERSÃO CORRIGIDA

**Capacidade de alongação e dessaturação de ácidos graxos
polinsaturados com 18 carbonos e sua relação com a resposta imune
não-específica de *Psalidodon fasciatus***

Elongation and desaturation capacity of 18-carbon polyunsaturated fatty
acids and their relation with the non-specific immune response of
Psalidodon fasciatus

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para obtenção de Título de Mestre
em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Renata Guimarães Moreira
Whitton

Coorientadora: Aline Dal'Olio Gomes

São Paulo

2024

Ficha Catalográfica

Lima de Oliveira, Jennifer

Capacidade de alongação e
dessaturação de ácidos graxos polinsaturados com 18 carbonos e sua relação com a resposta imune não-específica de *Psalidodon fasciatus*

Número de páginas: 61

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Ácidos graxos; 2. Metabolismo; 3. Teleósteos. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique de Melo

Profa. Dra. Rosana Oliveira Batista



Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Orientadora

Dedicatória

Dedico este trabalho à Deus,
à minha família e
às minhas orientadoras.

Epígrafe

“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a ele seja a glória na igreja, e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!”

Efésios 3:20-21

(Bíblia Sagrada - Nova Versão Internacional)

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de expressar minha mais profunda gratidão à Deus, porque sem Ele a realização deste trabalho, que tanto me ensinou e me transformou, não seria possível. De forma muito íntima posso dizer que foi Ele que, com todo o Seu amor, me capacitou quando eu não acreditava ser capaz, e me deu forças para continuar quando eu pensei em desistir, me reerguendo e me permitindo viver experiências sobrenaturais durante todos estes anos.

Em segundo lugar gostaria de agradecer à minha família, por serem a minha base e por terem vivido todas as emoções comigo (seja ela boa ou ruim), sempre me apoiando e me rodeando de amor. Obrigada mãe, pai, tios e avôs por estarem sempre ao meu lado, mesmo em meio ao caos da pandemia, me auxiliando em tudo que estava ao alcance de vocês. Obrigada tia e madrinha por cada conselho, colo amigo e oração diante dos meus medos e inseguranças. Todos vocês são extremamente importantes para mim.

Além disso, agradeço à minha psicóloga Thamires por ter colaborado ativamente com o meu amadurecimento pessoal, sempre me auxiliando e me incentivando.

Agradeço imensamente às minhas orientadoras Aline e Renata, por toda paciência, aprendizado e oportunidade. Agradeço demais por todo incentivo desde o primeiro dia de parceria, sempre me acolhendo com muito cuidado e dedicação, e me ajudando a crescer e a realizar sonhos inimagináveis, como a minha bolsa no exterior. Sou imensamente grata pelo privilégio de caminhar ao lado de duas mulheres com os corações tão incríveis. Vocês são grandes referências para mim, tanto como pessoa quanto como profissional.

Agradeço a todos os meus colegas de trabalho, os quais formam está linda equipe que é o Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA). Em especial gostaria de agradecer à Giovana, que além de colaboradora se tornou uma grande amiga, sempre me socorrendo e me ensinando de diversas maneiras, à Ethiene, pela amizade que construímos e ao Victor, antigo integrante do laboratório, por todo auxílio no início do projeto. Além disso, gostaria de agradecer ao Bruno, à Micheli e ao Renato pela colaboração. Todos vocês foram cruciais para o desenvolvimento deste projeto e para o meu desenvolvimento pessoal.

Por fim, gostaria de agradecer ao Departamento de Fisiologia localizado no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), e à Piscicultura da Barragem de Ponte Nova do DAEE, localizada em Salesópolis - SP, por ter cedido o espaço para o desenvolvimento deste estudo, bem como ao Giovani Sampaio Gonçalves, pela confecção dos *pellets* da dieta. Junto a isso, gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos: 2020/10937-3 e 2021/11725-2) pelo financiamento desta pesquisa.

A todos, o meu mais sincero obrigada!

Índice

I - Introdução

1. **Síntese e função dos ácidos graxos**..... 1
2. **FAs e o sistema imune** 4
3. **Justificativa e problemática** 6

II – Objetivos

1. **Objetivos específicos** 9

III - Materiais e Métodos

1. **Dietas experimentais** 10
2. **Delineamento experimental** 13
3. **Amostragem** 14
4. **Processamento das amostras** 15
 - 4.1 *Lipídios totais* 15
 - 4.2 *Perfil de FA* 15
 - 4.3 *Expressão gênica* 16
 - 4.3.1 *Extração e normalização de RNA total* 16
 - 4.3.2 *Síntese de cDNA* 16
 - 4.3.3 *Extração e Purificação de DNA* 16
 - 4.3.4 *Primers utilizados* 17
 - 4.3.5 *PCR em tempo real* 18
 - 4.4 *Quantificação de prostaglandina PGE2* 18
 - 4.5 *Superóxido dismutase* 18
5. **Análise dos dados** 18

IV – Resultados

1. **Dados biométricos** 20
2. **Variáveis metabólicas** 20
 - 2.1 *Lipídios totais* 20
 - 2.2 *Perfil de ácidos graxos ($\mu\text{g/g}$)* 21
 - 2.3 *Expressão gênica* 29
3. **Variáveis imunes** 30
 - 3.1 *Prostaglandina PGE2 hepática* 30

3.2 <i>Superóxido dismutase</i>	31
3.3 <i>Expressão gênica</i>	32
V – Discussão	
1. Capacidade do lambari-do-rabo-vermelho em bioconverter FA	33
2. Efeito da alimentação no sistema imunológico	38
VI – Conclusões	42
VII – Resumo	43
VIII – Abstract	44
IX – Referências bibliográficas	45
X – Anexos	59
XI – Biografia	60

Introdução

1. Síntese e função dos ácidos graxos

Os lipídios são moléculas agrupadas pelo seu caráter insolúvel em água, uma vez que apresentam características químicas, físicas e funcionais muito distintas entre as classes. Com base nesta característica, são classificados em lipídios neutros (conhecidos como lipídios de armazenamento), por exemplo os triacilgliceróis, ceras e pigmentos, ou em lipídios polares (também chamados de lipídios estruturais), como os esfingolipídios e fosfolipídios, os quais podem, respectivamente, atuar tanto como reserva energética e isolante térmico, quanto como componentes de membranas celulares e precursores de hormônios e vitaminas (Sargent *et al.*, 2002; Nelson e Cox, 2019).

A maioria dos lipídios são ésteres de ácidos graxos (FAs, do inglês *fatty acids*) com álcoois, formados por cadeias de hidrocarboneto contendo de 4 a 36 átomos de carbono (C), sendo encontrados preferencialmente entre 16 e 22C em eucariotos multicelulares. Essas moléculas apresentam em uma de suas extremidades um grupo carboxila (-COOH) e, de acordo com a presença de duplas ligações (insaturações) ao longo da cadeia, podem ser classificados em: ácidos graxos saturados (SFAs, do inglês *saturated fatty acids*), que são FAs que não apresentam insaturações em suas cadeias carbônicas; monoinsaturados (MUFAs, do inglês *monounsaturated fatty acids*) que apresentam apenas uma insaturação; e polinsaturados (PUFAs, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) que possuem duas ou mais insaturações (Tocher, 2003a; Yaqoob, 2004; Nelson e Cox, 2019).

Além disso, PUFAs com mais de 18C também podem ser chamados de PUFAs de cadeia longa (LC-PUFAs, do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*), como é o caso do ARA (ácido araquidônico, C20:4n6), EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5n3) e DHA (ácido docosahexaenoico, C22:6n3) (Tocher, 2003a). Os LC-PUFAs apresentam um relevante papel para a manutenção da homeostase, uma vez que atuam na estrutura e fluidez das membranas celulares, sendo importante no funcionamento cerebral, saúde cardiovascular, crescimento, reprodução e sistema imunológico (Yaqoob, 2004; Brenna *et al.*, 2009; Arts e Kohler, 2009; Simopoulos, 2011).

Todos os organismos apresentam a capacidade de realizar a síntese *de novo* de FAs originando um SFA, como o ácido palmítico (C16:0), a partir da acetilcoenzima A (acetil-coA). Desta forma, pode-se dizer que a biossíntese de FA é catalisada através de 2 sistemas enzimáticos citosólicos: a acetil-coA carboxilase, que é capaz de transportar o acetil-coA presente na mitocôndria para o citosol na forma de citrato; e a ácido graxo-sintase (FAS, do inglês *fatty acid synthase*), um complexo multienzimático responsável pela síntese de FA a partir de moléculas de acetil-coA, sendo sua principal fonte de carbono (Nelson e Cox, 2019).

Após a síntese do ácido palmítico, pode haver a inserção de uma dupla ligação nessa molécula por meio da ação de enzimas dessaturases (FAD, do inglês *fatty acid desaturase*) originando um MUFA, o C16:1n7 (ácido palmitoleico). Por outro lado, o ácido palmítico também pode sofrer a ação de enzimas elongases (ELOVL) sendo alongado por meio da adição de 2 átomos de carbonos (acetil-coA) dando origem ao ácido esteárico (C18:0), o qual posteriormente pode ser dessaturado, originando um MUFA, como o ácido oleico (C18:1n9) (Tocher, 2003a; Yaqoob, 2004; Nelson e Cox, 2019).

No entanto, PUFAs, como o C18:2n6 (ácido linoleico) e o C18:3n3 (ácido α -linolênico), não podem ser sintetizados por animais devido à ausência das enzimas delta (Δ) 12 e 15 FAD, que bioconvertem o C18:1n9 nesses FAs. Neste sentido, tanto o C18:2n6 quanto o C18:3n3 são classificados como FAs essenciais para a maioria dos animais, e devido a sua importância como precursor de LC-PUFAs (os FAs fisiologicamente ativos) devem ser obtidos através da dieta (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2010).

Uma vez ingeridos, os FAs C18:3n3 e o C18:2n6 podem sofrer a ação de enzimas dessaturases, como a Δ 6 e a Δ 5 FAD, e ELOVL 5, sendo bioconvertidos em EPA e ARA, respectivamente. O EPA, por sua vez, pode ainda ser alongado e dessaturado originando o DHA (Figura 1) (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2003a; 2010; Tocher, 2015; Nelson e Cox, 2019). Adicionalmente, vias paralelas utilizando outras dessaturases, como a Δ 8 e a Δ 4 FAD, podem também estar envolvidas nesse processo (Figura 1) (Park *et al.*, 2009; Fonseca-Madrigal *et al.*, 2014).

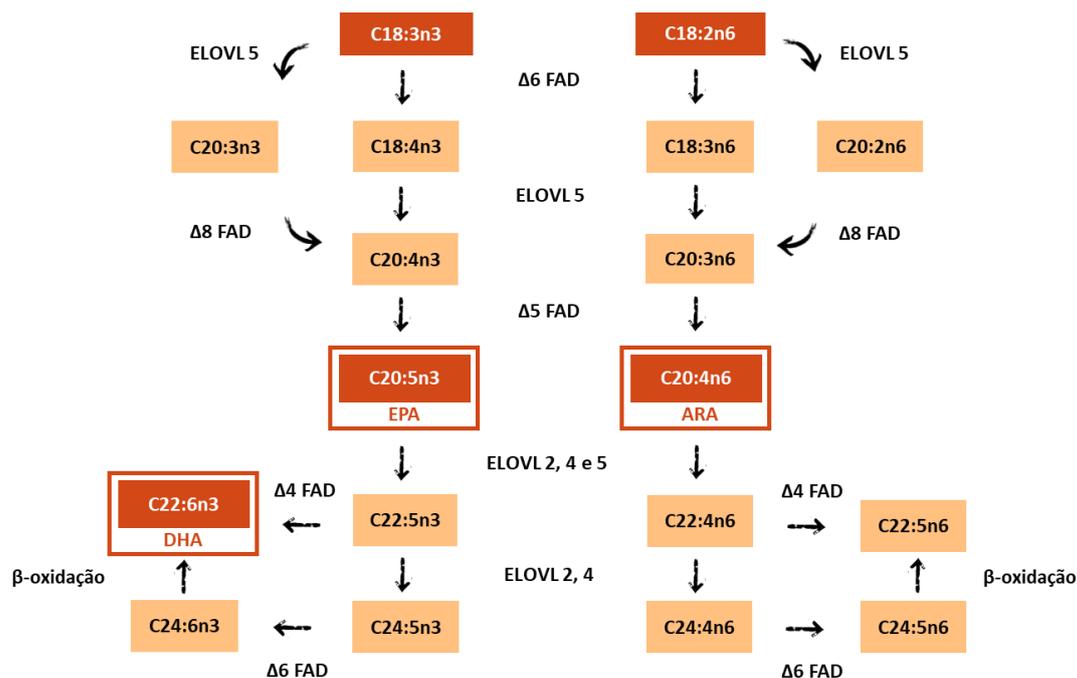


Figura 1. Processo de bioconversão dos PUFAs C18 (C18:2n6 e C18:3n3) ingeridos através da dieta, uma vez que não são sintetizados pelos animais, sob a ação das elongases (ELOVL 2, 4 e 5) e dessaturases (Δ 4, 5, 6 e 8 FAD – *fatty acid desaturase*) em LC-PUFAs. Fonte: Tocher (2015), adaptado.

Geralmente, espécies de peixes de água doce e salmonídeos apresentam uma maior capacidade de bioconversão de PUFAs C18 em seus derivados LC-PUFA quando comparados com a maioria das espécies marinhas (Zheng *et al.*, 2009; Turchini *et al.*, 2009; Tocher, 2010; Fonseca-Madrugal *et al.*, 2014; Monroig *et al.*, 2022). Esta característica provavelmente se deu pelo fato de animais de água doce viverem em um ambiente com uma maior pressão seletiva, pois a base da cadeia trófica dos ambientes aquáticos dulcícolas é rica em PUFA C18. Por outro lado, no ambiente marinho, a base da cadeia trófica apresenta algas ricas principalmente em EPA e DHA, apresentando, portanto, uma menor pressão seletiva para reterem a habilidade endógena de produção de LC-PUFAs (Tocher, 2010; Carmona-Antoñanzas, 2013; Castro *et al.*, 2016; Monroig *et al.*, 2022). Além disso, o nível trófico e a diadromia tem sido sugerido como potenciais moduladores da extensão da capacidade de alongação e dessaturação em teleósteos (Castro *et al.*, 2016).

O padrão apresentado de produção de LC-PUFA a partir de PUFA C18 faz uso das mesmas enzimas dessaturases e elongases que atuam em ambas as séries n3 e n6, com uma preferência por n3 (Senadheera *et al.*, 2011; Thanuthong *et al.*, 2011; Teoh e Ng, 2016; Xie *et al.*, 2018). Um estudo com cobia (*Rachycentron canadum*)

demonstrou que por mais que a expressão da *elovl* tenha se mostrado igualmente ativa em ambos os substratos, a $\Delta 6$ *fad* demonstrou preferência pelo substrato n3, além de ser mais expressa no cérebro do que nos outros tecidos, sugerindo um papel importante do DHA nas funções cerebrais (Zheng *et al.*, 2009). Além disso, diante do excesso de ômega 3, pode ser observado a inibição ou até mesmo o bloqueio da transcrição da $\Delta 6$ *fad*, impedindo a dessaturação dos PUFA n6 (Senadheera *et al.*, 2011; Thanuthong *et al.*, 2011). Neste sentido, esta preferência pode ser justificada através da pressão seletiva causada frente à importância de LC-PUFA n3, como o EPA e DHA nestes animais, resultando em enzimas com maior atividade em relação aos substratos da série n6 (Zheng *et al.*, 2009).

Deste modo, a composição de FA presente na dieta somada à habilidade dos animais em bioconverter os PUFAs C18, pode ser um determinante no perfil de FA presente nos tecidos e, assim influenciar as respostas fisiológicas dependentes dessas biomoléculas (Martino *et al.*, 2002; Calder, 2008; Gonçalves *et al.*, 2012).

2. FAs e o sistema imune

Entre as funções dos LC-PUFAs está a sua participação nas respostas imunes. Diversos estudos na literatura vêm demonstrando que a composição de PUFAs na dieta de teleósteos pode influenciar a imunidade não-específica desses animais (Montero *et al.*, 2008; Holen *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Cornet *et al.*, 2018; Sissener *et al.*, 2020; Magalhães *et al.*, 2021). Isto se dá uma vez que o EPA, o DHA e o ARA são capazes de atuar como precursores de eicosanoides, como por exemplo leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG), tromboxanos e resolvinas (Yaqoob, 2004; Calder, 2008; Yang *et al.*, 2014; Nelson e Cox, 2019), podendo interferir na fagocitose, atividade da lisozima sérica e expressão de genes relacionados ao sistema imune (Xu *et al.*, 2010; Kiron *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011).

Esses FAs estão presentes nos fosfolipídios de membrana, os quais sob um estímulo adverso, como a presença de patógenos ou injúrias, podem ser clivados através da ação da fosfolipase A2, que age na posição sn-2 dos fosfolipídios. Uma vez que o ARA ou o EPA são liberados dos fosfolipídios, eles sofrem a ação de enzimas lipoxigenases (LOX), produzindo os LT, ou de enzimas ciclooxigenases (COX), originando as PG e tromboxanos (Araujo *et al.*, 2019; Nelson e Cox, 2019). A enzima COX é conhecida por apresentar duas isoformas, a COX 1, que é considerada uma enzima constitutiva, pois está sempre operante no organismo, liberando mediadores

que atuam em processos fisiológicos diversos; e a COX 2, que é uma enzima indutiva, ativada apenas durante o processo inflamatório (Nelson e Cox, 2019). Vale ressaltar que, tanto a COX 1 quanto a 2 podem atuar sobre o ARA e o EPA (Figura 2) (Calder, 2006; Nelson e Cox, 2019). Desta forma, após a ação da COX sobre o substrato ARA, por exemplo, são produzidas PGs da série E2 (PGE2), a qual apresenta de forma geral, uma ação pró-inflamatória. Por outro lado, a atuação da COX sobre o substrato EPA, produz PGE3, conhecida por sua ação anti-inflamatória (Bagga *et al.*, 2003; Calder, 2009; Pettersen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014) (Figura 2).

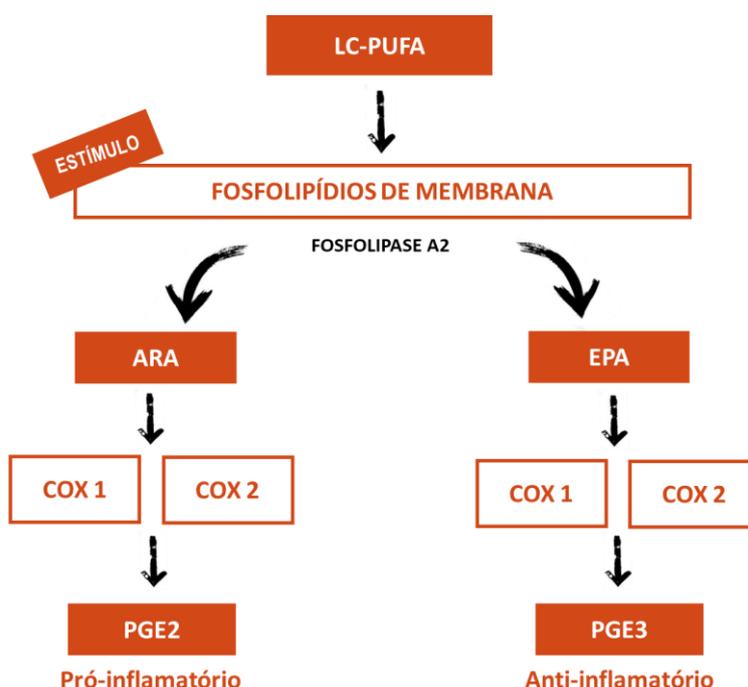


Figura 2. Processo de síntese de eicosanoides, mais especificamente da prostaglandina E2 (PGE2) e E3 (PGE3), após a clivagem dos fosfolípidios de membranas induzida por um estímulo adverso.

Já foi observado que dietas com maiores quantidades de C18:3n3 foram capazes de modular o sistema imune de juvenis de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), aumentando a atividade anti-inflamatória desses animais, por meio da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos, menor produção de eicosanoides e redução da produção de óxido nítrico após estímulo bacteriano (Chen *et al.*, 2016). Além disso, foi documentado que dietas ricas em DHA ou EPA, quando associada ao cádmio, apresentaram diferentes resultados na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), uma vez que no grupo alimentado com uma maior quantidade de DHA foi observado uma maior expressão de genes que codificam

citocinas pró-inflamatórias, enquanto no grupo alimentado com a dieta rica em EPA foi observado uma maior expressão de genes que codificam citocinas anti-inflamatórias (Cornet *et al.*, 2018).

Adicionalmente, órgãos como o timo, baço e rim são importantes no processo imunológico e parecem ser influenciados pelo perfil de LC-PUFAs presente na dieta (Zapata *et al.*, 2006; Bjørgen e Koppang, 2021). Foram observadas alterações na secreção de PG nas células do rim de salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) ao serem expostas ao EPA, DHA e ARA ou apenas um desses LC-PUFAs, resultando na redução da secreção de PGE2 quando expostas somente ao ARA ou DHA, e aumento quando expostas a combinação de ARA e EPA (Holen *et al.*, 2015).

O intestino também tem sido alvo de diversas pesquisas quando se trata de impacto da alimentação ou ingestão de contaminantes na imunidade dos peixes, uma vez que está intimamente associado ao tecido linfático (Rauta *et al.*, 2012; Salinas *et al.*, 2015; Bjørgen e Koppang, 2021). Neste sentido, foi observado que, principalmente a segunda e a terceira porção do intestino apresentam antígenos, os quais podem ser transportados tanto para o sistema imunológico local quanto sistêmico (Harstad *et al.*, 2008; Roumbout *et al.*, 2011). Neste sentido, achados na literatura mostram que a substituição da farinha de peixe (rica em LC-PUFA da série n3) pela farinha de soja (rico em PUFA C18 da série n6, como o C18:2n6), por exemplo, foi capaz de desencadear uma inflamação na porção distal do intestino do salmão-do-Atlântico (*S. salar*), sendo agravada quando a mesma alimentação foi estendida por 4 meses (Urán *et al.*, 2008a). No entanto, é importante destacar que a gravidade da inflamação depende da espécie estudada, visto que a carpa comum (*Cyprinus carpio*), quando alimentada com dieta rica em C18:2n6, desenvolveu um quadro de enterite apenas até a quarta semana de experimento, dando início a um processo de recuperação da inflamação após a quinta semana (Urán *et al.*, 2008b).

3. Justificativa e problemática

O lambari-do-rabo-vermelho (*Psalidodon* aff. *fasciatus*, Cuvier, 1819) previamente nomeado de *Astyanax* aff. *fasciatus* foi revisado e reintroduzido como pertencente ao gênero *Psalidodon* (Téran *et al.*, 2020). Está geograficamente distribuído desde o Sul do México até o rio da Prata (de Carvalho *et al.*, 2009), sendo comumente encontrado nos rios do Estado de São Paulo. São peixes de pequeno porte (Téran *et al.*, 2020), muito ativos, inclusive realizam curtas migrações reprodutivas

(Arcifa *et al.*, 1991) e são bem conhecidos por sua habilidade em habitar diferentes ambientes (rios, riachos, lagos e reservatórios) com diferentes níveis de preservação, incluindo os altamente poluídos (Alonso *et al.*, 2019). Esta espécie tem uma dieta generalista e oportunista, tendo alta habilidade para mudar de presa em resposta às mudanças ambientais (Casatti *et al.* 2000; Wolff *et al.*, 2009). Adicionalmente, servem de alimento às espécies carnívoras, além de atuarem como dispersores de sementes, desempenhando assim, um importante elo na cadeia alimentar (Esteves, 1996; Gealh e Hahn, 1998; Vilella *et al.*, 2002).

No entanto, não há informação na literatura sobre a capacidade de alongação e dessaturação de *P. fasciatus*, contudo por ser um animal onívoro e de água doce acredita-se que a espécie apresente habilidade de bioconverter FAs. Estudos recentes realizados em reservatórios eutróficos com *P. fasciatus*, tem evidenciado uma alta porcentagem de EPA e DHA em seus tecidos, incluindo nos fosfolipídios, mesmo com a base da cadeia trófica sendo dominada por cianobactérias, algas ricas em C18:3n3 e, principalmente, C18:2n6. Neste sentido, os autores sugeriram que isso pode ser decorrente de bioconversões realizadas ao longo da cadeia trófica e/ou da própria capacidade de dessaturação e alongação de *P. fasciatus* em bioconverter os PUFA C18 em LC-PUFA e retenção destes FAs (Gomes *et al.*, 2016; 2021).

Deste modo, sabendo que as exigências de FAs entre teleósteos são diferentes, entender o processo de dessaturação e alongação de PUFAs C18 em LC-PUFAs, assim como sua possível influência na produção de eicosanoides, e conseqüentemente, na resposta imune basal de *P. fasciatus* se faz necessária, contribuindo para o conhecimento desta área tão pouco explorada, bem como para o entendimento das respostas fisiológicas desses animais.

Considerando o que foi apresentado, as principais hipóteses deste trabalho são: **1)** Os animais apresentarão a capacidade de modificar a composição do perfil de FA, seja através da bioconversão bioquímica ou pela retenção de FAs específicos; **2)** Os animais alimentados com altas porcentagens de PUFAs C18 (C18:2n6 e C18:3n3) apresentarão uma maior expressão gênica das enzimas $\Delta 6$ *fad* e *elovl 5* e *2* quando comparados aos animais alimentados com altas porcentagens de LC-PUFAs, como EPA, DHA e ARA; **3)** As enzimas dessaturases apresentarão uma maior afinidade em bioconverter PUFAs C18 n3 em seus derivados ao invés de PUFAs C18 n6, aumentando a porcentagem de EPA e DHA nos tecidos devido a competição e afinidade específica entre os substratos; **4)** Por fim, nossa previsão é que animais com

maior porcentagem de FA n6 nos tecidos apresentarão maior produção de PGE2, resultando em uma maior resposta imune não-específica.

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a capacidade de *P. fasciatus* em alongar e dessaturar PUFAs C18, como o C18:2n6 e C18:3n3, em LC-PUFAs, além de investigar se o resultado da bioconversão será capaz de influenciar a resposta imune não-específica basal destes animais.

1. Objetivos específicos

- Comparar o perfil de FAs teciduais dos animais em relação às diferentes dietas analisadas;
- Avaliar a capacidade hepática de *P. fasciatus* em bioconverter, através de enzimas alongases e desaturases, as moléculas de PUFA C18 em LC-PUFA;
- Investigar se há preferência no acúmulo e bioconversão de FAs n3 quando há excesso de PUFAs da série n6;
- Avaliar o efeito das dietas em relação à resposta imune não-específica basal através da sua influência na expressão de genes imunes no rim, produção de PGE2 do fígado e atividade da superóxido dismutase do intestino.

Materiais e Métodos

1. Dietas experimentais

A produção da base das dietas experimentais foi realizada no Laboratório de Nutrição de Peixes localizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da USP, sob orientação do Prof./Dr. José Eurico Possebon Cyrino. Essa dieta (Tabela 1) foi produzida com baixo conteúdo lipídico, utilizando a farinha de peixe desengordurada através de uma série de lavagens com hexano para remoção da gordura (restando apenas 3,5 % de lipídio mensurado através de análises gravimétricas). Posteriormente, *pellets* extrusados foram produzidos e secos em estufas de circulação de ar forçada no Instituto de Pesca localizado em São José do Rio Preto- SP, sob a orientação do Dr. Giovanni Sampaio Gonçalves.

Tabela 1. Composição da dieta base utilizada no experimento.

Ingredientes	(%)
Farinha de peixe ^a	56,0
Tapioca ^b	9,6
Hemoglobina ^c	6,0
Farinha de trigo ^d	14,0
Premix Min. Vit. ^e	2,8
Stay C ^f	1,0
Taurina ^g	0,5
Benzoato de Sódio ^h	0,1
BHT ⁱ	0,1

^a Farinha de peixe (desengordurada por extração 3 × hexano); ^e Vitamina e mineral premix (IU kg⁻¹ ou g/kg de premix): vitamina A, 2.5MIU; vitamina D3, 0.25 MIU; vitamina E, 16.7 g; vitamina K3, 1.7 g; vitamina B1, 2.5 g; vitamina B2, 4.2 g; vitamina B3, 25 g; vitamina B5, 8.3; vitamina B6, 2.0 g; vitamina B9, 0.8; vitamina B12, 0.005 g; biotina, 0.17 g; vitamina C, 75 g; colina, 166.7 g; inositol, 58.3 g; etoxiquina, 20.8 g; cobre, 2.5 g; ferro ferroso, 10.0 g; magnésio, 16.6 g; manganês, 15.0 g; zinco, 25.0 g; ^{a,b,c,d,e,f,g,h,i} Nutricon Ltda-Me, São Paulo, Brasil.

As dietas experimentais foram preparadas utilizando a dieta base com adição de óleos variados (Tabela 2), por infusão a vácuo, para obtenção de diferentes perfis de PUFA's C18 e LC-PUFA's (Tabela 3), sendo todas consideradas isolipídicas. A quantidade de óleo utilizada em cada dieta está apresentada no Anexo I.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (%) da ração base e dos óleos adicionados (Média ± Desvio Padrão da Média).

FA (%)	Ração base	Soja	Linhaça	EPA	DHA	ARA	Coco
C15:0	0,7 ± 0,06	-	-	-	-	-	-
C17:0	0,6 ± 0,10	-	-	-	-	-	-
Σ OFA	1,3 ± 0,15	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	-	-	57,4 ± 3,71
C14:0	4,9 ± 0,62	-	-	-	1,9 ± 0,10	-	21,7 ± 0,71
C16:0	24,0 ± 0,62	11,9 ± 0,04	6,0 ± 0,04	0,7 ± 0,02	3,1 ± 0,10	6,8 ± 0,02	9,3 ± 1,42
C18:0	5,5 ± 1,14	4,2 ± 0,04	3,5 ± 0,16	2,5 ± 0,06	-	8,3 ± 1,44	3,1 ± 0,86
C20:0	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,24	-
C22:0	-	0,6 ± 0,03	-	-	-	1,1 ± 0,57	-
Σ SFA	34,4 ± 0,89	16,7 ± 0,04	9,5 ± 0,19	3,2 ± 0,07	5,0 ± 0,19	16,8 ± 2,23	91,5 ± 0,72
C16:1n7	8,1 ± 0,73	-	-	-	2,1 ± 0,09	-	-
C18:1n9	17,0 ± 0,97	24,0 ± 0,17	20,5 ± 0,44	8,5 ± 0,10	1,6 ± 0,07	10,7 ± 0,17	5,6 ± 0,99
C18:1n7	3,0 ± 0,15	1,6 ± 0,01	0,7 ± 0,03	3,4 ± 0,03	0,6 ± 0,05	-	-
Σ MUFA	28,0 ± 0,78	25,7 ± 0,17	21,2 ± 0,47	13,6 ± 0,16	4,3 ± 0,20	10,7 ± 0,17	5,6 ± 0,99
C18:3n3	1,1 ± 0,04	5,4 ± 0,13	53,6 ± 0,71	1,1 ± 0,01	-	-	-
C18:4n3	0,8 ± 0,07	-	-	3,2 ± 0,02	1,0 ± 0,03	-	-
C18:2n6	10,9 ± 0,35	52,2 ± 0,08	15,7 ± 0,06	1,4 ± 0,00	-	18,5 ± 1,24	2,4 ± 0,22
C18:3n6	-	-	-	0,6 ± 0,00	-	2,6 ± 0,33	-
C20:4n3	-	-	-	1,9 ± 0,02	0,8 ± 0,02	-	-
C20:5n3	9,4 ± 0,88	-	-	55,1 ± 0,25	13,9 ± 0,13	-	-
C22:5n3	-	-	-	0,7 ± 1,27	-	-	-
C22:6n3	10,0 ± 1,61	-	-	13,3 ± 0,08	65,2 ± 0,37	0,7 ± 1,25	-
C20:2n6	-	-	-	-	-	-	-
C20:3n6	-	-	-	-	-	1,4 ± 0,02	-
C20:4n6	2,5 ± 0,13	-	-	3 ± 0,05	0,9 ± 0,07	48,8 ± 2,85	-
C22:2n6	-	-	-	1,4 ± 0,02	1,4 ± 0,02	-	-
C22:4n6	-	-	-	-	1,8 ± 0,08	-	-
C22:5n6	1,7 ± 0,16	-	-	1,5 ± 1,29	5,8 ± 0,03	0,5 ± 0,79	-
Σ PUFA	36,4 ± 1,68	57,6 ± 0,21	69,3 ± 0,67	83,2 ± 0,23	90,8 ± 0,40	72,5 ± 2,4	2,4 ± 0,22
Σ PUFA n3	21,3 ± 1,40	5,4 ± 0,13	53,6 ± 0,71	75,4 ± 1,34	80,9 ± 0,31	0,7 ± 1,25	-
Σ PUFA n6	15,1 ± 0,34	52,2 ± 0,08	15,7 ± 0,06	7,8 ± 1,33	9,9 ± 0,16	71,7 ± 3,65	2,4 ± 0,22

SFA – ácido graxo saturado; MUFA – ácido graxo monoinsaturado; PUFA – ácido graxo polinsaturado; n3 – série ômega 3; n6 – série ômega 6; C18 – PUFAs com 18 carbonos.

À dieta Controle foi adicionado apenas óleo de coco (marca COPRA, rico em SFA, principalmente C12:0 e C14:0), apresentando uma quantidade reduzida de PUFA (Tabela 3). As demais dietas (LIN 1, LIN 2 e LIN 3) representam, em ordem crescente, um gradiente de C18:2n6, a partir da inclusão de diferentes proporções de óleo de soja (SOYA, rico em C18:2n6) e óleo de linhaça dourada (PAZZE, rico em

C18:3n3). Desta forma, a dieta LIN 1 apresentou a razão C18:3n3/C18:2n6 igual a $0,9 \pm 0,04$, LIN 2 igual a $0,5 \pm 0,07$ e LIN 3 igual a $0,4 \pm 0,03$ (Tabela 3). E por fim, temos a dieta LC-PUFA, denominada assim devido a sua alta porcentagem de LC-PUFA, a partir da inclusão de óleos concentrados de EPA (*Phosphotech Laboratories*), DHA (*CRODA™*) e ARA (*Jangsu Tiankai Biotechnology*), apresentando baixas porcentagens dos precursores C18 (Tabela 3). Vale ressaltar que a base de todas as dietas foi o óleo de coco, a fim de mantê-las isolipídicas e minimizar a inclusão de PUFAs C18.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (%) das dietas utilizadas no experimento (Média \pm Desvio Padrão da Média).

FA (%)	Controle	LIN 1	LIN 2	LIN 3	LC-PUFA
C12:0	43,1 \pm 2,76	15,2 \pm 1,23	16,2 \pm 2,06	12,3 \pm 0,71	12,6 \pm 0,97
C14:0	16,5 \pm 0,20	6,1 \pm 0,22	6,9 \pm 0,41	5,4 \pm 0,15	5,8 \pm 0,55
C16:0	15,3 \pm 0,96	14,5 \pm 0,31	16,9 \pm 2,08	16,2 \pm 0,75	14,4 \pm 2,41
C18:0	4,7 \pm 0,34	5,0 \pm 0,10	5,4 \pm 0,54	5,1 \pm 0,31	5,1 \pm 0,26
Σ SFA	79,7 \pm 1,61	40,9 \pm 1,81	45,4 \pm 0,34	39,0 \pm 0,98	37,8 \pm 1,14
C16:1n7	2,3 \pm 0,26	2,5 \pm 0,04	3,0 \pm 0,59	2,7 \pm 0,31	3,2 \pm 0,45
C18:1n9	10,4 \pm 1,06	18,1 \pm 0,49	17,6 \pm 0,18	18,1 \pm 0,17	11,9 \pm 0,70
C18:1n7	1,3 \pm 0,12	1,6 \pm 0,02	1,9 \pm 0,28	1,9 \pm 0,14	2,4 \pm 0,23
C20:1n9	-	0,5 \pm 0,00	0,6 \pm 0,09	0,6 \pm 0,05	1,0 \pm 0,07
Σ MUFA	13,9 \pm 1,44	22,8 \pm 0,45	23,1 \pm 1,14	23,3 \pm 0,34	18,5 \pm 1,31
C18:3n3	-	14,8 \pm 1,00	8,2 \pm 1,63	9,0 \pm 0,67	0,7 \pm 0,06
C18:4n3	-	-	-	-	0,8 \pm 0,10
C18:2n6	1,1 \pm 0,41	16,0 \pm 0,55	17,5 \pm 1,04	23,0 \pm 1,51	7,2 \pm 0,96
C20:5n3	1,7 \pm 0,27	1,9 \pm 0,06	2,0 \pm 0,44	2,0 \pm 0,32	14,3 \pm 1,23
C22:6n3	2,3 \pm 0,31	2,8 \pm 0,17	2,9 \pm 0,7	3,0 \pm 0,52	15,0 \pm 0,89
C20:2n6	0,6 \pm 0,04	-	-	-	-
C20:4n6	0,7 \pm 0,06	0,7 \pm 0,05	0,8 \pm 0,24	0,8 \pm 0,13	3,8 \pm 1,15
C22:5n6	-	-	-	-	1,9 \pm 0,10
Σ PUFA	6,4 \pm 0,31	36,3 \pm 1,37	31,5 \pm 1,36	37,8 \pm 1,20	43,8 \pm 2,45
Σ PUFA n3	4,0 \pm 0,57	19,6 \pm 0,87	13,1 \pm 0,55	14,0 \pm 0,83	30,8 \pm 2,17
Σ PUFA n6	2,4 \pm 0,40	16,8 \pm 0,50	18,4 \pm 0,81	23,8 \pm 1,38	12,9 \pm 0,28
n3/n6	1,7 \pm 0,47	1,2 \pm 0,02	0,7 \pm 0,01	0,6 \pm 0,06	2,4 \pm 0,12
C18:3n3/C18:2n6	-	0,9 \pm 0,04	0,5 \pm 0,07	0,4 \pm 0,03	0,1 \pm 0,00

SFA – ácido graxo saturado; MUFA – ácido graxo monoinsaturado; PUFA – ácido graxo polinsaturado; n3 – série ômega 3; n6 – série ômega 6; n3/n6 – razão entre PUFAs da série n3 e n6; C18 – PUFA com 18 carbonos.

Por fim, como forma de verificar se as porcentagens de lipídios totais das dietas experimentais se mantiveram, foi realizada a análise gravimétrica das rações após a inclusão dos óleos, se mantendo dentro de uma faixa de aproximadamente 7,8% a 10%, como utilizado em dietas comerciais e experimentais para o teleósteo do gênero *Astyanax* (Gonçalves *et al.*, 2014).

2. Delineamento experimental

As práticas experimentais aqui descritas foram desenvolvidas conforme aprovação do Comitê de Ética Animal da Universidade de São Paulo pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IBUSP (nº 367/2020). O experimento foi conduzido na Piscicultura da Barragem de Ponte Nova do DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica), localizada no município de Salesópolis, São Paulo, durante o verão (fevereiro/março).

A fim de evitar a influência da mobilização gonadal de FA que ocorre nas fêmeas durante o período reprodutivo (Gonçalves *et al.*, 2014), machos adultos de *P. fasciatus*, produzidos na própria Piscicultura mencionada acima, foram utilizados no experimento.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em tanques rede de 1 m³, com malha de 1 mm, instalados dentro de um tanque de concreto de 300 m, sendo cobertos com uma malha para evitar a predação. 300 peixes (9,6 ± 2,17 g) foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais em triplicata (15 tanques, sendo 20 animais por tanque), totalizando uma densidade de estocagem de 0,193 ± 0,01 kg/m³. Os animais foram mantidos nessa condição por 2 semanas para um ajuste pré-experimental, sendo alimentados com dieta comercial (SUPRA *Acqua Line*; Anexo II). Posteriormente, os animais foram alimentados 2x ao dia (às 9h e às 15h) por 8 semanas com as dietas experimentais descritas anteriormente (Figura 3). A quantidade de ração fornecida foi de 1 % da massa corpórea média encontrada nos tanques e o excesso de alimento foi retirado a fim de não comprometer a qualidade da água.

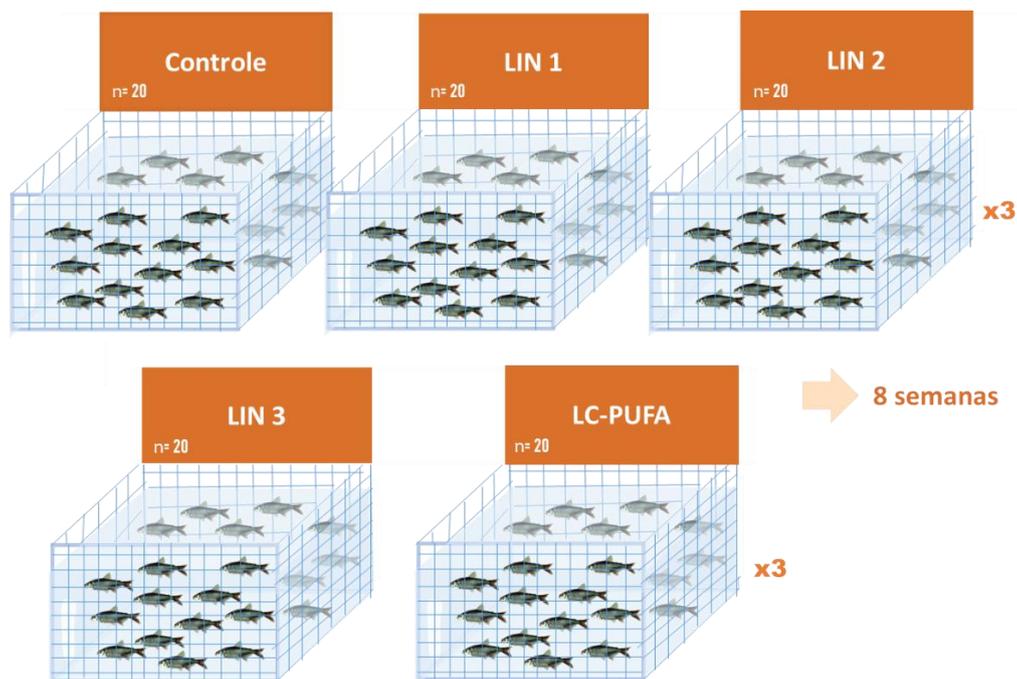


Figura 3. Descrição esquemática do desenho experimental proposto.

Parâmetros da qualidade da água como oxigênio dissolvido (manhã: $6,52 \pm 0,44$; tarde: $6,97 \pm 0,78$ mg/L) e temperatura (manhã: $26,46 \pm 1,34$; tarde: $27,73 \pm 1,19^\circ\text{C}$) foram mensurados diariamente através de um medidor multiparâmetros. Também foram mensurados o pH da água diariamente ($7,40 \pm 1,12$) e, 3 vezes por semana, o nitrato e a amônia (0 ppm durante todo o período do experimento) através de kits específicos para análise de água (Labcon),

3. Amostragem

No início ($n = 10$) e no final do experimento ($n = 8$ por tanque), os animais foram anestesiados com $0,1 \text{ g/L}^{-1}$ de benzocaína previamente solubilizada em 10 mL de etanol e os dados biométricos como massa corpórea total (MC), comprimento total (Ct) e massa das vísceras e do fígado (para obtenção dos índices viscerossomático - IVS - e hepatossomático - IHS; massa do tecido / massa corpórea $\times 100$) foram mensurados. Em seguida, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico e dissecados para a coleta de amostras biológicas, como: **1)** Músculo: Tecido envolvido no metabolismo lipídico, onde comumente ocorre acúmulo de lipídios, podendo, em sua maioria, refletir o perfil de FA da dieta (Gonçalves *et al.*, 2012); **2)** Fígado: relacionado ao metabolismo de lipídio, incluindo FA, e às respostas imunes, uma vez que alguns LC-PUFAs presentes nos fosfolipídios de membrana são

considerados precursores de eicosanoides (Nelson e Cox, 2019); **3) Rim:** Principal órgão envolvido na resposta imunológica de peixes (assim como o baço, que é extremamente pequeno na espécie em estudo, por isso não foi coletado) (Bjørngen e Koppang, 2021) e por fim; **4) Intestino** (região distal com a retirada máxima do conteúdo fecal): Tecido que apresenta contato direto com a alimentação, além de estar envolvido no sistema imunológico do organismo, sendo assim, utilizado com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória que poderia ser causada pelas diferentes dietas administradas (Roumbout *et al.*, 2011). Imediatamente após a coleta, os materiais biológicos foram armazenados no nitrogênio líquido e posteriormente mantidos em freezer -80°C até o processamento.

4. Processamento das amostras

4.1 Lipídios totais

Os lipídios totais das amostras úmidas do músculo, fígado e rim foram extraídos com clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) (Folch *et al.*, 1957), adaptado para organismos aquáticos (Parrish *et al.*, 1999). Os extratos lipídicos muscular e hepático foram quantificados pelo método colorimétrico de Frings *et al.*, (1972), utilizando uma curva padrão de óleo de fígado de bacalhau.

4.2 Perfil de FA

Para a análise do perfil de FA foram utilizadas amostras do músculo, fígado e rim. Para análise da composição de ácidos graxos dos fosfolipídios hepáticos, o extrato lipídico do fígado foi separado em fração neutra (triacilgliceróis) e polar (fosfolipídios) usando uma coluna de sílica ativada (Yang, 1995). Devido ao baixo teor lipídico do rim, o mesmo não foi separado, tendo a análise do perfil de FA total do tecido.

O extrato lipídico total das amostras de músculo e rim e a fração polar do fígado foram metilados, após a adição do padrão interno ácido tricosanoico (23:0), com cloreto de acetila (5 % de HCL em metanol), convertidos em metil ésteres de ácidos graxos (FAME) e identificados por cromatografia gasosa (CG; modelo 3900, Walnut Creek, CA, USA) acoplada a um ionizador de chama (FID) e auto injetor.

Os FAs do fígado foram analisados utilizando uma coluna capilar CP Wax 52 CB, 0.25 µm de espessura, 0.25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento, utilizando o hidrogênio como carreador a uma velocidade linear de 22 cms⁻¹. A

temperatura foi estabelecida da seguinte forma: 170 °C durante 1 minuto, seguido de uma rampa de 2.5 °C minuto⁻¹ até 240 °C, e um tempo de espera final de 5 minutos, totalizando 31 minutos de corrida. No detector, a temperatura foi mantida a 250 °C e no FID à 260 °C. Os FAMES foram identificados através da sua comparação com os tempos de retenção dos padrões comerciais (Supelco, *37 components*, Sigma-Aldrich; *Mixtures*, Me95, Me100, BR3 e BR4, Larodan). Os dados foram apresentados em microgramas por grama (µg/g), baseado na análise da área do pico do padrão interno, sendo a fórmula utilizada: µg/g = concentração do padrão interno x porcentagem de ácido graxo / porcentagem do padrão interno.

4.3 Expressão gênica

4.3.1 Extração e normalização de RNA total

Para extração do RNA, amostras de fígado e rim foram homogeneizadas com Trizol (Invitrogen®) e *beads* magnéticas, utilizando o homogeneizador *Precellys*, de acordo com especificações do fabricante. A quantificação do RNA total foi mensurada no *NanoDrop Spectrophotometer*, sendo utilizadas apenas amostras com a razão Abs260/Abs280 maiores que 1.8. As amostras foram padronizadas com 500 ng/µL para o fígado e 170 ng/µL para o rim e diluídas em água ultrapura para posterior síntese do cDNA.

4.3.2 Síntese de cDNA

Foi utilizado como molde de RNA para o processo de transcrição reversa, 1 µg de RNA do fígado e 1,7 µg de RNA do rim. Para isto foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* seguindo as normas do fabricante.

4.3.3 Extração e Purificação de DNA

Bandas específicas e únicas, provenientes do produto da PCR, foram recortadas do gel de eletroforese e passaram por um processo de extração e purificação de DNA, utilizando o kit *MinElute Gel Extraction* (Qiagen), conforme informações do fabricante. Posteriormente as amostras foram destinadas ao sequenciamento no Genoma IB-USP, para obtenção da sequência de DNA e consequente síntese de primers específicos para a espécie em estudo (*P. fasciatus*) como detalhado posteriormente.

4.3.4 Primers utilizados

A fim de avaliar o metabolismo de bioconversão de FA do fígado, primers para *elovl 2*, *5* e $\Delta 6$ *fad* foram desenhados com base nas informações do sequenciamento obtidas no transcriptoma do fígado do *Astyanax lacustris* (anteriormente classificado como *A. altiparanae*) e assim sequências específicas para *P. fasciatus* foram obtidas e confirmadas.

Para avaliar a expressão de genes relacionados à resposta imune no rim, primers para o componente 3 do sistema complemento – *c3* e interleucina 10 – *il10*, bem como genes de referência para o fígado e rim (*β -actina* e *ef1 α* – do inglês *elongation factor 1 α*) foram desenhados e testados com base nas informações do transcriptoma do rim de *P. fasciatus*. Todos os primers foram sintetizados pela Thermofisher S.A (Invitrogen TM) (Tabela 4).

Tabela 4. Primers sintetizados para *P. fasciatus*.

Primer	Sequências 5' → 3'
<i>elovl2_FW</i>	TGGGCCCATGCTGAACAGTTTCATC
<i>elovl2_RV</i>	CTGGATCAGTTGAGCTTGTGTGAGGTA
<i>elovl5_FW</i>	GCCAAGACACCCACAGCGCAG
<i>elovl5_RV</i>	TGGCGTGATGGTAGACGTGCAGG
$\Delta 6$ <i>fad_FW</i>	GCGCTGCTCTGGCATTFTGGCA
$\Delta 6$ <i>fad_RV</i>	CCACCAGTTTGCTGAGGCACCCT
<i>c3_FW</i>	GAGCAGGTGGTTCTGGGAAAGGTG
<i>c3_RV</i>	CGAGCACAGAGCGCCGTC AAT
<i>il10_FW</i>	TAGGGCAGTGGTGGCTCAGTGGT
<i>il10_RV</i>	CCTCCACTGTAGCACCTGGGG
<i>β-actina_FW</i>	ATGAGCTGACTGACGGGCAGGTCA
<i>β-actina_RV</i>	TACCACCAGACAATAGAGTGTGGCATA C
<i>ef1α_FW</i>	CGTCGTGGTAACGTGGCTGGAG
<i>ef1α_RV</i>	GGTGTAGCCCTGAGAGATCTGACC

FW – Forward; RV – Reverse.

Foi realizado uma PCR convencional para amplificar produtos específicos do DNA com os primers para os genes citados acima, usando *Top Taq MasterMix* (200403-Qiagen): desnaturação inicial a 95 ° C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 30 s, anelamento a 60 ° C por 30 s, e extensão a 72 ° C por 1 min, seguido por 10 min para a extensão final.

Os produtos de PCR amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose de 1,5 % contendo SYBR Safe DNA Gel Stain (S33102 - Invitrogen TM) em tampões Tris-Acetato-EDTA (TAE) (AM9869 - Invitrogen TM) a fim de avaliar se

houve ligação e com isso, especificidade. As bandas específicas aos genes foram observadas por excitação com luz UV.

4.3.5 PCR em tempo real

A análise de PCR em tempo real foi realizada utilizando *SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*), 0,4 μL de primer (*forward* e *reverse*). A reação foi incubada por 2 min em 50 °C, 10 min em 95 °C, seguido por quarenta ciclos de 15 s em 95 °C e 40 s em 60 °C. Ao final destes ciclos, foi realizada a análise da *melt curve* para testar a especificidade da reação. A reação foi realizada em duplicata em *StepOne* (*Applied Biosystems*). O *efl α* foi utilizado como referência endógena para a análise da expressão relativa dos genes do fígado, enquanto a *β -actina* e *efl α* foi utilizado como referência para análise dos genes do rim.

4.4 Quantificação de prostaglandina PGE2

A quantificação de prostaglandina PGE2 do fígado foi realizada utilizando o kit *Prostaglandin E₂ - ELISA - Monoclonal* (*Cayman Chemical*), conforme especificação do fabricante. As amostras foram diluídas em 10 e 50 x, dependendo da sua concentração. Os dados foram expressos em ng/mL^{-1} .

4.5 Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) do intestino foi analisada com base na redução do citocromo c provida pelo ânion superóxido derivado do sistema xantina e xantina oxidase, conforme descrito por McCord e Fridovich (1969). A dosagem de proteína para normalização dos dados foi realizada utilizando o kit de *Comassie Blue* de acordo com as especificações do fabricante.

5. Análise dos dados

Tanto os resultados referentes as variáveis metabólicas quanto imunológicas, foram apresentados como média \pm desvio padrão da média e analisados previamente pelo teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. A comparação entre os diferentes grupos experimentais (dieta como fator) foi realizada por meio do teste estatístico *One-way ANOVA* ($P < 0,05$), seguido pelo teste post-hoc *Holm-Sidak* ou *Dunn's*. Correlações de Pearson foram utilizadas para avaliar a relação entre a concentração de PUFA C18 e LC-PUFAs como EPA, DHA e ARA, bem como a relação do perfil de

LC-PUFA das membranas do hepatócito e a concentração de PGE₂ presente no fígado. Em todos os casos, os valores foram considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico *Sigma Stat 3.5* para *Windows* (*Systat Software, Inc., USA*), com exceção da correlação de Pearson, que foi realizada no programa *Graph Pad Prism 8* (*GraphPad Software, San Diego, California, USA*), sendo os dados considerados verdadeiramente correlacionado quando $P < 0,05$ (*two tailed*), podendo indicar, de acordo com Cohen (1988), uma correlação fraca quando o coeficiente de *Pearson* varia entre 0,10 a 0,29, moderada entre 0,30 a 0,49 e forte entre 0,50 a 1.

Resultados

1. Dados biométricos

Não houve variação na MC total, Ct e IHS entre os animais dos diferentes grupos tratados ao final do experimento ($P>0,05$) (Tabela 5). O valor de IVS foi maior nos animais alimentados com a dieta Controle em relação ao grupo alimentado com a dieta LIN 2 ($P=0,019$; Tabela 5).

Tabela 5. Dados biométricos dos animais após o período de tratamento com as diferentes dietas experimentais. Massa corpórea (MC), comprimento total (Ct), índice viscerossomático (IVS) e índice hepatossomático (IHS) (Média \pm Desvio Padrão da Média).

Dieta	<i>n</i>	MC total (g)	Ct (cm)	IVS (%)	IHS (%)
Controle	24	10,0 \pm 1,49	9,2 \pm 0,51	6,7 \pm 1,07 ^a	0,8 \pm 0,18
LIN 1	24	9,6 \pm 1,51	9,1 \pm 0,41	6,3 \pm 1,44 ^{ab}	0,7 \pm 0,16
LIN 2	24	9,0 \pm 1,57	9,0 \pm 0,56	5,5 \pm 1,17 ^b	0,7 \pm 0,14
LIN 3	24	9,0 \pm 1,32	9,1 \pm 0,44	5,8 \pm 1,09 ^{ab}	1,0 \pm 1,26
LC-PUFA	24	9,3 \pm 1,41	8,9 \pm 0,55	6,3 \pm 1,65 ^{ab}	0,7 \pm 0,25
Total	120	9,4 \pm 1,48	9,1 \pm 0,49	6,1 \pm 1,35	0,8 \pm 0,59

Análise estatística *One Way* ANOVA $P<0,05$. As letras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

2. Variáveis metabólicas

2.1 Lipídios totais

As concentrações de lipídios totais do músculo e fígado não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (Figura 4).

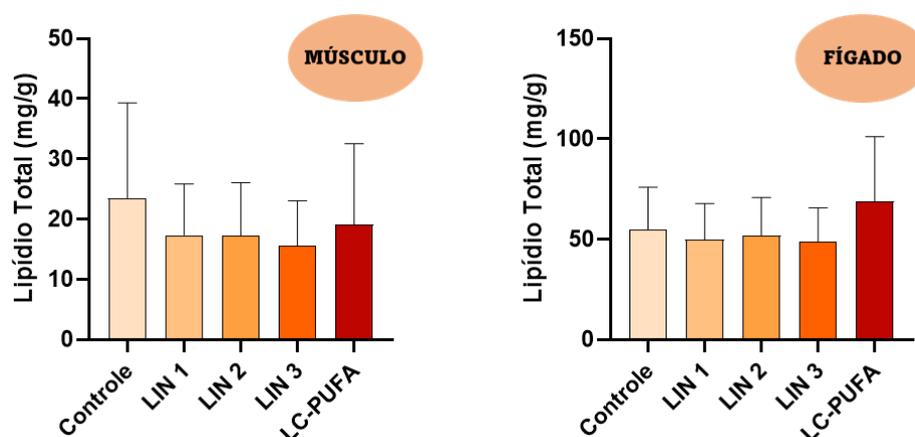


Figura 4. Lipídios totais (mg/g) do músculo e fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas com Controle ($n=24$ /músculo; $n=12$ /fígado), LIN 1 ($n=24$ /músculo; $n=10$ /fígado), LIN 2 ($n=24$ /músculo; $n=12$ /fígado), LIN 3 ($n=24$ /músculo; $n=12$ /fígado) e LC-PUFA ($n=23$ /músculo; $n=10$ /fígado) (Média \pm Desvio Padrão da Média). Análise estatística *One Way ANOVA* $P < 0,05$.

2.2. Perfil de ácidos graxos ($\mu\text{g/g}$)

As análises do perfil de ácidos graxos são normalmente apresentadas na literatura em porcentagem (%). No entanto, a análise da concentração dos ácidos graxos ($\mu\text{g/g}$) vem sendo muito utilizada, pois representa os valores absolutos destes compostos. Este cálculo foi realizado nas amostras de músculo, fígado e rim dos animais da coleta final, ou sejam aqueles alimentados com as dietas experimentais (Tabelas 6-8), como descrito abaixo.

Levando em consideração os resultados obtidos dos animais tratados com as dietas experimentais, foi possível observar no músculo uma maior concentração de SFA e MUFA nos animais alimentados com a dieta Controle quando comparado aos alimentados com a dieta LC-PUFA ($P=0,015$ e $P=0,038$, respectivamente; Tabela 6 e Figura 5). Os FA C16:0 e C18:1n9 foram os principais responsáveis por essas diferenças ($P=0,018$ e $P=0,025$, respectivamente; Tabela 6).

O músculo dos animais tratados com a dieta LIN 3 apresentou uma maior concentração de C18:2n6 quando comparado ao grupo LC-PUFA ($P=0,035$). O EPA apresentou uma maior concentração no grupo LC-PUFA quando comparado aos grupos LIN 1 e LIN 3 ($P < 0,001$), enquanto o DHA se mostrou maior no LIN 2 e menor no LIN 1 e LC-PUFA ($P=0,004$; Tabela 6, Figura 5).

Os ácidos graxos C20:2n6 e o C20:3n6 apresentaram uma menor concentração no grupo LC-PUFA comparado aos tratamentos Controle, LIN 2 e LIN 3 ($P < 0,001$ em ambos) e o C22:5n6 uma menor concentração no LC-PUFA e LIN 1

comparado aos demais tratamentos ($P < 0,001$; Tabela 6). O ARA foi maior no LIN 2 comparado ao grupo LIN 1 ($P = 0,001$). Por fim, as somatórias de PUFAs n3 e n6 apresentaram uma maior concentração no grupo LIN 2, quando comparado com o LIN 1 ($P = 0,024$) e LC-PUFA ($P = 0,019$) respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos totais ($\mu\text{g/g}$) do músculo de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média \pm Desvio Padrão da Média).

FA ($\mu\text{g/g}$)	Controle	LIN 1	LIN 2	LIN 3	LC-PUFA
	$n=23$	$n=22$	$n=20$	$n=21$	$n=19$
C12:0	82,7 \pm 67,37	-	-	-	-
C14:0	128,2 \pm 96,42 ^a	39,7 \pm 27,14 ^b	60,1 \pm 45,02 ^{ab}	39,2 \pm 20,09 ^b	52,1 \pm 59,59 ^b
C16:0	1567,1 \pm 832,66 ^a	996,1 \pm 539,83 ^{ab}	1289,5 \pm 712,70 ^{ab}	983,9 \pm 328,61 ^{ab}	1065,1 \pm 936,99 ^b
C18:0	654,4 \pm 333,56	463,3 \pm 260,77	565,9 \pm 303,21	420,3 \pm 167,76	456,3 \pm 375,27
Σ SFA	2404,8 \pm 1287,68^{4a}	1499,2 \pm 824,84^{ab}	1825,7 \pm 1110,88^{ab}	1380,7 \pm 568,59^{ab}	1573,4 \pm 1366,19^{4b}
C16:1n7	180,3 \pm 126,30	114,5 \pm 89,72	134,1 \pm 109,38	90,9 \pm 41,78	132,7 \pm 158,11
C18:1n9	2727,0 \pm 1931,58 ^a	1622,5 \pm 1316,83 ^{ab}	1987,4 \pm 1657,51 ^{ab}	1354,6 \pm 740,44 ^{ab}	1797,8 \pm 2162,59 ^b
C18:1n7	171,9 \pm 94,60	313,1 \pm 922,95	152,0 \pm 93,20	118,0 \pm 38,62	126,4 \pm 110,42
C20:1n9	81,9 \pm 56,16	55,4 \pm 40,82	62,6 \pm 49,46	46,4 \pm 22,71	55,7 \pm 54,99
Σ MUFA	3161,1 \pm 2200,56^a	2105,4 \pm 1606,58^{ab}	2132,9 \pm 1938,39^{ab}	1539,9 \pm 884,40^{ab}	2006,9 \pm 2453,87^b
C18:3n3	66,6 \pm 30,31	75,9 \pm 35,41	91,7 \pm 69,04	81,2 \pm 52,21	53,3 \pm 47,21
C18:2n6	492,5 \pm 358,86 ^{ab}	446,8 \pm 315,12 ^{ab}	535,7 \pm 387,38 ^{ab}	472,2 \pm 201,16 ^a	399,7 \pm 458,2 ^b
C20:5n3	62,9 \pm 29,92 ^{ab}	40,7 \pm 12,02 ^b	58,9 \pm 18,10 ^{ab}	53,2 \pm 23,80 ^b	102,7 \pm 54,4 ^a
C22:5n3	36,6 \pm 16,78	24,8 \pm 7,49	34,3 \pm 5,72	34,7 \pm 14,49	36,1 \pm 16,34
C22:6n3	509,5 \pm 262,24 ^{ab}	392,8 \pm 132,83 ^b	579,8 \pm 171,10 ^a	522,4 \pm 149,50 ^{ab}	430,5 \pm 180,89 ^b
C20:2n6	42,8 \pm 22,66 ^a	30,0 \pm 11,83 ^{ab}	41,3 \pm 18,86 ^a	36,5 \pm 10,77 ^a	19,9 \pm 11,68 ^b
C20:3n6	42,5 \pm 22,24 ^a	29,4 \pm 8,73 ^{ab}	43,8 \pm 16,67 ^a	40,3 \pm 11,90 ^a	19,3 \pm 6,68 ^b
C20:4n6	196,6 \pm 85,32 ^{ab}	130,2 \pm 38,38 ^b	196,5 \pm 46,25 ^a	180,3 \pm 66,14 ^{ab}	161,0 \pm 74,08 ^{ab}
C22:5n6	65,7 \pm 31,97 ^a	41,6 \pm 16,91 ^b	64,2 \pm 17,04 ^a	57,7 \pm 15,38 ^a	38,2 \pm 11,56 ^b
Σ PUFA	1398,5 \pm 629,12	1191,1 \pm 405,24	1629,2 \pm 661,43	1465,8 \pm 502,90	1166,7 \pm 662,35
Σ PUFA n3	597,1 \pm 307,27^{ab}	524,4 \pm 161,18^b	747,7 \pm 244,56^a	678,8 \pm 235,90^{ab}	571,1 \pm 260,28^{ab}
Σ PUFA n6	801,4 \pm 418,79^{ab}	666,7 \pm 319,64^{ab}	881,5 \pm 460,62^a	787,0 \pm 288,43^{ab}	595,6 \pm 486,40^b
n3/n6	0,8 \pm 0,35	0,9 \pm 0,29	0,9 \pm 0,26	0,9 \pm 0,15	1,2 \pm 0,59

SFA – ácido graxo saturado; MUFA – ácido graxo monoinsaturado; PUFA – ácido graxo polinsaturado; n3 – série ômega 3; n6 – série ômega 6; n3/n6 – razão entre PUFAs da série n3 e n6. As letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. Análise estatística *One Way* ANOVA $P < 0,05$.

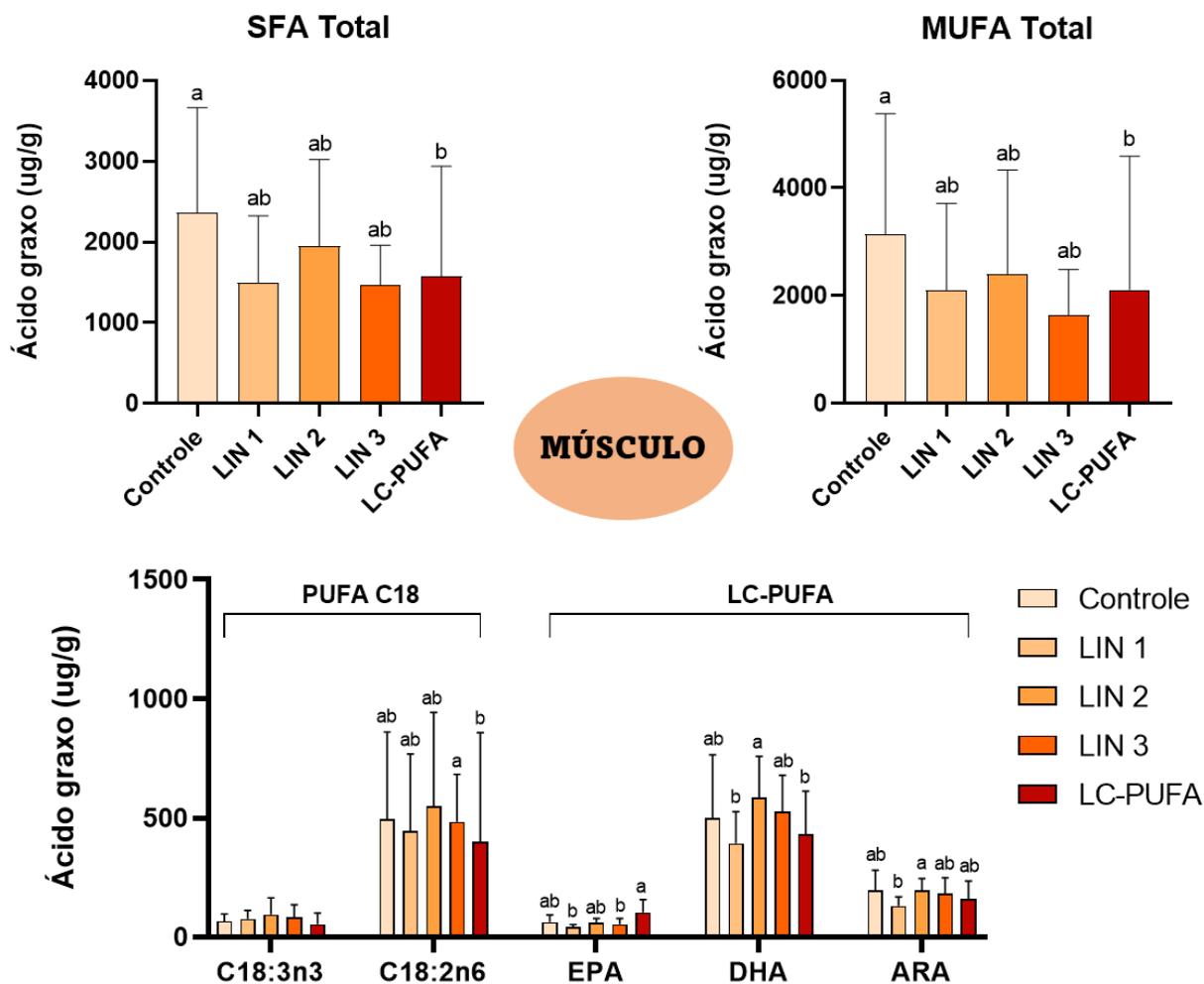


Figura 5. Perfil de ácidos graxos totais ($\mu\text{g/g}$) do músculo de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média \pm Desvio Padrão da Média). As letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos Análise estatística *One Way* ANOVA $P < 0,05$.

Com base no perfil de ácidos graxos obtido, foram feitas correlações entre os principais PUFA C18, como o C18:3n3 e C18:2n6, e os LC-PUFAs EPA, DHA e ARA, sendo considerada significativa o valor $P < 0,05$ (Figura 6). Neste sentido, não foi possível observar nenhuma correlação entre as concentrações de C18:3n3 e EPA ($P = 0,2006$; Figura 6A). Por outro lado, tanto o C18:3n3/DHA quanto C18:2n6/ARA apresentaram uma correlação positiva moderada ($P = 0,0002$ e $P = 0,0001$, respectivamente; Figura 6B e C). Por fim, a relação entre o C18:2n6 e o DHA apresentou uma correlação positiva fraca ($P = 0,0019$; Figura 6D).

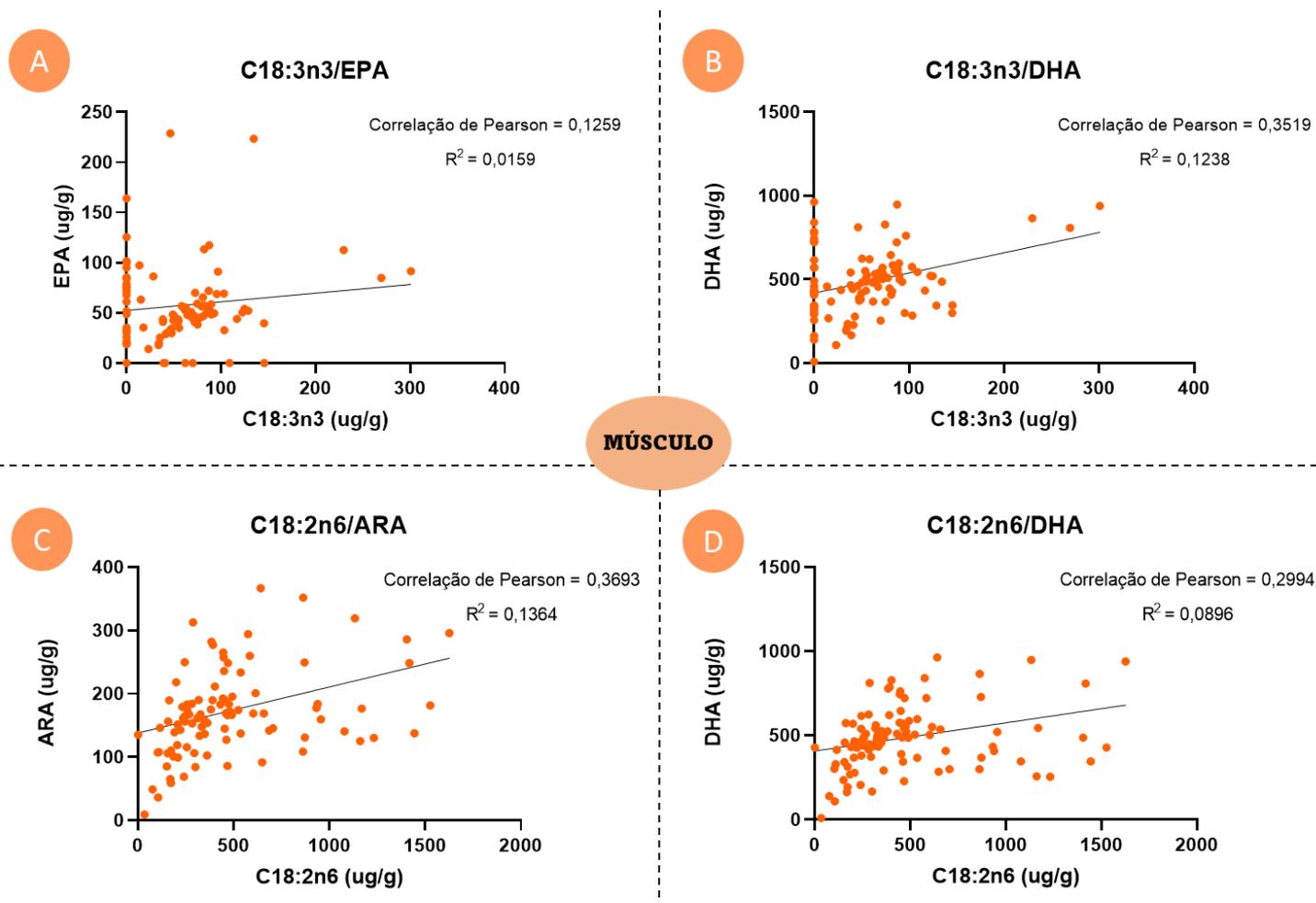


Figura 6. Correlação de Pearson entre FA com 18C e LC-PUFA do músculo de *P. fasciatus* (n=105) alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média \pm Desvio Padrão da Média).

Na fração polar do fígado não foram observadas diferenças estatísticas na concentração de SFA e MUFA. Da mesma forma, o C18:3n3 não apresentou diferença entre os tratamentos, contudo o C18:2n6 se mostrou elevado no LIN 3 quando comparado às dietas Controle e LC-PUFA ($P < 0,001$; Tabela 7 e Figura 7).

Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre o EPA e ARA nos diferentes tratamentos, o DHA se mostrou elevado no LIN 3 quando comparado ao grupo LC-PUFA ($P = 0,046$). O C22:5n3 se mostrou elevado em todos com tratamentos quando comparado com o LIN 2 ($P < 0,001$). Por outro lado, o FA C20:2n6 foi maior no grupo Controle quando comparado ao LIN 1 e LC-PUFA ($P = 0,004$) e menor no grupo LC-PUFA comparado ao LIN 3. O C20:3n6 foi menor no LC-PUFA quando comprado aos demais grupos ($P < 0,001$; Tabela 7).

As somatórias de PUFA total, PUFA n3 e PUFA n6, no geral, foram maiores no grupo LIN 3 (e LIN 2 no caso do PUFA n6) em comparação ao LC-PUFA (P=0,002, P=0,046 e P<0,001, respectivamente).

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos ($\mu\text{g/g}$) da fração polar do fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média \pm Desvio Padrão da Média).

FA ($\mu\text{g/g}$)	Controle	LIN 1	LIN 2	LIN 3	LC-PUFA
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=10
C17:0	11,1 \pm 1,48	11,7 \pm 2,59	12,6 \pm 3,20	12,5 \pm 2,77	10,1 \pm 3,01
Σ OFA	10,1 \pm 3,62	11,7 \pm 2,59	12,6 \pm 3,20	12,5 \pm 2,77	10,1 \pm 3,01
C14:0	9,3 \pm 3,84 ^{ab}	8,1 \pm 2,64 ^{ab}	8,2 \pm 2,83 ^{ab}	7,8 \pm 3,27 ^b	9,5 \pm 6,12 ^a
C16:0	195,0 \pm 59,53	163,2 \pm 44,09	166,1 \pm 57,18	185,2 \pm 66,84	209,8 \pm 85,08
C18:0	215,3 \pm 46,02	209,0 \pm 50,49	205,4 \pm 33,54	235,4 \pm 79,72	226,9 \pm 82,02
Σ SFA	417,3 \pm 101,54	377,6 \pm 86,53	376,3 \pm 87,63	427,1 \pm 146,2	444,3 \pm 169,35
C16:1n7	16,7 \pm 5,30	15,1 \pm 2,63	14,8 \pm 5,55	17,0 \pm 8,48	17,6 \pm 6,13
C18:1n9	359,9 \pm 116,58	284,8 \pm 56,76	251,6 \pm 65,66	320,6 \pm 172,91	301,7 \pm 103,59
C18:1n7	16,5 \pm 5,61	15,4 \pm 3,16	15,8 \pm 4,71	19,3 \pm 9,12	17,9 \pm 5,65
C20:1n9	22,6 \pm 8,45	17,9 \pm 7,34	19,6 \pm 4,90	20,0 \pm 10,36	19,2 \pm 5,46
Σ MUFA	415,7 \pm 131,78	333,1 \pm 62,44	301,8 \pm 75,73	376,9 \pm 199,79	362,9 \pm 121,66
C18:3n3	-	19,7 \pm 5,63	13,7 \pm 4,22	20,0 \pm 10,50	-
C18:2n6	47,2 \pm 15,79 ^b	71,0 \pm 15,52 ^{ab}	70,1 \pm 16,35 ^{ab}	120,9 \pm 51,96 ^a	28,3 \pm 9,87 ^c
C20:5n3	18,3 \pm 8,32	20,1 \pm 6,43	16,8 \pm 6,57	22,0 \pm 13,33	18,5 \pm 9,71
C22:5n3	8,2 \pm 2,94 ^a	8,0 \pm 1,57 ^a	7,5 \pm 1,46 ^b	9,3 \pm 5,41 ^a	8,6 \pm 2,87 ^a
C22:6n3	175,3 \pm 108,96 ^{ab}	140,9 \pm 51,24 ^{ab}	150,3 \pm 66,16 ^{ab}	207,7 \pm 114,22 ^a	95,8 \pm 61,61 ^b
C20:2n6	26,3 \pm 9,68 ^a	15,1 \pm 3,61 ^{bc}	17,1 \pm 4,67 ^{abc}	22,2 \pm 10,79 ^{ab}	7,3 \pm 2,32 ^c
C20:3n6	28,8 \pm 12,15 ^a	25,7 \pm 6,05 ^a	28,2 \pm 6,96 ^a	43,4 \pm 19,18 ^a	10,3 \pm 3,96 ^b
C20:4n6	83,4 \pm 43,52	69,6 \pm 22,64	78,2 \pm 23,12	105,7 \pm 53,93	64,1 \pm 29,10
C22:5n6	24,5 \pm 11,61 ^a	14,6 \pm 4,64 ^{ab}	17,8 \pm 6,88 ^{ab}	22,7 \pm 12,70 ^{ab}	9,9 \pm 4,58 ^b
Σ PUFA	396,0 \pm 214,73^{ab}	382,3 \pm 104,34^{ab}	394,4 \pm 125,25^{ab}	573,2 \pm 277,97^a	230,5 \pm 118,56^b
Σ PUFA n3	194,7 \pm 122,03^{ab}	187,4 \pm 62,49^{ab}	185,9 \pm 76,59^{ab}	258,3 \pm 140,64^a	119,4 \pm 75,40^b
Σ PUFA n6	201,3 \pm 94,93^{ab}	194,9 \pm 47,44^{ab}	208,5 \pm 51,63^a	315,0 \pm 140,82^a	111 \pm 45,64^b
n3/n6	0,9 \pm 0,28	1,0 \pm 0,21	0,9 \pm 0,20	0,8 \pm 0,15	1,0 \pm 0,34

SFA – ácido graxo saturado; MUFA – ácido graxo monoinsaturado; PUFA – ácido graxo polinsaturado; n3 – série ômega 3; n6 – série ômega 6; n3/n6 – razão entre PUFAs da série n3 e n6. As letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. Análise estatística *One Way* ANOVA P<0,05.

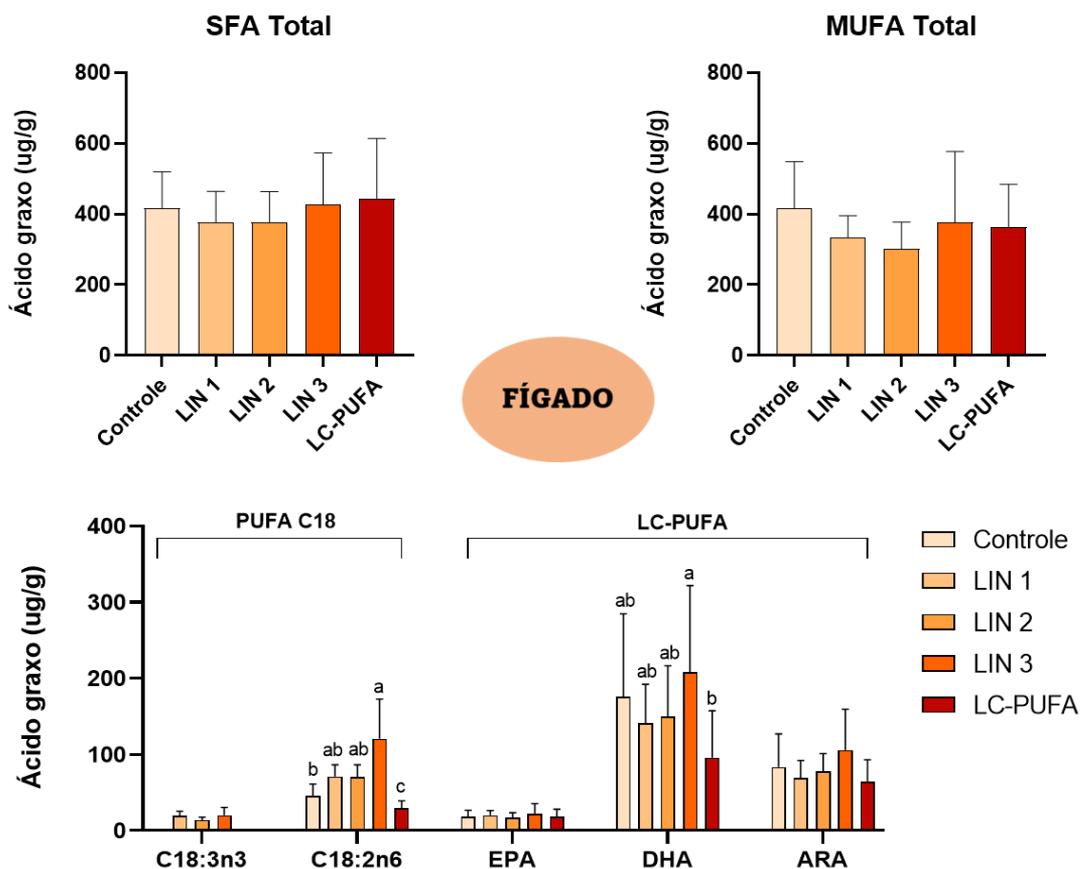


Figura 7. Perfil de ácidos graxos totais ($\mu\text{g/g}$) do SFA e MUFA total, bem como dos PUFA C18 e LC-PUFA mais importantes da fração polar do fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média \pm Desvio Padrão da Média). As letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Análise estatística *One Way ANOVA* $P < 0,05$.

A análise da correlação de Pearson entre os FAs da fração polar do fígado, se mostrou positiva moderada entre o PUFA C18 da série n3 e o EPA ($P=0,0005$) e DHA ($P=0,0016$; Figura 8A e B), bem como uma correlação positiva forte entre o PUFA C18 da série n6 e o ARA e DHA ($P < 0,0001$, em ambos os casos; Figura 8C e D).

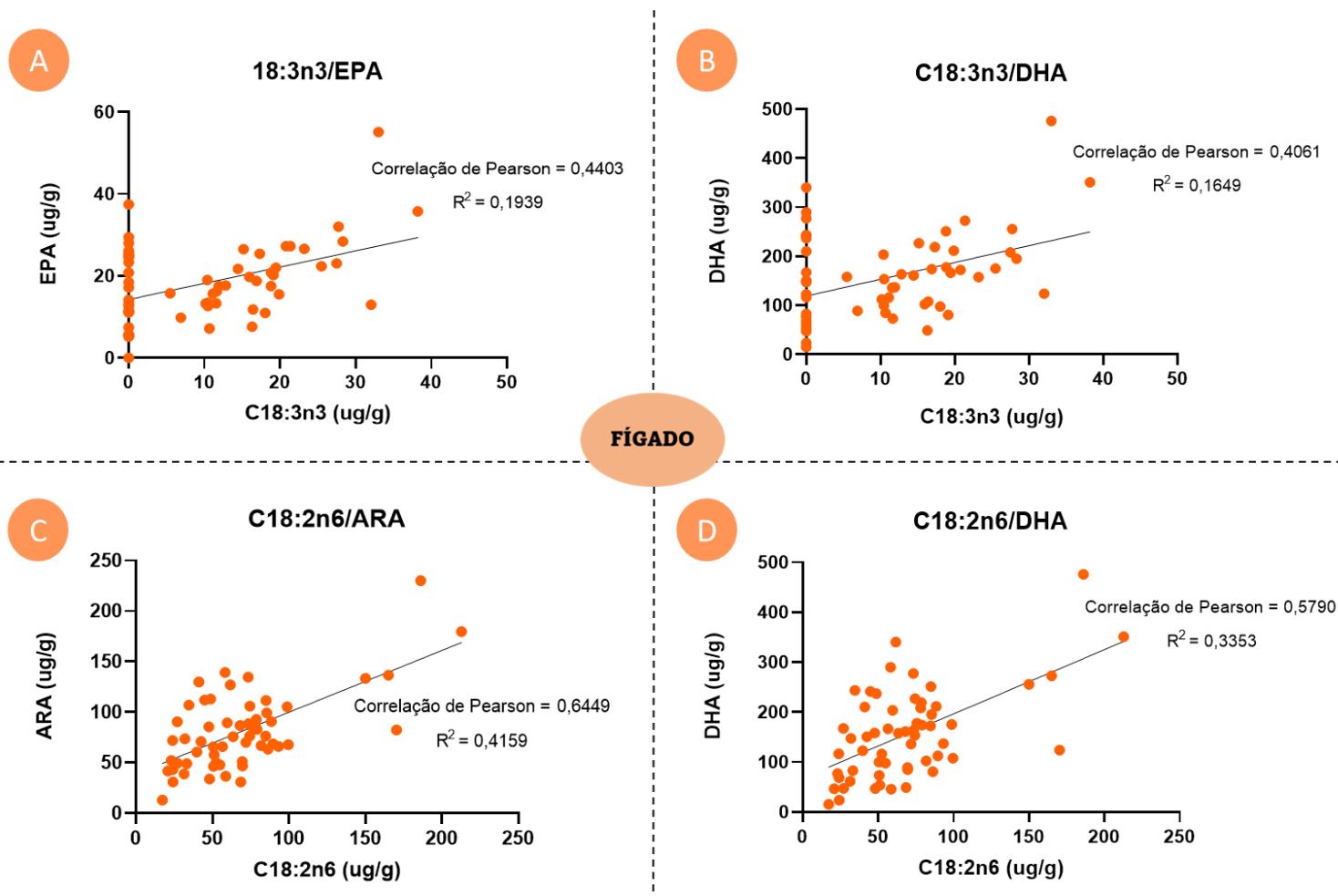


Figura 8. Correlação de Pearson entre FA com 18C e LC-PUFA do fígado de *P. fasciatus* ($n=58$) alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média \pm Desvio Padrão da Média).

Por fim, no perfil de ácidos graxos do rim dos peixes alimentados com as dietas experimentais não foi observado grandes alterações, com exceção do C12:0, que se apresentou elevado nos animais alimentados com a dieta Controle comparado ao grupo LIN 3 ($P=0,030$: Tabela 8, Figura 9).

Tabela 8. Perfil de ácidos graxos totais (ug/g) do rim de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média ± Desvio Padrão da Média).

FA (ug/g)	Controle	LIN 1	LIN 2	LIN 3	LC-PUFA
	n=8	n=7	n=9	n=9	n=8
C15:0	-	88,8 ± 28,54	80,3 ± 58,63	113 ± 0,10	-
Σ OFA	-	88,8 ± 28,54	80,3 ± 58,63	113 ± 0,10	-
C12:0	451,5 ± 372,88 ^a	143,5 ± 67,13 ^{ab}	175,5 ± 136,06 ^{ab}	101,8 ± 0,1 ^b	125,2 ± 127,23 ^{ab}
C14:0	488,7 ± 354,37	240,3 ± 135,83	220,5 ± 144,72	183,4 ± 0,15	242,0 ± 224,92
C16:0	2941,8 ± 2020,62	2787,6 ± 1427,45	2157,8 ± 1300,23	2394,6 ± 1,72	2771,5 ± 2446,14
C18:0	1211,1 ± 882,70	1210,6 ± 577,54	948,1 ± 641,32	1175,6 ± 0,76	1164,3 ± 922,49
Σ SFA	5093,1 ± 3573,05	4361,5 ± 2210,62	3482,4 ± 2183,35	3713,4 ± 2,75	4302,9 ± 3688,94
C16:1n7	454,7 ± 322,42	467,8 ± 255,37	329,7 ± 196,44	349,3 ± 0,25	461,6 ± 407,63
C18:1n9	6176,9 ± 4739,68	6225,0 ± 3307,29	4308,7 ± 2834,54	4798,3 ± 3,89	5640,2 ± 4846,81
C18:1n7	277,2 ± 175,48	344,9 ± 173,93	236,5 ± 140,42	266,7 ± 0,18	314,9 ± 262,59
C20:1n9	200,3 ± 144,90	220,4 ± 120,49	155,4 ± 99,40	162,8 ± 0,12	196,6 ± 175,49
Σ MUFA	7109,2 ± 5374,73	7258,0 ± 3846,78	5030,3 ± 3261,99	5577,0 ± 4,43	6613,3 ± 5678,32
C18:3n3	-	174,5 ± 104,34	185,1 ± 131,17	135,8 ± 0,11	-
C18:2n6	807,5 ± 715,01	983,4 ± 656,31	688,5 ± 687,07	898,7 ± 0,71	733,5 ± 657,79
C20:5n3	-	-	-	61,6 ± 0,02	-
C22:6n3	-	-	-	-	93,5 ± 29,17
Σ PUFA	879,2 ± 882,35	1133,0 ± 770,00	807,2 ± 882,05	1048,8 ± 904,13	780,8 ± 645,00
Σ PUFA n3	43,0 ± 121,73	149,6 ± 115,85	106,7 ± 188,34	119,9 ± 210,99	36,0 ± 76,74
Σ PUFA n6	836,2 ± 779,90	983,4 ± 656,31	700,4 ± 709,23	928,9 ± 743,18	744,8 ± 651,97
n3/n6	0,0 ± 0,05	0,1 ± 0,06	0,1 ± 0,10	93,1 ± 105,32	0,1 ± 0,15

SFA – ácido graxo saturado; MUFA – ácido graxo monoinsaturado; PUFA – ácido graxo polinsaturado; n3 – série ômega 3; n6 – série ômega 6; n3/n6 – razão entre PUFAs da série n3 e n6. As letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. Análise estatística *One Way* ANOVA P<0,05.

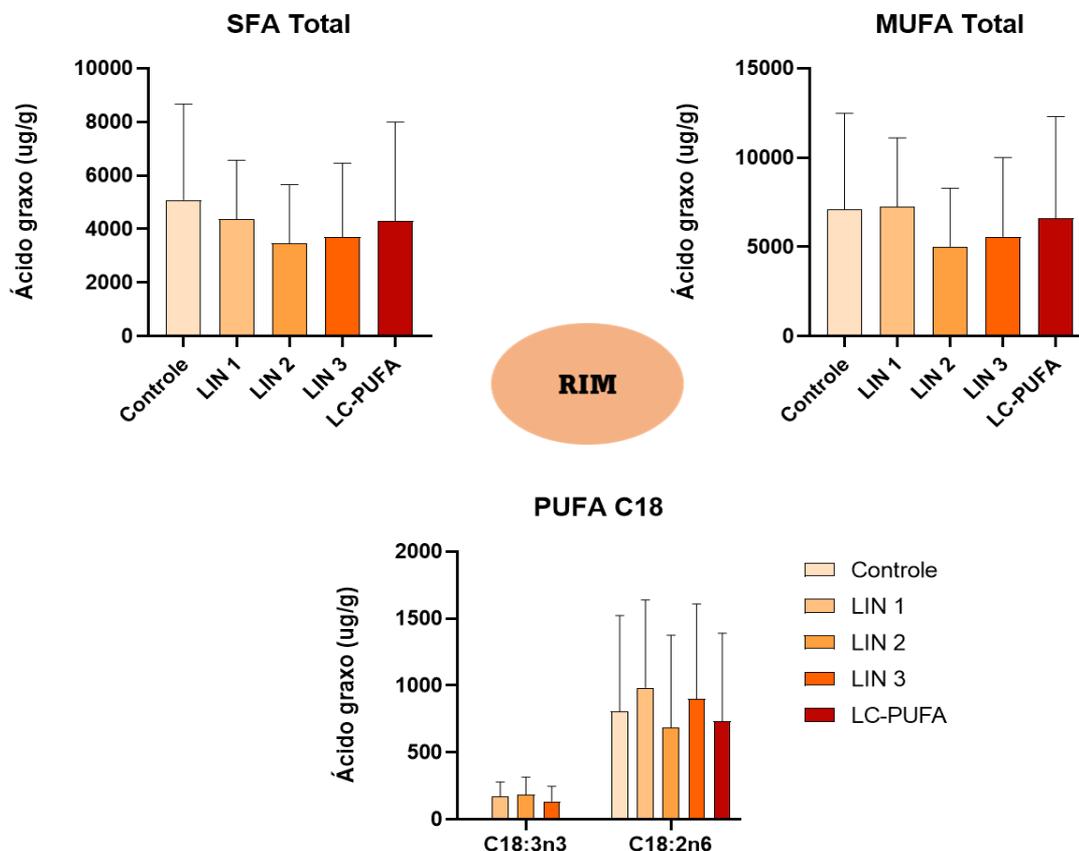


Figura 9. Perfil de ácidos graxos totais (µg/g) do SFA e MUFA total, bem como dos PUFA C18 e LC-PUFA mais importantes do rim de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle, LIN 1, LIN 2, LIN 3 e LC-PUFA (Média ± Desvio Padrão da Média). As letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Análise estatística *One Way ANOVA* $P < 0,05$.

2.3 Expressão gênica

Os resultados obtidos mostraram que o gene da *elovl 5* se mostrou mais expresso no fígado do grupo alimentado com a dieta LIN 3 quando comparado ao grupo LIN 2 ($P=0,035$). Contudo, não houve nenhuma diferença estatística na expressão gênica da proteína *elovl 2*. Um padrão de resposta semelhante a *elovl 5* foi observado para a expressão da $\Delta 6$ *fad*, no entanto, provavelmente devido ao alto desvio padrão, não foi possível observar diferença estatística ($P=0,114$; Figura 10).

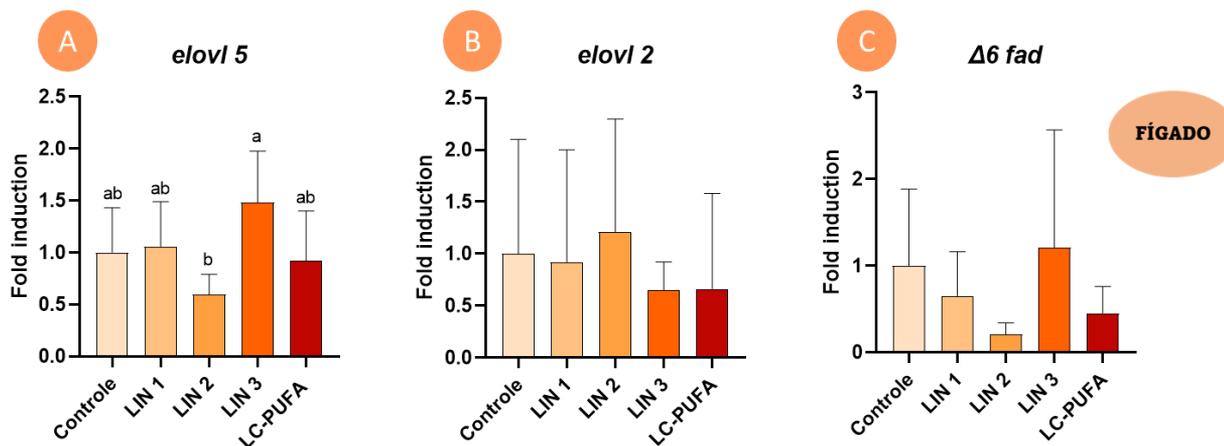


Figura 10. A) Expressão gênica da elongase (*elovl 2*) do fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=8$), LIN 1 ($n=7$), LIN 2 ($n=8$), LIN 3 ($n=7$) e LC-PUFA ($n=7$). B) Expressão gênica da *elovl 5* do fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=9$), LIN 1 ($n=8$), LIN 2 ($n=8$), LIN 3 ($n=9$) e LC-PUFA ($n=8$). C) Expressão gênica da $\Delta 6$ dessaturase ($\Delta 6$ *fad*) do fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=7$), LIN 1 ($n=8$), LIN 2 ($n=8$), LIN 3 ($n=8$) e LC-PUFA ($n=7$) (Média \pm Desvio Padrão da Média). As letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. Análise estatística *One Way* ANOVA.

3. Variáveis imunes

3.1 Prostaglandina PGE2 hepática

Não houve diferença estatística na concentração de PGE2 hepática após o tratamento com as dietas experimentais (Figura 11).

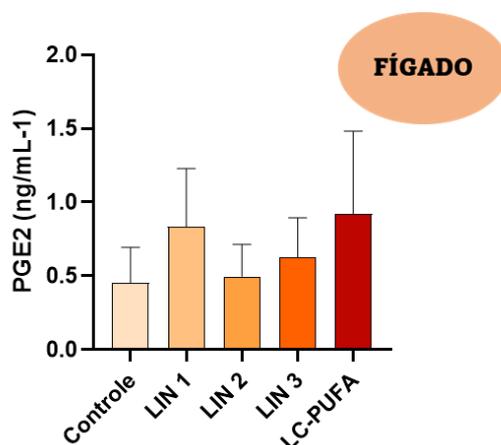


Figura 11. Concentração da prostaglandina E2 (PGE2, ng mL⁻¹) do fígado de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=8$), LIN 1 ($n=8$), LIN 2 ($n=6$), LIN 3 ($n=8$) e LC-PUFA ($n=9$) (Média \pm Desvio Padrão da Média; Análise estatística *One Way* ANOVA $P < 0,05$).

Além disso, também não foi observado nenhuma correlação direta entre os FAs EPA e ARA com a concentração de PGE2 citada anteriormente ($P=0,4171$ e $P=0,2747$ respectivamente; Figura 12).

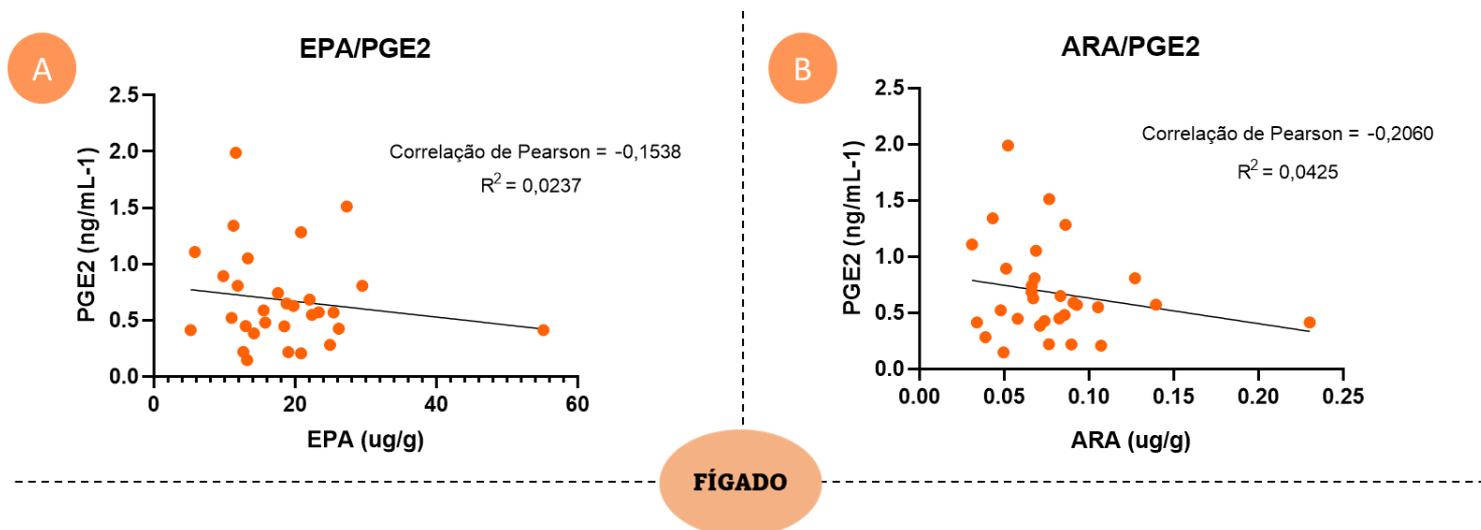


Figura 12. Correlação de Pearson entre os FAs EPA e ARA presentes no fígado e a concentração de PGE2 hepática ($n=30$ em ambas as correlações).

3.2 Superóxido dismutase

Nenhuma alteração foi observada na atividade da SOD do intestino após o tratamento com as dietas experimentais (Figura 13).

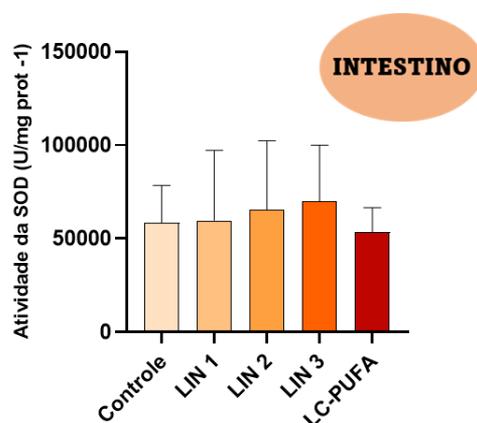


Figura 13. Atividade da superóxido dismutase no intestino de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=11$), LIN 1 ($n=13$), LIN 2 ($n=11$), LIN 3 ($n=15$) e LC-PUFA ($n=12$) (Média \pm Desvio Padrão da Média; *One Way ANOVA* $P<0,05$).

3.3 Expressão gênica

A expressão dos genes imunes *c3* e *il10* no rim também não apresentou diferença estatística entre as dietas testadas (Figura 14).

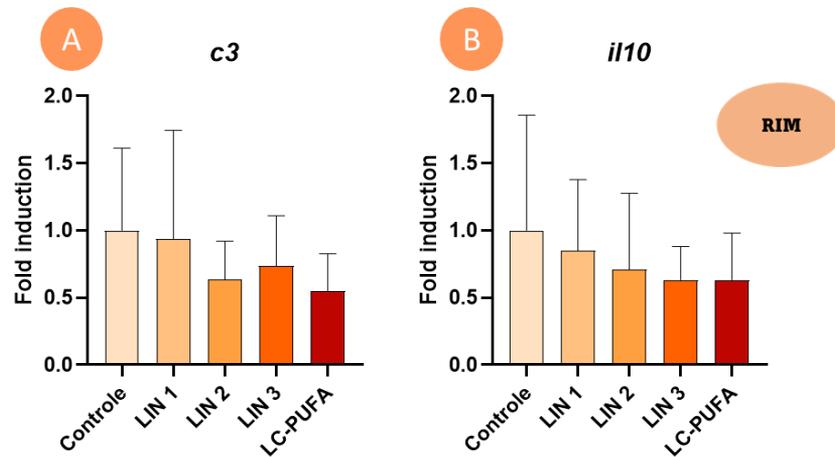


Figura 14. **A)** Expressão gênica da *c3* do rim de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=6$), LIN 1 ($n=6$), LIN 2 ($n=5$), LIN 3 ($n=6$) e LC-PUFA ($n=6$). **B)** Expressão gênica da interleucina 10 (*il10*) do rim de *P. fasciatus* alimentados com as dietas Controle ($n=5$), LIN 1 ($n=4$), LIN 2 ($n=5$), LIN 3 ($n=6$) e LC-PUFA ($n=6$) (Média \pm Desvio Padrão da Média). Análise estatística *One Way* ANOVA $P < 0,05$.

Discussão

O perfil de FA presente nos tecidos dos organismos pode se assemelhar ao perfil encontrado na dieta (Vargas *et al.*, 2008; Arts e Kohler, 2009; Hixson *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2016; Mahbood *et al.*, 2019). No entanto, este perfil também pode variar de acordo com a capacidade da espécie em selecionar, reter e modificar FAs em seus tecidos (Gladyshev e Sushchik, 2019), como visto no presente estudo.

De forma geral, os resultados obtidos indicaram que as dietas testadas, independente do perfil de SFA e PUFA, não refletiram em diferenças nos dados biométricos e na concentração de lipídios depositados no músculo e no fígado. É comumente observado que animais alimentados com altas quantidades de SFA tendem a bioacumular e estocar esses FA no tecido adiposo, refletindo em uma maior massa corpórea (Fowler *et al.*, 2021). No presente estudo, a quantidade administrada de ração ou o tempo de experimento pode não ter sido suficiente para que esse acúmulo fosse observado, sendo relatado apenas diferenças estatísticas no IVS (%) dos animais alimentados com altas quantidades de SFA, que se mostrou elevado quando comparado aos animais alimentados com a dieta LIN 2 (rico em PUFA C18). Além disso, é frequentemente encontrado na literatura que o oferecimento de dietas com diferentes perfis de FA é capaz de influenciar o crescimento dos peixes (Torrecillas *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2022), no entanto, estes estudos são em sua maioria com peixes juvenis, ou seja, que estão em fase de crescimento. Desta forma, a ausência do crescimento (processo que não foi o objetivo do presente trabalho) dos animais aqui investigados, pode ser justificada pelo fato de serem animais adultos, nos quais a alimentação tem como finalidade a manutenção de suas necessidades nutricionais e não necessariamente o crescimento.

1. Capacidade do lambari-do-rabo-vermelho em bioconverter FA

Previamente à alimentação com as dietas experimentais, foi observado que os animais apresentaram em todos os tecidos analisados (músculo, fígado e rim) o perfil de FA rico em C18:2n6, se assemelhando ao perfil de FA da dieta comercial, que tem como a base de sua composição principalmente o óleo de soja, rico neste FA (Gatlin *et al.*, 2007; Hardy, 2010). Isso também foi observado em *A. lacustris* e *P. fasciatus*

selvagens, uma vez que refletem a base da cadeia trófica dos ambientes de água doce, resultando no acúmulo de C18:2n6 em seus tecidos (Gonçalves *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2016). Após o tratamento com as dietas experimentais, o perfil de FA do músculo e dos fosfolipídios do fígado refletiu a dieta em relação a incorporação de PUFA C18 n3 e n6, corroborando com os dados da literatura que afirmam que o perfil de FA é dependente da condição nutricional dos indivíduos (Hixson *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Nayak *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2021). Contudo, os animais também apresentaram a capacidade de retenção e bioconversão dos PUFAs C18 em LC-PUFAs.

Estudos têm demonstrado que peixes, mesmo quando alimentados com dietas contendo baixas quantidades de LC-PUFAs como ARA, EPA e DHA, apresentam em seus tecidos quantidades semelhantes desses FA, sugerindo a ocorrência do processo de bioconversão (Gonçalves *et al.*, 2012; Campelo *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2022). Mesmo diante da pequena quantidade de LC-PUFA na dieta, há relatos de espécies de água doce, como *P. fasciatus* selvagem, que apresentaram níveis consideráveis desses FAs em seus tecidos (Gomes *et al.*, 2016; 2021).

Corroborando com estes achados, observamos que os animais alimentados com dietas pobres em ARA, EPA, DHA mantiveram esses FAs semelhantes aos encontrados nos animais alimentados com a dieta rica em LC-PUFA, indicando que independentemente da quantidade ingerida, os níveis se mantiveram de acordo com seu requerimento, devido possivelmente a um ajuste do indivíduo com a finalidade de mantê-los conservados. Observamos também, que a bioconversão do C18:2n6 ocorreu, mesmo que em menor proporção, uma vez que foi identificado nos grupos alimentados com dietas ricas em PUFA C18 os intermediários de LC-PUFA n6 (C20:2n6 e C20:3n6), indicando que a alongação e dessaturação está de fato acontecendo, sendo corroborado uma vez que estes intermediários foram encontrados em menor quantidade nos animais alimentados com dietas ricas em LC-PUFA.

Este processo de bioconversão de FA também foi confirmado em outras espécies de água doce incluindo o *Pseudoplatystoma coruscans* (Martino *et al.*, 2002; Tanamati *et al.*, 2009), *Rhamdia quelen* (Vargas *et al.*, 2008), *Piaractus mesopotamicus* (Tanamati *et al.*, 2009) e *Brycon cephalus* (Almeida e Franco, 2007) e salmónídeos como *O. mykiss* (Lima *et al.*, 2019). O lambari-do-rabo-amarelo, *A. lacustris*, por exemplo, mesmo quando expostos a dietas com baixo LC-PUFA,

mantiveram esses FAs conservados (Gonçalves *et al.*, 2012; Campelo *et al.*, 2015), acontecendo o mesmo quando foi alimentado com dieta comercial (com baixa porcentagem de n3), apresentando maiores quantidades de n3 no músculo e no fígado quando comparado com o peixe selvagem, indicando uma clara capacidade de bioconversão (Gonçalves *et al.*, 2014).

Além disso, diversos trabalhos na literatura mostram uma relação direta entre a quantidade de C18:2n6 e a maior quantidade de ARA, seguida da menor concentração de EPA, enquanto o DHA se mantém igual (Sissener *et al.*, 2020). No entanto, mesmo quando alimentados com dietas contendo altas quantidades de C18:2n6, observamos que os animais não bioconverteram todo o substrato em ARA, ou seja, independentemente de apresentarem mais C18:2n6 do que C18:3n3, o músculo e os fosfolipídios do fígado apresentaram mais DHA ao invés de ARA, sugerindo que o *P. fasciatus* seja capaz de regular esta conversão, produzindo apenas as quantidades necessárias. Isto pode resultar em um maior investimento na conversão de n3, uma vez que as quantidades dos substratos C18:3n3, sempre foram, de certo modo, menores do que de C18:2n6. Junto a isso, foram observadas maiores concentração de DHA do que de ARA, tanto no músculo quanto nos fosfolipídios do fígado, atingindo, em certos grupos, uma concentração até mais elevada do que nos tecidos alimentados com a dieta rica em LC-PUFA. Este padrão pode ser resultado da preferência da bioconversão de FA da série n3 ou da resistência do DHA à oxidação, sendo preferencialmente depositado nos tecidos, o que leva, conseqüentemente, a uma maior retenção deste FA devido a sua importância fisiológica e menor disponibilidade na dieta (Glencross *et al.*, 2003; Stubhaug *et al.*, 2007).

As correlações positivas encontradas entre C18:2n6 e ARA e C18:3n3 e DHA, reforçam que quanto maior a quantidade dos precursores de LC-PUFA presente na dieta, maior é a capacidade de bioconversão, sendo o DHA preferencialmente bioconvertido quando comparado ao EPA. Estudos em ambiente natural tem demonstrado que o EPA é preferencialmente retido nas cadeias alimentares dulcícolas subtropicais por animais invertebrados, enquanto o DHA é preferencialmente retido por peixes, independentemente do nível trófico (Guo *et al.*, 2017), estando relacionado, em cada grupo, à sua importância fisiológica. Na literatura há estudos que também correlacionaram positivamente o C18:2n6 e o ARA, no entanto, observaram uma correlação negativa entre o EPA e o C18:3n3, com o EPA

diminuindo linearmente com o aumento dos níveis de C18:3n3, indicando possivelmente, que o EPA é β -oxidado de forma mais ativa do que o DHA quando fornecido em excesso (Stubhaug *et al.*, 2007). Além disso, levando em consideração que o C18:2n6 se mostrou positivamente correlacionado ao DHA em ambos os tecidos, podemos dizer que quanto mais PUFA n6, maior é a preferência do animal em bioconverter a via n3, mesmo que de forma fraca, podendo até mesmo reter de forma preferencial o DHA.

Embora fique claro pelo perfil de FA que os animais exibem a capacidade de bioconversão, os dados da expressão gênica não foram tão condizentes com isso, uma vez que observamos em nosso estudo que a expressão gênica da *elovl 5* do fígado foi maior apenas nos animais tratados com a dieta LIN 3. No entanto, curiosamente, mesmo a *$\Delta 6$ fad* sendo expressa de forma semelhante, não apresentou diferença estatística, podendo ser justificada através do alto desvio padrão encontrado entre os indivíduos, ou até mesmo através da utilização da via não clássica para bioconversão desses FA, envolvendo, em ordem, apenas as enzimas ELOVL 5, $\Delta 8$ e 4 FAD, sendo considerada uma via mais direta neste processo (Castro *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2021). Esta ideia pode ser confirmada ao observar que a expressão da *elovl 2* também não foi alterada, bem como a presença dos intermediários C20:2n6 e C20:3n6, encontrado apenas nesta via (Figura 1). Desta forma, no geral, é possível afirmar que os animais são capazes de bioconverterem PUFAs C18 em LC-PUFAs, contudo para a melhor compreensão da via e enzimas utilizadas pelo *P. fasciatus*, a expressão da *elovl 4*, bem como da *$\Delta 4$* , *$\Delta 5$* e *$\Delta 8$ fad* são necessárias. Além disso, levando em consideração que o perfil de FA do músculo se apresentou mais alterado que o fígado, avaliar a expressão gênica no músculo poderia ser interessante, complementando nossos achados.

É comumente relatado que peixes como *S. salar* e *Maccullochella peelii* alimentados com maiores quantidades de PUFA C18 dietéticos apresentam uma maior expressão de elongases e dessaturases, enquanto animais alimentados com altas quantidades de LC-PUFAs, proveniente do óleo de peixe, apresentam menores expressões, seguida de uma menor atividade enzimática (Tocher, 2003b; Stubhaug *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2006). Neste sentido, já foi observado que o *Puntius gonionotus*, por exemplo, quando exposto a diferentes razões de C18:2n6 e C18:3n3, apresentou uma maior expressão da *$\Delta 6$ fad* e *elovl 5* no fígado, músculo, intestino e

cérebro (Nayak *et al.*, 2019). De forma semelhante, também foi observado um aumento na expressão gênica da *elovl 5* e *2*, bem como $\Delta 6$ *fad* do fígado de *O. mykiss* alimentadas com diferentes balanços de n3 e n6 proveniente do óleo vegetal, rico em PUFA C18 (Lima *et al.*, 2019). Visto estes trabalhos, esperávamos um aumento na expressão das dessaturases e alongases analisadas entre os grupos alimentados com altas quantidades de PUFA C18, mas isso não foi encontrado.

Neste contexto, vale relembrar que a biossíntese de LC-PUFA através de moléculas com 18 carbonos ocorre pelo processo de alongação (por meio das enzimas ELOVL 2, 4 e 5), e dessaturação (através da $\Delta 6$, 5, 8 e 4 FAD, dependendo da via utilizada) (Castro *et al.*, 2016), sendo a ELOVL 5 crucial no alongamento de PUFA com 18 a 20 carbonos, a ELOVL 2 envolvida preferencialmente no alongamento de PUFA com 20 a 22 carbonos (Leonard *et al.*, 2002) e a $\Delta 6$ FAD atuando na primeira etapa da biossíntese de LC-PUFA, uma vez que realiza a dessaturação dos precursores C18:2n6 e C18:3n3 em LC-PUFAs (Castro *et al.*, 2016). No entanto, muitos estudos sugerem que pode haver competição entre os substratos (C18:2n6 e C18:3n3) das enzimas envolvidas no processo de bioconversão, especialmente pela $\Delta 6$ FAD. Além disso, acredita-se que esta competição pode bloquear ou inclusive estimular a bioconversão, dependendo da dose administrada, uma vez que em algumas espécies o excesso de C18:3n3 (ou DHA) pode retardar, ou até mesmo bloquear a atividade destas enzimas (Tocher *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2005; Karapanagiotidis *et al.*, 2007; Thanuthong *et al.*, 2011). A maior afinidade da $\Delta 6$ FAD pelo substrato C18:3n3 já foi observado em *M. pealii* (Senadheera *et al.*, 2011), *O. niloticus* (Chen *et al.*, 2018), *O. mykiss* (Thanuthong *et al.*, 2011) e *Siganus canaliculatus* (Li *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2018), dentre outras espécies de peixes (Ng *et al.*, 2013; Teoh e Ng, 2016).

De forma mais detalhada, em *O. niloticus* alimentadas com diferentes porcentagens de C18:2n6 e C18:3n3, foi confirmado que existe de fato a competição entre os substratos n3 e n6 para acessar as enzimas $\Delta 6$ FAD e ELOVL, bem como uma maior bioconversão para EPA e DHA (Chen *et al.*, 2018), sugerindo que as atividades enzimáticas são afetadas pela disponibilidade de substrato (Izquierdo *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2014; Kabyea *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2016; 2018). Além disso, não foi observada a inibição da bioconversão pela alta quantidade de C18:2n6, concluindo que o *O. niloticus* apresenta a capacidade de produzir DHA a partir de C18:3n3,

enquanto a produção de EPA foi estimulada frente ao excesso de C18:2n6 ou dietas pobres em LC-PUFA da série n3 (Chen *et al.*, 2018). De forma contrária, há relatos também que sugerem que a atividade da $\Delta 6$ FAD frente aos diferentes substratos não apresenta nenhuma (ou pouca) competição em *O. mykiss*, indicando que o comportamento da $\Delta 6$ FAD é espécie específico ou dependente de outras relações, incluindo a história nutricional dos animais experimentais, condições experimentais, fontes lipídicas e concentrações ou proporções dos substratos (Vagner e Santigosa, 2011; Emery *et al.*, 2013).

Por fim, vale mencionar que o perfil de FA do rim se manteve inalterado independente das dietas administradas, indicando que tais dietas não foram suficientes para alterar o perfil lipídico deste tecido, no período experimental aqui estabelecido. Além disso, como o rim não é um órgão metabólico, os FA retidos em suas membranas biológicas tendem a ser mais conservados.

2. Efeito da alimentação no sistema imunológico

Os FA são capazes de atuar nas células imunes como combustíveis para geração de energia, componentes dos fosfolipídios (contribuindo para as propriedades físicas e funcionais das membranas celulares), reguladores de fatores de transcrição, e precursores de mediadores lipídicos (como os eicosanoides: PG, LT, lipoxinas e resolvinas) (Calder, 2007). Sabendo que os lipídios da dieta são capazes de alterar a composição de FA dos fosfolipídios de membrana, investigar o perfil de FA presente nos fosfolipídios hepáticos e renal se torna relevante, visto que quando os LC-PUFAs presentes nas membranas celulares são alterados, a produção de eicosanoides, bem como a função imunológica também pode ser alterada (Nelson e Cox, 2019).

Considerando que o rim é o principal componente do sistema imune e o maior local de hematopoiese do peixe (Tort *et al.*, 2003; Zapata *et al.*, 2006), apresentando muitas células envolvidas nas respostas imunológicas (revisada por Gallo e Civinini, 2003), alterações nos LC-PUFAs presentes em suas membranas celulares podem desencadear diferentes respostas, sendo elas pró ou anti-inflamatórias (Xu *et al.*, 2010; Kiron *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Holen *et al.*, 2018). Entretanto, através deste estudo, foi possível observar que as diferentes proporções de PUFA C18 não foram suficientes para influenciar nenhum dos parâmetros imunológicos avaliados.

É bem documentado que o ARA presente na membrana celular pode atuar como substrato da COX 2, estando relacionado a síntese de PGE2, a qual é capaz de promover quimiotaxia de leucócitos, formação de espécies reativas de oxigênio e regular a liberação de citocinas (Calder, 2006; Hii *et al.*, 2007). Por outro lado, os LC-PUFA da série n3, como o EPA e DHA, são conhecidos por competirem com o ARA como substrato da COX 2, produzindo a PGE3, a qual reduz os derivados inflamatórios do ARA, sendo associado (principalmente o DHA) às respostas anti-inflamatórias (Calder, 2007; Tocher, 2015). Sabendo disso, estudos indicam que o ARA, EPA e DHA presente na dieta é capaz de alterar os parâmetros imunológicos de peixes como o *Sparus aurata* e o *S. salar*, uma vez que os processos fisiológicos dependem diretamente do equilíbrio entre n3/n6 dietético (Montero *et al.*, 2008; Sissener *et al.*, 2020; Magalhães *et al.*, 2021).

No presente estudo, foi observado que devido à bioconversão de PUFA C18, as concentrações de ARA, EPA e DHA se encontraram semelhante entre os grupos, até mesmo naqueles alimentados com dietas pobres em LC-PUFA. Estes dados indicam um controle metabólico dos animais frente a diferentes dietas, auxiliando na manutenção desses FA fisiologicamente importantes, resultando em concentração de PGE2 semelhantes no fígado dos animais independente da dieta administrada. Junto a isso, também não foi observado correlação entre a PGE2 e o EPA ou ARA.

Adicionalmente, com o intuito de complementar e confirmar o impacto das diferentes razões de FA n3/n6 dietéticos na produção de eicosanoides, tentou-se avaliar a atividade da COX 2 presente no fígado, no entanto, devido a quantidade limitada de amostra e dificuldades encontradas durante a utilização do kit, infelizmente esta informação não foi obtida, sendo interessante tal investigação em trabalhos futuros. Entretanto, uma vez que a PGE2 não foi alterada, esperava-se que a expressão da COX 2 também se mantivesse inalterada dentre os tratamentos, se mostrando consistentes aos resultados encontrados em *S. aurata*, que não mostrou alteração na expressão desta enzima (Magalhães *et al.*, 2021).

Na literatura, o ARA tem sido apontado como eficaz na modulação da função do sistema imunológico associado a resistência a doenças, podendo aumentar a atividade da SOD e da lisozima em *Anguilla japonica* (Shahkar *et al.*, 2016). No entanto, peixes alimentados com uma dieta pobre em ARA podem compensar esta deficiência através da deposição seletiva deste FA (Torrecillas *et al.*, 2017), ou até

mesmo através da bioconversão do C18:2n6 em ARA (como bem discutido anteriormente), mantendo o requerimento destes FA, não alterando, conseqüentemente, nenhuma das variáveis imunológicas. Como exemplo, Magalhães *et al.* (2021) relataram a ausência de alterações em alguns dos parâmetros imunológicos avaliados frente à diferentes razões de FA, como a expressão da COX 2, como mencionado anteriormente, e de citocinas pró-inflamatórias do intestino, sugerindo que estas respostas podem variar dependendo do tecido. Por outro lado, há trabalhos que demonstram que diferentes porcentagens de ômega 3 são capazes de afetar a atividade da fagocitose, *burst* respiratório, atividade da lisozima, bem como citocinas pró-inflamatórias em *O. niloticus*, desencadeando uma maior resposta anti-inflamatória (Chen *et al.*, 2016).

Além dos parâmetros anteriormente mencionados, a atividade da SOD do intestino também foi analisada a fim de compreender o impacto das diferentes dietas na defesa antioxidante deste tecido, intimamente relacionado à alimentação. No entanto, levando em consideração que nenhuma alteração foi observada, seria interessante avaliar o perfil de FA do intestino destes animais, podendo assim, confirmar se a ausência do efeito foi causada pela bioconversão dos PUFA C18 em LC-PUFA, compensando os níveis de ARA, EPA e DHA dentre os tratamentos, os mantendo similares (observado no rim), ou devido a robustez do intestino frente a certos parâmetros imunológicos, como sugerido por Magalhães *et al.* (2021).

Junto a isso, também não foram observadas alterações na expressão dos genes do sistema imune investigados, como o *c3* (proteína envolvida no sistema complemento) e *il10* (citocina anti-inflamatória) presentes no rim. Vale mencionar aqui que a ideia inicial deste projeto era investigar diversos outros genes imunológicos, como o *TGF-1β*, *lisozima*, *IL-6*, *IL-10* e *TNF*. No entanto, devido ao fato do *P. fasciatus* ser uma espécie pouco estudada se faz necessário desenhar e testar todos os primers desejados, tornando esta etapa muito mais complicada e demorada, não sendo possível analisar todos eles em tempo hábil, desta forma, pretendem-se ser investigados posteriormente.

Por fim, é importante contextualizar que o *P. fasciatus* é amplamente encontrado na América do Sul (Reis *et al.*, 2003) e é conhecido por sua alta capacidade de se ajustar, vivendo em ambientes diversos, seja ele poluído ou não (Souza e Lima-Junior, 2013 ; Carvalho *et al.*, 2015 ; Alonso *et al.*, 2019). Desta

forma, a ausência do impacto das diferentes dietas pode indicar uma relação mais complexa entre a alimentação e o sistema imunológico desta espécie, exigindo possivelmente cenários ainda mais extremos para que alterações sejam encontradas. No entanto, os resultados aqui obtidos não significam, necessariamente, que mudanças nas razões de PUFA C18 n3/n6 na dieta destes animais não são capazes de influenciar o sistema imunológico como um todo de *P. fasciatus*, uma vez que podem ocorrer alterações nos demais parâmetros imunológicos, como capacidade bactericida do plasma, fagocitose e concentração de LT, os quais não foram investigados neste estudo, principalmente frente ao excesso de FA, baseado no requerimento da espécie, ou até mesmo frente a um desafio imunológico, aumentando a resposta imunológica do animal.

Conclusões

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- 1) O perfil de FA do músculo e fosfolipídios hepáticos de *P. fasciatus* foi dependente da condição nutricional dos indivíduos;
- 2) O *P. fasciatus* foi capaz de bioconverter PUFA C18 dietéticos em LC-PUFA preferencialmente pela via n3, uma vez que foi observado um acúmulo de DHA, tanto no músculo quanto no fígado, mesmo após a administração de dietas experimentais ricas em PUFA n6.
- 3) Nenhum efeito foi observado nos parâmetros imunológicos analisados, sugerindo uma relação ainda mais complexa entre a alimentação e o sistema imunológico desta espécie, reforçando sua alta capacidade em se ajustar a diferentes cenários nutricionais.

Resumo

Algumas espécies de teleósteos apresentam a capacidade de bioconverter ácidos graxos polinsaturados com 18 carbonos (PUFAs C18), como o C18:2n6 e C18:3n3, ingerido através da dieta, em PUFAs de cadeia longa (LC-PUFAs), como o ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) e o ácido araquidônico (ARA), através da ação de enzimas elongases e dessaturases, mantendo o requerimento desses ácidos graxos (FAs) tão importantes fisiologicamente como constituinte de membranas celulares, além de serem precursores de mediadores inflamatórios. Considerando que o *P. fasciatus* é um teleósteo amplamente encontrado na América do Sul, habitando locais com diferentes disponibilidades de PUFA C18, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de *P. fasciatus* em alongar e dessaturar PUFAs C18 em LC-PUFA, além de compreender qual a possível influência desses FAs na resposta imune não-específica, através da análise do perfil de ácido graxo do músculo, rim, fosfolipídeos do fígado, análise da expressão de enzimas envolvidas no processo de bioconversão (*elovl 2, 5 e Δ6 fad*), bem como a concentração da prostaglandina (PG), atividade da superóxido dismutase (SOD) e expressão de genes do sistema imune como o *c3* e *il10*, contribuindo para esta área tão pouco explorada. Desta forma, observamos que o *P. fasciatus* foi capaz de bioconverter PUFA C18 dietéticos em LC-PUFA preferencialmente pela via n3, uma vez que foi observado um acúmulo de DHA, tanto no músculo quanto no fígado, após a alimentação com dietas ricas em PUFA n6. Além disso, foi observado que as diferentes razões de PUFA C18 n3/n6 da dieta, neste período experimental, não foram suficientes para influenciar o sistema imunológico destes animais, indicando que o *P. fasciatus* apresenta uma alta capacidade em se ajustar, necessitando de cenários nutricionais mais extremos para alterar seu sistema imunológico.

Abstract

Some teleost species have the ability to bioconvert 18-carbon polyunsaturated fatty acids (C18 PUFA), such as C18:2n6 and C18:3n3, ingested through the diet, into long-chain PUFA (LC-PUFA), such as eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA), through the action of elongase and desaturase enzymes, maintaining the requirement for these physiologically important fatty acids (FA) as constituents of cell membranes, in addition to being precursors of mediators inflammatory. Considering that *P. fasciatus* is a teleost widely found in South America, inhabiting places with different availability of C18 PUFA, this study aimed to evaluate the ability of *P. fasciatus* to elongate and desaturate C18 PUFAs into LC-PUFA, in addition to understand the possible influence of these FA on the non-specific immune response, through the analysis of the fatty acid profile of the muscle, kidney, phospholipids of the liver, analysis of the expression of enzymes involved in the bioconversion process (*elovl 2*, *5* and $\Delta 6$ *fad*), as well as the concentration of prostaglandin (PG), superoxide dismutase (SOD) activity and expression of genes of the immune system, such as *c3* and *il10*, contributing to this poorly explored area. Thus, we observed that *P. fasciatus* was able to bioconvert dietary C18 PUFA into LC-PUFA, preferably to n3 pathway, since an accumulation of DHA was observed, both in muscle and liver, after feeding diets rich in n6 PUFA. Furthermore, it was observed that the different ratios of PUFA C18 n3/n6 in the diet, during this experimental period, were not sufficient to influence the immune system of these animals, indicating that *P. fasciatus* has a high capacity to adjust, requiring more extreme nutritional scenarios to alter its immune system.

Referências Bibliográficas

- Almeida, N.M.; Franco, M.R.B. Fatty acid composition of total lipids, neutral lipids and phospholipids in wild and farmed matrinxã (*Brycon cephalus*) in the Brazilian Amazon area. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87, 2596-2603, 2007. DOI: [10.1002/jsfa.3014](https://doi.org/10.1002/jsfa.3014).
- Alonso, M.B.; Carvalho, D.R.; Alves, C.B.M.; Moreira, M.Z.; Pompeu, P.S. Changes in trophic characteristics of two fish species of *Astyanax* (Teleostei: Characidae) in response to aquatic pollution. *Zoologia*. 36, 1-12, 2019. DOI: [10.3897/zoologia.36.e30445](https://doi.org/10.3897/zoologia.36.e30445).
- Araujo, P.; Belghit, I.; Aarsaether N.; Espe, M.; Lucena, E.; Holen, E. The Effect of Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids on the Production of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Metabolites by Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Nutrients*. 27, 11 (5), 966, 2019. DOI: [10.3390/nu11050966](https://doi.org/10.3390/nu11050966).
- Arcifa, M.S.; Northcote, T.G.; Froehlich, O. Interactive ecology of two cohabiting characin (*Astyanax fasciatus* and *Astyanax bimaculatus*) in an eutrophic Brazilian reservoir. *Journal of Tropical Ecology*. 7 (2): 257-268, 1991. DOI: [10.1017/S0266467400005423](https://doi.org/10.1017/S0266467400005423).
- Arts, M.T.; Kohler, C.C. Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. In: Arts, M.T.; Brett, M.T.; Kainz, M.E. (Eds). *Lipids in Aquatic Ecosystems*. 237-255, 2009.
- Bagga, D.; Wang, L.; Farias-Eisner, R.; Glaspy, J.A.; Reddy, S.T. Differential effects of prostaglandin derived from ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 1751-1756, 2003. DOI: [10.1073/pnas.0334211100](https://doi.org/10.1073/pnas.0334211100).
- Bjørngen, H.; Koppang, E.O. Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*. 73 (1), 53-63, 2021. DOI: [10.1007/s00251-020-01196-0](https://doi.org/10.1007/s00251-020-01196-0).
- Brenna, J.T.; Salem, N.; Sinclair, A.; Cunanne, S.C. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 80, 85-91, 2009. DOI: [10.1016/j.plefa.2009.01.004](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.01.004).

- Calder, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 77 (5-6), 327-335, 2007. DOI: [10.1016/j.plefa.2007.10.015](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.015).
- Calder, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 197-202, 2006. DOI: [10.1016/j.plefa.2006.05.012](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.012).
- Calder, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory process: New twists in an old tale. *Biochimie*. 91, 791-795, 2009. DOI: [10.1016/j.biochi.2009.01.008](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.01.008).
- Calder, P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 79 (3-5), 101-108, 2008. DOI: [10.1016/j.plefa.2008.09.016](https://doi.org/10.1016/j.plefa.2008.09.016).
- Campelo, D.A.V.; de Oliveira, K.R.B.; Batiston, W.P.; Zuanon, J.A.S.; Furuya, W.M.; Matsushita, M.; Salaro, A.L. Conjugated linoleic acid in diets for lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000). *Aquaculture Nutrition*. 21 (6), 788-796, 2015. DOI: [10.1111/anu.12203](https://doi.org/10.1111/anu.12203).
- Carmona-Antoñanzas, G.; Tocher, D.R.; Taggart, J.B.; Leaver, M.J. An evolutionary perspective on Elovl5 fatty acid elongase: comparison of northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon. *BMC, Evolutionary Biology*. 13, 85, 2013. DOI: [10.1186/1471-2148-13-85](https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-85).
- Carvalho, D.R.; Castro, D.; Callisto, M.; Moreira, M.Z.; Pompeu, P.S. Isotopic variation in five species of stream fish under the influence of different land uses. *Journal of Fish Biology*. 87 (3), 559-578, 2015. DOI: [10.1111/jfb.12734](https://doi.org/10.1111/jfb.12734).
- Casatti, L.; Langeani, F.; Castro, R. M. C. Peixes de riacho do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto rio Paraná, SP. *Biota Neotropica*. 1, 1-15, 2001. DOI: [10.1590/S1676-06032001000100005](https://doi.org/10.1590/S1676-06032001000100005).
- Castro, L.F.C.; Tocher, D.R.; Monroig, O. Long-chain polyunsaturated fatty acids biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire. *Progress in Lipid Research*. 62, 25-40, 2016. DOI: [10.1016/j.plipres.2016.01.001](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.01.001).
- Chen, C.; Guan, W.; Xie, Q.; Chen, G.; He, X.; Zhang, H.; Guo, W.; Chen, F.; Tan, Y.; Pan, Q. n-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Bioconverting LNA to DHA is relatively efficient and the LC-PUFA

- biosynthetic pathway is substrate limited in juvenile fish. *Aquaculture*. 495, 513-522, 2018. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2018.06.023](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.023).
- Chen, C.; Sun, B.; Guan, W.; Yiangzuo, B.; Li, P.; Ma, J.; Chen, F.; Pan, Q.; Xie, Q. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of linolenic acid on non-specific immunity and anti-inflammatory responses in juvenile fish. *Aquaculture*. 450, 250-257, 2016. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2015.08.005](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.005).
- Cohen, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, NJ, Erlbaum, 1988.
- Cornet, V.; Ouaach, A.; Mandiki, S.N.M.; Flamion, E.; Ferain, A.; Van Larebeke, M.; Lemaire, B.; López, F.E.R.; Tort, L.; Larondelle, Y.; Kestemont, P. Environmentally-realistic concentration of cadmium combined with polyunsaturated fatty acids enriched diets modulated non-specific immunity in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 196, 104-116, 2018. DOI: [10.1016/j.aquatox.2018.01.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.012).
- de Carvalho, P.A.; Paschoalini, A.L.; Santos, G. B.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*. 25, 306-313, 2009. DOI: [10.1111/j.1439-0426.2009.01238.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2009.01238.x).
- Emery, J. A.; Hermon, K.; Hamid, N. K. A.; Donald, J. A.; Turchini, G. M. Δ -6 Desaturase Substrate Competition: Dietary Linoleic Acid (18:2n-6) Has Only Trivial Effects on α -Linolenic Acid (18:3n-3) Bioconversion in the Teleost Rainbow Trout. *PLoS ONE*. 8 (2), e 57463, 2013. DOI: [10.1371/journal.pone.0057463](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057463).
- Esteves, K.E. Feeding ecology of three *Astyanax* species (Characidae, Tetragonopterinae) from a floodplain lake of Mogi-Guaçú River, Paraná River Basin, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*. 46, 83-101, 1996. DOI: [10.1007/BF00001701](https://doi.org/10.1007/BF00001701).
- Folch, J.; Less, M.; Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497-503, 1957.
- Fonseca-Madrugal, J.; Navarro, J.C.; Hontoria, F.; Tocher., D.R.; Martínez-Palacio, C.A.; Monroig, Ó. Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2:

- characterization of $\Delta 4$ and $\Delta 6\Delta 5$ desaturases of *Chirostoma estor*. *Journal of Lipid Research*. 55, 1408-19, 2014. DOI: [10.1194/jlr.M049791](https://doi.org/10.1194/jlr.M049791).
- Fowler, L.A.; Powers, A.D.; Williams, M.B.; Davis, J.L.; Barry, R.J.; D'Abramo, L.R.; Watts, S.A. The effects of dietary saturated fat source on weight gain and adiposity are influenced by both sex and total dietary lipid intake in zebrafish. *PLoS ONE*. 16 (10), e0257914, 2021. DOI: [10.1371/journal.pone.0257914](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257914).
- Francis, D.S.; Turchini, G.M.; Jones, P.L.; De Silva S.S. Effects of dietary oil source on the growth and muscle fatty acid composition of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture*. 253, 547-556, 2006. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2005.08.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.008).
- Frings, C.S.; Fendly, T.W.; Dunn, R.T.; Quenn, C.A. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*. 18, 673-674, 1972.
- Gallo, P.V.; Civinini, A. Survey of the Adrenal Homolog in Teleosts. *International Review of Cytology*. 89-187, 2003. DOI: [10.1016/s0074-7696\(03\)30003-8](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(03)30003-8).
- Gatlin, D.M.; Barrows, F.T.; Brown, P.; Dabrowski, K.; Gibson, G.T.; Hardy, R.W.; Elliot, H.; Hu, G.; Krogh, A.; Nelson, R.; Overturf, K.; Rust, M.; Sealey, W.; Skonberg, D.; Souza, E.J.; Stone, D.; Wilson, R.; Wurtele, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*. 38, 551-579, 2007. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x).
- Gealh, A.M.; and Hahn, N.S. Alimentação de *Oligosarcus longirostris* Menezes & Gery (Osteichthyes, Acestrorhynchinae) do Reservatório de Salto Segredo, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 15, 985-993, 1998. DOI: [10.1590/S0101-81751998000400017](https://doi.org/10.1590/S0101-81751998000400017).
- Gladyshev, M.I.; Sushchik, N.N. Long-chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Natural Ecosystems and the Human Diet: Assumptions and Challenges. *Biomolecules*. 9, 485, 2019. DOI: [10.3390/biom9090485](https://doi.org/10.3390/biom9090485).
- Glencross, B.D.; Hawkins, W.E.; Curnow, J.G. Restoration of the fatty acid composition of red seabream (*Pagrus auratus*) after grow-out on plant oil based diets. *Aquaculture Nutrition*. 9, 409-418, 2003. DOI: [10.1046/j.1365-2095.2003.00272.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00272.x).

- Gomes, A.D.; Gomes, F.R.; Gücker, B.; Tolussi, C.E.; Figueredo, C.C.; Boëchat, I.G.; Maruyama, L.S.; Oliveira, L.C.; Muñoz-Peñuela, M.; Pompêo, M.L.M.; Cardoso, R.L.; Marques, V.H.; Moreira, R.G. Eutrophication effects on fatty acid profiles of seston and omnivorous fish in tropical reservoirs. *Science of The Total Environment*. 781, 146649, 2021. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.1466](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.1466).
- Gomes, A.D.; Tolussi, C E.; Boechat, I.G.; Pompêo, Cortez, M.P.T.; Honji, R.M.; Moreira, R.G. Fatty Acid Composition of Tropical Fish Depends on Reservoir Trophic Status and Fish Feeding Habit. *Lipids*. 51 (10), 1193-1206, 2016. DOI: [10.1007/s11745-016-4196-z](https://doi.org/10.1007/s11745-016-4196-z).
- Gonçalves, L.U.; Ferroli, F.; Viegas, E.M.M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41 (9), 1967–1974, 2012. DOI: [10.1590/s1516-35982012000900001](https://doi.org/10.1590/s1516-35982012000900001).
- Gonçalves, L.U.; Paris, G.; Bonelli, A.; Sussel, F.R.; Viegas, E.M.M. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. *Aquaculture Research*. 45, 195-203, 2014. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2012.03215](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03215).
- Guo, F.; Bunn, S.E.; Brett, M.T.; Kainz, M.J. Polyunsaturated fatty acids in stream food webs – high dissimilarity among producers and consumers. *Freshwater Biology*. 62, 1325-1334, 2017. DOI: [10.1111/fwb.12956](https://doi.org/10.1111/fwb.12956).
- Hardy, R.W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*. 41, 770-776, 2010. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x).
- Harstad, H.M.F.; Bakke, H.G.; Grimhol, U. Multiple expressed MHC class II loci in salmonids; details of one non-classical region in Atlantic salmon *Salmo salar*, *BMC Genomics*. 9, 193, 2008. DOI: [10.1186/1471-2164-9-193](https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-193).
- Hii, C. S.; Ferrante, A. Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 55 (2), 99-110, 2007. DOI: [10.1007/s00005-007-0014-x](https://doi.org/10.1007/s00005-007-0014-x).
- Hixson, S.M.; Parrish, C.C.; Anderson, D.M. Changes in Tissue Lipid and Fatty Acid Composition of Farmed Rainbow Trout in Response to Dietary Camelina Oil

- as a Replacement of Fish Oil. *Lipids*. 49 (1), 97-111, 2013. DOI: [10.1007/s11745-013-3862-7](https://doi.org/10.1007/s11745-013-3862-7).
- Hixson, S.M.; Sharma, B.; Kainz, M.J.; Wacker, A.; Arts, M.T. Production, distribution, and abundance of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: a fundamental dichotomy between freshwater and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews*. 23, 414-424, 2015. DOI: 10.1139/er-2015-0029.
- Holen, E.; Araujo, P.; Sissener, N.H.; Rosenlund, G.; Waagbø, R. A comparative study: Difference in omega-6/omega-3 balance and saturated fat in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) affect immune-, fat metabolism-, oxidative and apoptotic-gene expression, and eicosanoid secretion in head kidney leukocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 72, 57-68, 2018. DOI: [10.1016/j.fsi.2017.10.040](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.040).
- Holen, E.; He, J.; Espe, M.; Chen, L.; Araujo, P. Combining eicosapentaenoic acid, decosahexaenoic acid and arachidonic acid, using a fully crossed design, affect gene expression and eicosanoid secretion in salmon head kidney cells in vitro. *Fish Shellfish Immunology*. 45 (2), 695-703, 2015. DOI: [10.1016/j.fsi.2015.05.017](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.017).
- Izquierdo, M.S.; Robaina, L.; Juárez-Carrillo, E.; Oliva, V.; Hernández-Cruz, C.M.; Afonso, J.M. Regulation of growth, fatty acid composition and delta 6 desaturase expression by dietary lipids in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 34 (2), 117-127, 2007. DOI: [10.1007/s10695-007-9152-7](https://doi.org/10.1007/s10695-007-9152-7).
- Kabeya, N.; Yamamoto, Y.; Cummins, S. F.; Elizur, A.; Yazawa, R.; Takeuchi, Y., Haga, Y.; Satoh, S.; Yoshizaki, G. Polyunsaturated fatty acid metabolism in a marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*: Functional characterization of Fads2 desaturase and Elovl5 and Elovl4 elongases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 188, 37-45, 2015. DOI: [10.1016/j.cbpb.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.06.005).
- Karapanagiotidis, I.T.; Bell, M.V.; Little, D. C.; Yakupitiyage, A. Replacement of Dietary Fish Oils by Alpha-Linolenic Acid-Rich Oils Lowers Omega 3 Content in Tilapia Flesh. *Lipids*. 42 (6), 547-559, 2007. DOI: [10.1007/s11745-007-3057-1](https://doi.org/10.1007/s11745-007-3057-1).

- Kiron, V.; Thawonsuwan, J.; Panigrahi, A.; Scharsack, J.P.; Satoh, S. Antioxidant and immune defenses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) offered plant oils differing in fatty acid profiles from early stages. *Aquaculture nutrition*. 17, 130-140, 2011. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2009.00715.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00715.x).
- Leonard, A. E.; Kelder, B.; Bobik, E. G.; Chuang, L.-T.; Lewis, C. J.; Kopchick, J. J.; Mukerji, P.; Huang, Y. Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids*. 37 (8), 733-740, 2002. DOI: [10.1007/s11745-002-0955-6](https://doi.org/10.1007/s11745-002-0955-6).
- Li, Y., Hu, C., Zheng, Y., Xia, X., Xu, W., Wang, S., Chen, W.; Sun, Z.; Huang, J. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. *Comparative Biochemistry and Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 151, 183-190, 2008. DOI: [10.1016/j.cbpb.2008.06.013](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.06.013).
- Lima, B.T.M.; Takahashi, N.S.; Tabata, Y.A.; Hattori, R.S.; da Silva Ribeiro, C.; Moreira, R.G. Balanced omega-3 and -6 vegetable oil of Amazonian sacha inchi act as LC-PUFA precursors in rainbow trout juveniles: Effects on growth and fatty acid biosynthesis. *Aquaculture*. 509, 236-245, 2019. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.05.004](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.004).
- Magalhães, R.; Guardiola, F. A.; Guerreiro, I.; Fontinha, F.; Moutinho, S.; Olsen, R. E.; Peres H.; Oliva-Teles, A. Effect of different dietary arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acid content on selected immune parameters in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology Reports*. 2, 100014, 2021. DOI: [10.1016/j.fsirep.2021.100014](https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2021.100014).
- Mahbood, S.; Al-Ghanim, K.A.; Al-Misned, F.; Shahid, T.; Sultana, S.; Sultan, T.; Hussain, B.; Ahmed, Z. Impact of water pollution on trophic transfer of fatty acids in fish, microalgae and zoobenthos in the food web of a freshwater ecosystem. *Biomolecules*. 9 (6), 231, 2019. DOI: [10.3390/biom9060231](https://doi.org/10.3390/biom9060231).
- Marques, V.H.; Moreira, R.G.; Gomes, A.D. Influence of tropical reservoirs eutrophication on the polyunsaturated fatty acid profile in *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae). *Science of The Total Environment*. 717, 137182, 2020. DOI: [10.1016/j.scitotenv](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv).
- Martino, R.C.; Cyrino, J.E.P.; Portz, L.; Trugo, L.C. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal

- and plant lipids. *Aquaculture*. 209, 233-246, 2002. DOI: [10.1016/s0044-8486\(01\)00847-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00847-x).
- McCord, J.E.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055, 1969.
- Monroig, Ó.; Shu-Chien, A.C.; Kabeya, N.; Tocher, D.R.; Castro, L.F.C. Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions. *Progress in Lipid Research*. 86, 101157, 2022. DOI: [10.1016/j.plipres.2022.101157](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101157).
- Montero, D.; Grasso, V.; Izquierdo, M.S.; Ganga, R.; Real, F.; Tort, L.; Caballero, M.J.; Acosta, F. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish Shellfish Immunology*. 24 (2), 147-155, 2008. DOI: [10.1016/j.fsi.2007.08.002](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.08.002).
- Nayak; M.; Giri, S.S.; Pradhan, A.; Samanta, M.; Saha, A. Effects of dietary α -linolenic acid/linoleic acid ratio on growth performance, tissue fatty acid profile, serum metabolites and $\Delta 6$ fad and elov15 gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100, 1643-1652, 2019. DOI: [10.1002/jsfa.10177](https://doi.org/10.1002/jsfa.10177).
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger. *Principles of biochemistry*. Freeman, New York, EUA, 2019.
- Ng, W.K.; Chong, C.Y.; Wang, Y.; Romano, N. Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture*. 372-375, 97-110, 2013. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2012.10.030](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.030).
- Park, W.J.; Kothapalli, K.S.; Lawrence, P.; Tyburczy, C.; Brenna, J.T.J. An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta 8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3. *Lipid Research*. 50 (6), 1195-202, 2009. DOI: [10.1194/jlr.m800630-jlr200](https://doi.org/10.1194/jlr.m800630-jlr200).
- Parrish, C.C. *Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples*. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystem*. Springer, New York, EUA, 4-12, 1999.

- Pettersen, C.H.H. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on human cancer cells - molecular mechanisms involved. *Philosophiae*. Ph.D. Thesis, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway, June 2012.
- Rauta, P.R.; Nayak, B.; Das, S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters*. 148 (1), 23-33, 2012. DOI: [10.1016/j.imlet.2012.08.003](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003).
- Reis, R.S.; Kullander, O.; Ferrarus-Junior, C.J. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EdiPUCRS, Porto Alegre, Brazil, 2003.
- Rombout, J.H.W.M.; Abelli, L.; Picchietti, S.; Scapigliati, G.; Kiron, V. Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*. 31 (5), 616–626, 2011. DOI: [10.1016/j.fsi.2010.09.001](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.001).
- Salinas, I. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology*. 4 (3), 525-539, 2015. DOI: [10.3390/biology4030525](https://doi.org/10.3390/biology4030525).
- Sargent, J.R.; Tocher, D.R.; Bell, J.G. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish nutrition*, 3rd edition. Academic Press, London. 181-257, 2002.
- Senadheera, S.D.; Turchini, G.M.; Thanuthong, T.; Francis, D.S. Effects of dietary α -linolenic acid (18:3n-3)/linoleic acid (18:2n-6) ratio on fatty acid metabolism in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (3), 1020-1030, 2011. DOI: [10.1021/jf104242y](https://doi.org/10.1021/jf104242y).
- Shahkar, E.; Yun, H.; Lee, S.; Kim, D.J.; Kim, S.K.; Lee, B.I.; Bai, S.C. Evaluation of the optimum dietary arachidonic acid level and its essentiality based on growth and non-specific immune responses in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 452, 209-216, 2016. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2015.10.034](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.034).
- Simopoulos, A. P. Evolutionary aspects of diet: the ω -6/ ω -3 ratio and the brain. *Molecular Neurobiology*. 44, 203-215, 2011. DOI: [10.1007/s12035-010-8162-0](https://doi.org/10.1007/s12035-010-8162-0).
- Sissener, N.H.; Araujo, P.; Sæle, Ø.; Rosenlund, G.; Stubhaug, I.; Sanden, M. Dietary 18:2n-6 affects EPA (20:5n-3) and ARA (20:4n-6) content in cell membranes and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 22, 735098, 2020. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2020.735098](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735098).

- Souza, R.G.; Lima-Junior, S.E. Influence of environmental quality on the diet of *Astyanax* in a microbasin of central western Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 35 (2), 177-184, 2013. DOI: [10.4025/actascibiolsci.v35i2.15570](https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v35i2.15570).
- Stubhaug, I.; Lie, Ø.; Torstensen, B.E. Fatty acid productive value and β -oxidation capacity in Atlantic salmon tissues (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquaculture Nutrition*. 13, 145-155, 2007. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2007.00462.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00462.x).
- Stubhaug, I.; Tocher, D.R.; Bell, J.G.; Dick, J.R.; Torstensen, B.E. Fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes and influence of dietary vegetable oil. *Biochim Biophys Acta*. 1734, 277-288, 2005. DOI: [10.1016/j.bbalip.2005.04.003](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.04.003).
- Sun, S.; Ye, J.; Chen, J.; Wang, Y.; Chen, L. Effect of dietary fish oil replacement by rapeseed oil on the growth, fatty acid composition and serum non-specific immunity response of fingerling black carp, *Mylopharyngodon piceus*. *Aquaculture Nutrition*. 17, 441-450, 2011. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2010.00822.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00822.x).
- Tanamati, A.; Stevanato, F.B.; Visentainer, J.E.L.; Matsushita, M.; de Souza, N.E.; Visentainer, J.V. Fatty acid composition in wild and cultivated pacu and pintado fish. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 111 (2), 183-187, 2009. DOI: [10.1002/ejlt.200800103](https://doi.org/10.1002/ejlt.200800103).
- Teoh, C.Y.; Ng, W.K. The implications of substituting dietary fish oil with vegetable oils on the growth performance, fillet fatty acid profile and modulation of the fatty acid elongase, desaturase and oxidation activities of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.* *Aquaculture*. 465, 311-322, 2016. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2016.09.023](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.023).
- Terán, G.E.; Benitez, M.F.; Mirande, J.M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 190, 1217-1234, 2020. DOI: [10.1093/zoolinnea/zlaa019](https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa019).
- Thanuthong, T.; Francis, D.S.; Senadheera, S.P.S.D.; Jones, P.L.; Turchini, G.M. LC-PUFA Biosynthesis in Rainbow Trout is Substrate Limited: Use of the Whole-

- Body Fatty Acid Balance Method and Different 18:3n-3/18:2n-6 Ratios. *Lipids*. 46 (12), 2011. DOI: [10.1007/s11745-011-3607-4](https://doi.org/10.1007/s11745-011-3607-4).
- Tocher, D. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*. 11 (2), 107-184, 2003. DOI: [10.1080/713610925](https://doi.org/10.1080/713610925).
- Tocher, D.; Agaba, M.; Hastings, N, Bell, J.G., Dick, J.R. and Teale, A.J. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 24, 309-320, 2002. DOI: [10.1023/A:1015022406790](https://doi.org/10.1023/A:1015022406790).
- Tocher, D.R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*. 41, 717-732, 2010. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x).
- Tocher, D.R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*. 449, 94-107, 2015. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2015.01.010](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010).
- Tocher, D.R.; Bell, J.G.; Dick, J.R.; Crampton, V.O. Effects of dietary vegetable oil in Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid composition. *Lipids*. 38 (7), 723 -732, 2003. DOI: [10.1007/s11745-003-1120-y](https://doi.org/10.1007/s11745-003-1120-y).
- Torrecillas, S.; Betancor, M.B.; Caballero, M.J.; Rivero, F.; Robaina, L.; Izquierdo, M.; Montero, D. Supplementation of arachidonic acid rich oil in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*) diets: effects on growth performance, tissue fatty acid profile and lipid metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*. 44 (1), 283-300, 2017. DOI: [10.1007/s10695-017-0433-5](https://doi.org/10.1007/s10695-017-0433-5).
- Tort, L.; Balasch, J.; Mackenzie, S. Fish Immune System. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunologia*. 22, 277-286, 2003.
- Turchini, G.M.; Francis, D.S.; De Silva, S.S. A whole body, in vivo, fatty acid balance method to quantify PUFA metabolism (desaturation, elongation and beta oxidation). *Lipids*. 42, 1065-1071, 2007. DOI: [10.1007/s11745-007-3105-x](https://doi.org/10.1007/s11745-007-3105-x).
- Urán, P.A.; Gonçalves, A.; Taverne-Thiele, J.J.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A.J.; Rombout J.H.W.M. Soybean meal-induced enteritis in common carp *Cyprinus carpio* L. and the gene expression of inflammatory mediators in intestinal

- leukocytes. *Fish Shellfish Immunology*. 25, 751e60, 2008. DOI: [10.1016/j.fsi.2008.02.013](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.013).
- Urán, P.A.; Schrama, J.W.; Rombout, J.H.W.M.; Obach, A.; Jensen, L.; Koppe, W.; Verreth, J.A.J. Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon *Salmo salar* L. at different temperatures. *Aquaculture Nutrition*. 14 (4), 324-330, 2008. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2007.00534.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00534.x).
- Vagner, M.; Santigosa, E. Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture*. 315 (1-2), 131–143, 2011. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.11.031](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.031).
- Vargas, R.J.; Souza, S.M.G.; Kessler, A.M., Baggio, S. R. Replacement of fish oil with vegetable oils in diets for jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard 1824): effects on performance and whole body fatty acid composition. *Aquaculture Research*. 39, 657-665, 2008. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2008.01946.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01946.x).
- Vilela, F.S.; Becker, F.G.; Hartz, S.M. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic forest river in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 43 (2), 223–232, 2002. DOI: [10.1590/S1516-89132002000200015](https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000200015).
- Wolff, L.L.; Abilhoa, V.; Rios, F.S.; Donatti, L. Spatial, seasonal and ontogenetic variation in the diet of *Astyanax* aff. *fasciatus* (Ostariophysi: Characidae) in an Atlantic Forest river, southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 7, 257-266, 2009. DOI: [10.1590/S1679-62252009000200018](https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000200018).
- Xie, D.; Chen, C.; Dong, Y.; You, C.; Wang, S.; Monroig, Ó.; Tocher D.R.; Li, Y. Regulation of long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish. *Progress Lipid Research*. 82, 101095, 2021. DOI: [10.1016/j.plipres.2021.101095](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101095).
- Xie, D.; Chen, F.; Lin, S.; Wang, S.; You, C.; Monroig, Ó.; Tocher, D.R.; Li, Y. Cloning, Functional Characterization and Nutritional Regulation of $\Delta 6$ Fatty Acyl Desaturase in the Herbivorous Euryhaline Teleost *Scatophagus Argus*. *PLoS ONE*. 9 (3), e90200, 2014. DOI: [10.1371/journal.pone.0090200](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090200).
- Xie, D.; Chen, F.; Lin, S.; You, C.; Wang, S.; Zhang, Q.; Monroig, Ó.; Tocher, D.R.; Li, Y. Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the euryhaline herbivorous teleost *Scatophagus argus*: Functional

- characterization, tissue expression and nutritional regulation of two fatty acyl elongases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 198, 37-45, 2016. DOI: [10.1016/j.cbpb.2016.03.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.03.009).
- Xie, D.; Liu, X.; Wang, S.; You, C.; Li, Y. Effects of dietary LNA/LA ratios on growth performance, fatty acid composition and expression levels of *elov15*, $\Delta 4$ fad and $\Delta 6 / \Delta 5$ fad in the marine teleost *Siganus canaliculatus*. *Aquaculture*. 484, 309-316, 2018. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2017.08.039](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.039).
- Xu, H.; Ai, Q.; Mai, K.; Xu, W.; Wang, J.; Ma, H.; Zhang, W.X.; Liufu, Z. Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*. *Aquaculture*, 307, 75-82, 2010. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.07.001](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.001).
- Xu, H.; Turchini, G.M.; Francis, D.S.; Liang, M.; Mock, T.S.; Rombenso, A.; Ai, Q. Are fish what they eat? A fatty acid's perspective. *Progress in Lipid Research*. 101064, 2020. DOI: [10.1016/j.plipres.2020.101064](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101064).
- Yang, P.; Jiang, Y.; Fischer, S.M. Prostaglandin E3 metabolism and cancer. *Cancer Letters*. 348, 1-11, 2014. DOI: [10.3390/nu11050966](https://doi.org/10.3390/nu11050966).
- Yang, Z. *Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples*. MSc Thesis, Memorial University of Newfoundland. 1995.
- Yaqoob, P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63 (01), 89-105, 2004. DOI: [10.1079/pns2003328](https://doi.org/10.1079/pns2003328).
- Yu, H.; Li, L.; Yu, L.; Xu, C.; Zhang, J.; Qiu, X.; Zhang, Y.; Shan, L. Effect of Dietary Linoleic Acid (18:2n-6) Supplementation on the Growth Performance, Fatty Acid Profile, and Lipid Metabolism Enzyme Activities of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Alevins. *Animals*. 12, 2631, 2022. DOI: [10.3390/ani12192631](https://doi.org/10.3390/ani12192631).
- Zapata, A.; Diez, B.; Cejalvo, T.; Gutiérrez-de Frías, C.; Cortés, A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20 (2), 126-136, 2006. DOI: [10.1016/j.fsi.2004.09.005](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005).
- Zheng, X.; Leaver, M.J.; Tocher, D.R. Long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in fish: Comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) $\Delta 6$ fatty acyl desaturase gene promoters.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 154 (3), 255–263, 2009. DOI: [10.1016/j.cbpb.2009.06.010](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.06.010).

Zheng, X.; Torstensen, B.E.; Tocher, D.R.; Dick, J.R.; Henderson, R.J.; Bell, J.G. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1734 (1), 13-24, 2005. DOI: [10.1016/j.bbalip.2005.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.01.006).

Anexos

Anexo I. Quantidade de óleo adicionada em 1kg de ração base.

Dieta	Soja (g)	Linhaça (g)	EPA (g)	DHA (g)	ARA (g)	Coco (g)
Controle	-	-	-	-	-	65,24
LIN 1	-	50,19	-	-	-	15,05
LIN 2	20,08	30,11	-	-	-	15,05
LIN 3	35,89	14,30	-	-	-	15,05
LC-PUFA	-	-	20,08	20,08	10,04	15,05

Anexo II. Perfil de FA (%) da dieta comercial (Média ± Desvio Padrão da Média).

FA (%)	Dieta comercial
	<i>n=3</i>
C14:0	1,0 ± 0,03
C16:0	18,9 ± 0,14
C18:0	8,9 ± 0,08
Σ SFA	28,8 ± 0,19
C16:1n7	1,2 ± 0,01
C18:1n9	32,9 ± 0,09
C18:1n7	2,0 ± 0,04
C20:1n9	0,5 ± 0,01
Σ MUFA	36,6 ± 0,11
C18:3n3	1,4 ± 0,03
C18:2n6	33,2 ± 0,27
Σ PUFA	34,6 ± 0,29
Σ PUFA n3	1,4 ± 0,03
Σ PUFA n6	33,2 ± 0,27
n3/n6	0,4 ± 0,00

SFA – ácido graxo saturado; MUFA – ácido graxo monoinsaturado; PUFA – ácido graxo polinsaturado; n3 – série ômega3; n6 – série ômega 6; n3/n6 – razão entre PUFAs da série n3 e n6.

Biografia

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de Mogi das Cruzes (UMC) entre 2016-2019, a aluna obteve bolsa CNPq durante a Iniciação Científica, a qual foi realizada no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo (USP), onde adquiriu experiência na área de biologia celular e sistema imunológico trabalhando com cultura de fibroblastos cardíacos de camundongo. Realizou estágio no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, atuando na área de fisiologia geral com ênfase na reprodução, metabolismo de ácidos graxos, ecotoxicologia e sistema imune de teleósteos. Dentro destas áreas, deve-se destacar a participação em estudos envolvendo os efeitos do alumínio no perfil de ácidos graxos do sêmen de peixes, o qual resultou em uma publicação de dupla primeira autoria na revista *Chemosphere*, e em trabalhos que relacionam os ácidos graxos teciduais de teleósteos de ambiente natural com variáveis imunes após a realização de um desafio imunológico. Durante a pós-graduação obteve bolsa CAPES e FAPESP e no momento está prestes a defender este projeto de Mestrado realizado no Laboratório de Metabolismo de Reprodução de Organismos Aquáticos (LAMEROA). Além disso, realizou estágio de pesquisa no exterior com bolsa (BEPE; 2022) no Departamento de Biologia Celular, Fisiologia e Imunidade da *Universitat Autònoma* de Barcelona (UAB), Espanha, a qual resultou na publicação na revista *Animals* de uma revisão bibliográfica que aborda os efeitos dos reguladores lipídicos na saúde dos peixes. Além disso, também foi realizado durante este estágio o desenvolvimento de um projeto que tinha como finalidade avaliar o efeito do nanoplástico em parâmetros hematológicos, bioquímicos, e imunológicos de *O. mykiss*, o qual atualmente está tendo seus dados mais bem analisados para a posterior publicação.

- **Artigos Publicados:**

Blonç, M.; **Lima, J. (co-first author)**; Balasch, J.C.; Tort, L.; Gravato, C.; Teles, M. Elucidating the Effects of the Lipids Regulators Fibrates and Statins on the Health Status of Finfish Species: A Review. *Animals*. 13, 792, 2023. DOI: [10.3390/ani13050792](https://doi.org/10.3390/ani13050792).

Pinheiro, J.P. S.; **Lima, J. (co-first author)**; Assis, C.B.; Gomes, A.D.; Branco, G.S.;
Moreira, R.G. Paternal exposure to aluminum, acidity, and temperature affect
fatty acid seminal profile, embryonic and larval development of *Astyanax*
altiparanae. *Chemosphere*. 266, 128935, 2021.
DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.128935](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128935).