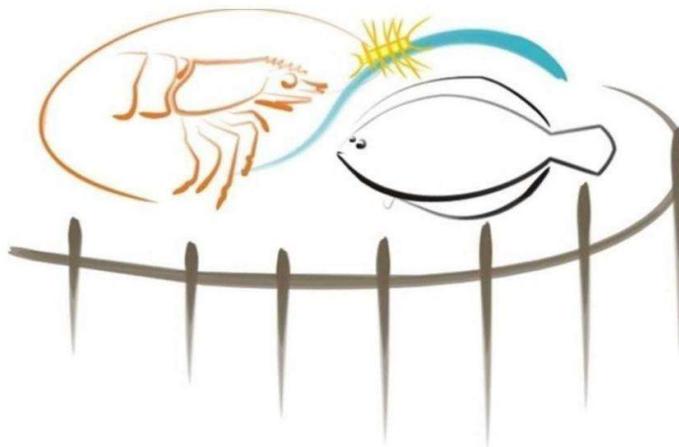




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA - IO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM AQUACULTURA - PPGAqui**



**EFEITO DO ÁCIDO LIPÓICO COMO MODULADOR METABÓLICO E
ANTIOXIDANTE EM ORGANISMOS DE INTERESSE PARA AQUICULTURA**

JUAN RAFAEL BUITRAGO RAMÍREZ

FURG
RIO GRANDE – RS
2022

Ficha Catalográfica

R173e Ramirez, Juan Rafael Buitrago.

Efeito do ácido lipoico como modulador metabólico e antioxidante em organismos de interesse para aquicultura / Juan Rafael Buitrago Ramirez. – 2022.

298 f.

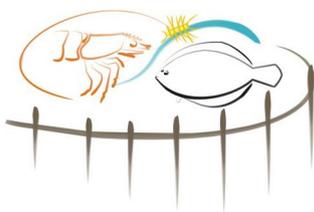
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2022.

Orientador: Dr. José María Monserrat.

1. Antioxidantes 2. Metabolismo energético 3. Revisão sistemática 4. Modulação metabólica I. Monserrat, José María II. Título.

CDU 639.3.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



Pós Graduação em **AQUICULTURA**

Universidade Federal do Rio Grande - FURG

ATA 05/2022

DE DEFESA DA 76ª TESE DE DOUTORADO EM AQUICULTURA

No dia trinta e um de outubro de dois mil e vinte e dois, às nove horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Tese de Doutorado em Aquicultura, do **JUAN RAFAEL BUITRAGO RAMÍREZ**, orientado pelo Prof. Dr. Jose Maria Monserrat composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. José Maria Monserrat (orientador – ICB/FURG), Prof. Dr. Marcelo Borges Tesser (IO/FURG), Prof. Dr. Fabio Everton Maciel (ICB/FURG) e a Prof.ª Dr.ª Lílian Lund Amado (UFPA). Título da Tese: **“EFEITO DO ÁCIDO LIPOICO COMO MODULADOR METABÓLICO E ANTIOXIDANTE EM ORGANISMOS DE INTERESSE PARA AQUICULTURA”**. Dando início à defesa, o Coordenador Adjunto do PPGAq Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. José Maria Monserrat, que na qualidade de orientador, passou a palavra para o candidato apresentar a Tese. Após ampla discussão entre os membros da Banca e o candidato, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador em Exercício. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da tese, ficando a cargo do orientador o cumprimento desta decisão. O candidato **JUAN RAFAEL BUITRAGO RAMÍREZ** foi considerado **APROVADO**, devendo a versão definitiva da Tese ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pelo candidato e pelo Coordenador Adjunto do PPGAq.

Documento assinado digitalmente



JOSE MARIA MONSERRAT

Data: 22/11/2022 18:54:39-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

PROF. DR. JOSÉ MARIA MONSERRAT (ORIENTADOR – ICB/FURG)

Documento assinado digitalmente



MARCELO BORGES TESSER

Data: 22/11/2022 14:25:03-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

PROF. DR. MARCELO BORGES TESSER (IO/FURG)

Documento assinado digitalmente



FABIO EVERTON MACIEL

Data: 22/11/2022 09:53:18-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

PROF. DR. FABIO EVERTON MACIEL (FURG)

Documento assinado digitalmente



LILIAN LUND AMADO

Data: 17/11/2022 18:01:07-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

PROF.ª DR.ª LÍLIAN LUND AMADO (UFPA)

Documento assinado digitalmente



JUAN RAFAEL BUITRAGO RAMIREZ

Data: 22/11/2022 19:13:59-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

JUAN RAFAEL BUITRAGO RAMÍREZ

Documento assinado digitalmente



RICARDO VIEIRA RODRIGUES

Data: 14/11/2022 14:28:07-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

PROF.DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador Adjunto do PPGAq)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAqui

**EFEITO DO ACIDO LIPOICO COMO MODULADOR METABOLICO E
ANTIOXIDANTE EM ORGANISMOS DE INTERESSE PARA AQUICULTURA**

Juan Rafael Buitrago Ramírez

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José María Monserrat (FURG)

RIO GRANDE – RS
AGOSTO, 2022

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	6
AGRADECIMENTOS	7
RESUMO GERAL	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1	21
1. Metabolismo de organismos aquáticos	21
2. Substratos energeticos	25
3. Produção de energia a partir dos substratos energéticos	29
4. Integração do Catabolismo e o anabolismo a partir do estado redox	38
5. Metabolismo e aquicultura	40
6. Acido lipoico e Acetado como moduladores do catabolismo e o anabolismo	49
CAPÍTULO 2	87
Resumo	87
1. Introdução	88
2. Materiais e Métodos	91
2.1.Artemia sp.	91
2.2.Padronização do protocolo da atividade in vivo do sistema transportador de elétrons (ETS)	92
2.3.Isolação da fração mitocondrial	93
2.4.Medição da capacidade redutora da mitocôndria de Artemia sp.	94
2.5. Exposição in vivo da Artemia sp. ao acido lipoico (LA)	95
2.6.Experimento 1	95
2.7.Experimento 2	96
2.8.Análises bioquímicas	97
2.8.1.Processamento das amostras	97
2.8.2.Determinação da concentração de proteínas	97
2.8.3.Determinação da concentração de glicose	98
2.8.4.Determinação da concentração de lactato	98
2.8.5.Determinação da concentração de triglicérides	99
2.8.6.Determinação da capacidade do sistema transportador de elétrons (ETS)	99
2.8.7.Determinação da capacidade antioxidante total	100

2.9.Análises estatísticas	100
3.Resultados	101
3.1.Padronização do protocolo da atividade in vivo do sistema transportador de elétrons (ETS)	101
3.2. Medição da capacidade redutora da mitocôndria da Artemia sp.	102
3.3.Experimento 1	104
3.3.1.Concentração de proteína	104
3.3.2.Nitrogênio amoniacal total (TAN)	104
3.3.3.Concentração de glicose	105
3.3.4.Concentração de lactato	106
3.3.5.Conteúdo de triglicerídeos	106
3.3.6.Capacidade da ETS	107
3.3.7.Capacidade antioxidante total	108
3.3.8.Análise de PCA	109
3.4.Experimento 2	110
4.Discussão	111
Referências	121
CAPÍTULO 3	132
Resumo	132
1. Introdução	133
2.Materiais e métodos	136
2.1.Animais	136
2.2.Exposição ao LA e ao acetato de sódio	136
2.3. Medição de nitrogênio amoniacal total (TAN)	136
2.4.Atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	137
2.5.Processamento de amostras	138
2.6.Análises bioquímicas	138
2.6.1.Proteína	138
2.6.2.Triglicerídeos	138
2.6.3.Glicose	139
2.6.4.Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)	139
2.6.5.Relações entre nutrientes avaliados	140

2.7.Análises estatísticas	140
3.Resultados	141
3.1.Concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN)	141
3.2.Conteúdo de proteína total	142
3.3.Conteúdo de triglicerídeos	144
3.4.Conteúdo de glicose	145
3.5.Capacidade antioxidante (ACAP)	147
3.6.Atividade do ETS	148
3.7.Produção de ROS	150
4. Discussão	153
Referências	166
CAPÍTULO 4	176
Resumo	176
1. Introdução	177
2.Materiais e Métodos	181
3.Resultados e discussão	187
3.1.Ácido lipóico na aquicultura	187
3.2.GLM1 variáveis zootécnicas	189
3.3.GLM2 Proteínas	192
3.4.AMPK principal intermediário no efeito de LA?	194
3.5.Produção de energia e suplementação de LA	197
3.6.Dieta e a interação com LA	200
3.7.Efeito de LA no GSH	203
3.8.Promoção da atividade SOD	206
3.9.Peroxidação lipídica o potencial de LA	207
3.10.Antioxidantes na produção de carne	208
3.11.Antioxidantes na produção de aquicultura	209
4.Conclusões e considerações finais	210
Referências	212
4. Discussao geral da tese	240
5. CONCLUSÕES	245
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	246

DEDICATÓRIA

Este trabalho é para todas as pessoas que acreditam no conhecimento como uma ponte para o futuro. Para minha família, para Juliana e amigos, dedico todo meu trabalho e carreira por ser eles quem realmente podem reclamar os frutos destas. Dedico a sociedade brasileira tudo o que apresento neste documento, por ser graças a esta que eu tive a oportunidade de ver por uma vez na minha vida, que qualquer pessoa pode deixar sua própria marca no conhecimento humano. Dedico por fim este trabalho aos meus professores e em específico ao meu mentor, o professor Monserrat por me mostrar que o que faz girar o mundo não é a sua física, mas a bondade, alavancada na férrea vontade e sacrifício.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pela oportunidade e excelente infraestrutura concedida para meu desenvolvimento no doutorado em aquicultura, bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Agradeço a todos minha família, à Juliana, aos meus amigos, ao Brasil, aos professores e à todas as pessoas que de alguma maneira me trouxeram até esse momento.

RESUMO GERAL

Uma das áreas de pesquisa que mais tem recebido atenção recentemente é o uso de substâncias bioativas na nutrição da aquicultura. O ácido lipóico (LA) tem sido sugerido como um potencial candidato para modificar as respostas metabólicas e antioxidantes desejáveis para a produção animal. Embora os mecanismos exatos pelos quais o LA afeta o metabolismo animal não sejam totalmente compreendidos, uma quantidade substancial de dados sugere que este suplemento promove o metabolismo catabólico e o status antioxidante pela ativação de vias envolvidas na biogênese mitocondrial, β -oxidação e assimilação da glicose circulante pela regulação redox da interação insulina-receptor de insulina e produção de defesas antioxidantes. No entanto, para a aplicação do LA na aquicultura, é necessário avaliar os efeitos deste composto em termos das particularidades de produção e da diversidade de espécies cultivadas nesta atividade. Portanto, o objetivo desta tese é oferecer dados bibliográficos, bioquímicos, fisiológicos, zootécnicos e estatísticos sobre a importância do conhecimento biológico das espécies para a otimização de seu metabolismo produtivo. Na tese foi avaliado, principalmente, os efeitos do LA em modelos animais relevantes para a aquicultura. Para isso, em princípio, dentro de uma visão geral (Capítulo 1) foi teorizado sobre como os compostos nutricionais podem interagir a partir de diversas abordagens bioquímicas para promover processos fisiológicos que afetam características fenotípicas favoráveis à produção. Logo, diferentes concentrações de LA (0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 μ M) foram testadas em náuplios de *Artemia* sp. Os efeitos do LA sobre os níveis de proteína, triglicerídeos, glicose e lactato em náuplios foram avaliados. Da mesma forma, foi medida a concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN) na água. Para avaliar as alterações causadas pelo LA nas defesas antioxidantes em paralelo com o metabolismo energético, a atividade do sistema de transporte de elétrons (ETS) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram

avaliadas. O tempo experimental determinado foi de 24 horas a partir da eclosão das artêmias e amostras de animais e água foram coletadas a cada 6 horas para avaliar os efeitos tempo-dependentes do LA sobre as variáveis supracitadas. Dentro dos resultados, verificou-se uma diminuição na produção de TAN como efeito do LA, além disso, observou-se a capacidade do LA de influenciar os níveis de proteína, glicose e lactato. Os resultados mostraram aumentos de ETS *in vivo* e *in vitro*, bem como diminuição da produção de ROS (Capítulo 2). Observando o aumento da atividade da ETS causado pelo LA, foi avaliado o aumento do conteúdo calórico da dieta como um mecanismo para compensar o gasto energético extra induzido pelo LA. Assim, no Capítulo 3, o acetato de sódio (SA) foi avaliado como fonte adicional de energia e modulador metabólico. Portanto, artêmias recém-eclodidas foram suplementadas com combinações de diferentes concentrações de LA (0, 0,05, 0,5 e 5 μM) e SA (0, 2, 4 e 8 mM). A cada 6 h por 24 h, artêmias foram coletadas para avaliar o teor de proteína, triglicerídeos e glicose, amostras de água também foram coletadas para avaliar a produção de TAN em cada momento. A suplementação causou diminuição no conteúdo energético dos animais que receberam LA, da mesma forma que os maiores níveis de energia foram observados nos animais tratados com SA, mas os animais co-administrados com 0,05 μM de LA e 8 mM de SA apresentaram o maior teor de energia. Isso aponta para a efetiva conservação de energia com a suplementação de SA e a possibilidade de utilizar LA e SA de forma integrada (Capítulo 3). Finalmente, as informações científicas disponíveis foram coletadas para determinar através de uma meta-análise os efeitos zootécnicos, bioquímicos e fisiológicos da suplementação de LA. Foi realizada uma busca sistemática da literatura científica revisada por pares disponível na base de dados Scopus. Foram selecionados artigos que combinavam as características de serem publicações originais em que o LA havia sido testado como único suplemento em organismos aquáticos. A partir da seleção, foram

extraídos os resultados dos parâmetros avaliados em cada trabalho. Foram realizadas meta-análises, nas quais foram encontrados altos níveis de heterogeneidade (i^2), que não conseguiram ser explicados a partir de covariáveis estabelecidas. Por conta disso, os dados foram avaliados quantitativamente a partir de modelos lineares generalizados nos quais foram encontrados efeitos do LA sobre o desempenho zootécnico, com as vias metabólicas de produção de energia sendo aparentemente ativadas pela intermediação da proteína AMPK, que por sua vez parece promover o aumento da atividade de proteínas ligadas à β -oxidação (Capítulo 4).

Palavras chaves: antioxidantes, metabolismo energético, revisão sistemática, modulação metabólica.

ABSTRACT

One of the research areas that has received the most attention recently is the use of bioactive substances in aquaculture nutrition. Lipoic acid (LA) has been suggested as a potential candidate for modifying the metabolic and antioxidant responses that are undesirable for animal production. Although the exact mechanisms that affect animal metabolism are not fully understood, a substantial amount of data suggests that this supplement promotes catabolic metabolism and antioxidant status by activating pathways involved in mitochondrial biogenesis, β -oxidation, and assimilation of circulating glucose for redox regulation of insulin-insulin receptor interaction and production of antioxidant defenses. However, for the application of LA in aquaculture, it is necessary to assess the effects of this compost in terms of the particularities of production and the diversity of species cultivated in this activity. Therefore, the objective of this thesis is to offer bibliographical, biochemical, physiological, zootechnical and statistical data on the importance of the biological knowledge of the species for the optimization of their

productive metabolism. In the Thesis it was mainly evaluated the effects of LA in animal models relevant to aquaculture. Initially, within an overview (Chapter 1), it was theorized about how nutritional compounds can interact with various biochemical approaches to promote physiological processes that affect phenotypic characteristics favoring production. Then, different concentrations of LA (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM) were tested in nauplii of *Artemia* sp. The effects of LA on the levels of protein, triglycerides, glucose and lactate in nauplii were validated. In the same way, it was measured the concentration of total ammoniacal nitrogen (TAN) in water. To assess the alterations caused by antioxidant defenses in parallel with energy metabolism, the activity of the electron transport system (ETS) and the production of reactive oxygen species (ROS) were assessed. The experimental time determined was 24 hours from the hatching of artemias and samples of animals and water were collected every 6 hours to assess the time-dependent effects of LA on the aforementioned variables. It was verified a decrease in the production of TAN as an effect of LA, although it was observed the ability of LA to influence the levels of protein, glucose, and lactate. The results show increases in ETS in vivo and in vitro, as well as a decrease in the production of ROS (Chapter 2). Observing the increase in ETS activity caused by LA, the increase in caloric content of the diet was considered as a mechanism to compensate for the extra energy expenditure induced by LA. Thus, in Chapter 3, sodium acetate (SA) was added as an additional source of energy and metabolic modulator. Therefore, hatched brine shrimps were supplemented with combinations of different concentrations of LA (0, 0.05, 0.5, and 5 μM) and SA (0, 2, 4, and 8 mM). Every 6 hours for 24 hours, brine shrimp were collected to assess the levels of protein, triglycerides, and glucose. Water samples are also collected to assess the production of TAN at all times. The supplementation caused a decrease in energy content in animals that received LA and the highest energy levels were observed in animals treated with SA. However, animals

co-administered with 0.05 μM of LA and 8 mM of SA presented a higher theory of energy. The results point to effective energy conservation with SA supplementation and the possibility of using LA together with SA (Chapter 3). Finally, all the scientific information available was collected to determine, through a meta-analysis, the zootechnical, biochemical, and physiological effects of LA supplementation. A systematic search of the peer-reviewed scientific literature available in the Scopus database was carried out. The selected articles were original publications where LA had been tested as the only supplement in aquatic organisms. From these papers, data on the parameters evaluated in each study were extracted. The performed meta-analyses showed high levels of heterogeneity (i^2) that were not explained from the analyzed covariates. Because of the lack of homogeneity, the data were quantitatively validated using generalized linear models, that showed the influence of LA on zootechnical performance, with the metabolic pathways of energy production being activated by the intermediation of the AMPK protein, which in turn seems to promote or increase in the activity of proteins linked to β -oxidation (Chapter 4).

Keywords: antioxidants, energy metabolism, systematic review, metabolic modulation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

No âmbito da aquicultura tem sido visto um crescente interesse da utilização de suplementos e aditivos dietários para a otimização dos parâmetros produtivos dos organismos cultivados, assim diversos tipos de compostos têm sido provados com diferentes fins como probióticos, prebióticos, antimicrobianos, moduladores metabólicos e antioxidantes, dentre outros (Hoseinifar et al., 2018; Pannu et al., 2014; Sampels, 2013; Talpur et al., 2014). Dentre os antioxidantes que mais relevância tem ganhado dentro de alguns segmentos da produção pecuária está o ácido lipóico (LA) (Lu et al., 2019; Park et al., 2006; Sevgiler et al., 2011; Shi et al., 2017; Trattner et al., 2007; Yilmaz et al., 2002). Este é um metabólito comumente sintetizado pelo organismo a partir do ácido graxo octanoato, sua função é servir como coenzima de algumas desidrogenases (piruvato desidrogenase, e α -cetoglutarato desidrogenase) que participam ativamente em processos catabólicos para a síntese de energia (Çakatay, 2006; Packer e Cadenas, 2011). A administração exógena deste composto tem demonstrado diversos efeitos na bioquímica do organismo (Gorça et al., 2011). Em relação ao sistema antioxidante, existe evidência sobre a capacidade deste composto de promover a síntese de defesas antioxidantes e, desta forma, promovendo a diminuição do dano oxidativo por causas tanto endógenas quanto exógenas (Biewenga et al., 1997; Gorça et al., 2011). Este composto é considerado um potente antioxidante é possível observar efeitos de sua suplementação sobre o metabolismo energético numa resposta análoga à insulina, promovendo a captação e metabolização catabólica da glicose para a produção de energia (Moini et al., 2002; Woo et al., 2005; Yang et al., 2014). Da mesma forma tem se observado a capacidade do LA como promotor da degradação de ácidos graxos através da β -oxidação e estes dois efeitos em conjunto podem explicar algumas observações realizadas sobre a preservação do teor de proteína e aumento da eficiência proteica (Ding et al., 2022; Shi et al., 2018a; Xiong et al., 2022). Em

aquicultura estes efeitos poderiam representar melhora considerável no comportamento zootecnico dos animais como assim indicam alguns estudos (Santos et al., 2016; Shi et al., 2018b), no entanto é comum observar diminuição da eficiência energética dos animais suplementados com LA, representada pela diminuição dos teores lipídicos da carcaça (Chen et al., 2019; Huang et al., 2019; Kütter et al., 2014), o qual em diversos momentos repercute negativamente sobre variáveis zootécnicas como ganho de peso e peso final. É importante ressaltar que se os efeitos do LA sobre o metabolismo energético limitam a utilização deste para fins produtivos, é importante ter em conta que os efeitos antioxidantes do LA garantem benefícios consideráveis tanto para a criação e comercialização do produto cárneo, como o aumento do tempo de prateleira e proteção contra rancidez (Guo et al., 2014; Khan et al., 2015).

Embora exista evidência sobre os efeitos negativos do LA na produtividade da criação, é importante notar que existem trabalhos focados na reversão destes efeitos utilizando como estratégia aumentar o conteúdo energético da dieta utilizando para isso a fração lipídica e de carboidratos (Ding et al., 2022; Huang et al., 2019; Santos et al., 2016; Xu et al., 2019). Pode-se hipotetizar que alguns compostos potencialmente poderiam realizar esta função de maneira eficiente e mais direta. O acetato de sódio (SA), por exemplo, é uma molécula que pode ser utilizado como fonte de energia bioquimicamente mais disponível em comparação à moléculas mais complexas (Smith et al., 2013). O SA é um composto de fácil absorção intestinal e seu transporte provavelmente ocorra de maneira passiva através do epitélio colônico (Sivaprakasam et al., 2017). Fisiologicamente, para a utilização deste composto como substrato energético, a célula precisa ativar o acetato, ligando nele uma coenzima A (CoA) em uma reação ATP dependente, que gera como produto final acetil-CoA (Moffett et al., 2020). Este por sua vez é considerado como um substrato central para a produção de energia. O SA pode ter várias vantagens comparativas a outros substratos energéticos

como, por exemplo, não precisar de uma digestão prévia para a sua absorção, por ser um metabólito de convergência de vias metabólicas para a geração de ATP e produtivamente por ser um composto de baixo custo em comparação a outros nutrientes de importância bioenergética (Moffett et al., 2020; Zhang et al., 2020).

Esta tese pretende aportar conhecimento sobre os efeitos fisiológicos e metabólicos do LA em organismos aquáticos utilizando diferentes abordagens que incluem revisão literária, experimentação com modelos animais e meta-análise. No Capítulo 1 será revisado o marco conceptual sobre a utilização de suplementos, entre estes o LA e o SA, como ferramentas para a otimização da nutrição e da produtividade dentro do contexto da aquicultura. A seguir o Capítulo 2 pretende aportar informação sobre os efeitos do LA no metabolismo energético e estado redox em náuplios de *Artemia* sp. utilizados como modelo animal para a aquicultura. Especificamente foi avaliado se o LA poderia modificar de forma tempo e dose dependente o perfil de composição da *Artemia* sp. no estágio naupliar que ainda está provisionada de vitelo como principal fonte de nutrientes, ao tempo que estimula a biogênese mitocondrial como resultado da promoção do metabolismo catabólico (Valdecantos et al., 2019). Adicionalmente acredita-se que o LA devido às suas características como promotor do sistema antioxidante pode chegar a estimular a produção de defesas antioxidantes ao tempo de que diminui a produção neta de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hagen et al., 1999). No Capítulo 3, novamente utilizando a *Artemia* sp. como organismo modelo foi analisado o efeito do LA em co-administração com o SA como suplemento energético. Neste caso foram considerados os efeitos do LA e SA sobre o conteúdo calórico dos animais para provar no caso do LA sua capacidade de aumentar as taxas de depleção do conteúdo calórico dos animais e a potencial reversão pelo SA quando utilizado como fonte de energia adicional. É importante notar que tanto o LA como o SA possuem o potencial de diminuir a utilização da proteína como fonte de energia (Huggins,

1969; Shi et al., 2018b; Zhang et al., 2020), esta hipótese foi especificamente testada tanto no Capítulo 2 quanto no Capítulo 3. Já no Capítulo 4 foi coletada toda a literatura científica produzida (até o momento da realização da busca), sobre a utilização do LA na aquicultura e os seus efeitos sobre o desempenho produtivo dos animais, metabolismo e estado redox, com o fim de estabelecer consensos sobre as vantagens da utilização do LA como suplemento na produção de organismos aquáticos. Assim, no Capítulo 4 foram aplicadas técnicas de compilação sistemática de dados quantitativos para a análise estatística destes (Forero et al., 2019; Kelley e Kelley, 2019; Nordmann et al., 2012). Acredita-se que o LA pode representar melhoras significativas no comportamento zootécnico dos animais a partir da modulação metabólica que este exerce, como assim sugere a pesquisa feita para outros ramos da produção pecuária (Sohaib et al., 2018).

Referências

- Biewenga, G.P., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 1997. The pharmacology of the antioxidant: Lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* 29: 315-331. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00474-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00474-0).
- Çakatay, U., 2006. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med. Hypotheses* 66, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.07.020>
- Chen, L., Qin, J.G., Du, Z., Wang, X., Limbu, S.M., Lu, M., Xiao, S., Xu, C., Xu, F., 2019. Effects of α lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant profile and lipid metabolism of the GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed high-fat diets. *Aquac. Nutr.* <https://doi.org/10.1111/anu.12881>

Ding, Z., Xiong, Y., Zheng, J., Zhou, D., Kong, Y., Qi, C., Liu, Y., Ye, J., Limbu, S.M., 2022. Modulation of growth, antioxidant status, hepatopancreas morphology, and carbohydrate metabolism mediated by alpha-lipoic acid in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium nipponense* under two dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 546, 737314. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737314

Forero, D.A., Lopez-Leon, S., González-Giraldo, Y., Bagos, P.G., 2019. Ten simple rules for carrying out and writing meta-analyses. *PLoS Comput. Biol.* 15, PMC6521986. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006922>

Goraça, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B., 2011. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports* 63, 849–858. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(11\)70600-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(11)70600-4)

Guo, Z.Y., Li, J.L., Zhang, L., Jiang, Y., Gao, F., Zhou, G.H., 2014. Effects of alpha-lipoic acid supplementation in different stages on growth performance, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 55, 635–643. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.958057>

Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfedt, J., Liu, J., Wehr, C.M., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, and B.N., 1999. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.* 13, 411–418. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.2.411>

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A., Zhou, Z., 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Front Microbiol* 9, 2429. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02429/BIBTEX>

Huang, C.-C., Sun, J., Ji, H., Oku, H., Chang, Z.-G., Tian, J.-J., Yu, E.-M., Xie, J., 2019. Influence of dietary alpha-lipoic acid and lipid level on the growth performance, food

intake and gene expression of peripheral appetite regulating factors in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 505, 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.054>

Huggins, A.K., 1969. The metabolism of 2-14C sodium acetate by the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of alterations in salinity. *Comp Biochem Physiol* 29, 439–445. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91763-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91763-0)

Kelley, G.A., Kelley, K.S., 2019. Systematic reviews and meta-analysis in nutrition research. *British Journal of Nutrition* 122, 1279–1294. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002241>

Khan, M.I., Shehzad, K., Arshad, M.S., Sahar, A., Shabbir, M.A., Saeed, M., 2015. Impact of dietary α -lipoic acid on antioxidant potential of broiler thigh meat. *J Chem* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/406894>

Kütter, M.T., Romano, L.A., Ventura-Lima, J., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2014. Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 162, 70–76. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2014.03.008>

Moffett, J.R., Puthillathu, N., Vengilote, R., Jaworski, D.M., Namboodiri, A.M., 2020. Acetate revisited: A key biomolecule at the nexus of metabolism, epigenetics and oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, acetogenesis and Acyl-CoA short-chain synthetases. *Front Physiol* 11, 1311. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.580167/BIBTEX>

Moini, H., Tirosh, O., Park, Y.C., Cho, K.-J., Packer, L., 2002. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem. Biophys.* 397, 384–391. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2680>

- Nordmann, A., Kasenda, B., Briel, M., 2012. Meta-analyses: what they can and cannot do. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13518. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13518>
- Packer, L., Cadenas, E., 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48, 26–32. <https://doi.org/10.3164/jcbtn.111005FR>
- Pannu, R., Dahiya, S., Sabhlok, V.P., Kumar, D., Sarsar, V., Gahlawat, S.K., 2014. Effect of probiotics, antibiotics and herbal extracts against fish bacterial pathogens. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 9, 13–20. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.002>
- Sampels, S., 2013. Oxidation and antioxidants in fish and meat from farm to fork, in: *Food Industry*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53169>
- Santos, R.A., Caldas, S., Primel, E.G., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2016. Effects of lipoic acid on growth and biochemical responses of common carp fed with carbohydrate diets. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1699–1707. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0250-2>
- Shi, X.C., Jin, A., Sun, J., Tian, J.J., Ji, H., Chen, L.Q., Du, Z.Y., 2018. The protein-sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*: Effects on lipolysis, fatty acid β -oxidation and protein synthesis. *British Journal of Nutrition* 120, 977–987. <https://doi.org/10.1017/S000711451800226X>
- Sivaprakasam, S., Bhutia, Y.D., Yang, S., Ganapathy, V., 2017. Short-chain fatty acid transporters: Role in colonic homeostasis, in: *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 299–314. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170014>
- Smith, G.I., Jeukendrup, A.E., Ball, D., 2013. The effect of sodium acetate ingestion on the metabolic response to prolonged moderate-intensity exercise in humans. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 23, 357–368. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.23.4.357>

Sohaib, M., Anjum, F.M., Nasir, M., Saeed, F., Arshad, M.S., Hussain, S., 2018. Alpha-lipoic acid: An inimitable feed supplement for poultry nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102, 33-40. <https://doi.org/10.1111/jpn.12693>

Talpur, A.D., Munir, M.B., Mary, A., Hashim, R., 2014. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture* 426–427, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.013>

Valdecantos, M.P., Pérez-Matute, P., Prieto-Hontoria, P., Moreno-Aliaga, M.J., Martínez, J.A., 2019. Impact of dietary lipoic acid supplementation on liver mitochondrial bioenergetics and oxidative status on normally fed Wistar rats. *Int. J. Food Nutr.* 70, 834-844. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1572716>

Woo, J.L., Song, K.H., Eun, H.K., Jong, C.W., Hyoun, S.K., Park, H.S., Kim, M.S., Kim, S.W., Lee, K.U., Park, J.Y., 2005. α -Lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 885–891. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.05.035>

Xiong, Y., Li, Q., Ding, Z., Zheng, J., Zhou, D., Wei, S., Han, X., Cheng, X., Li, X., Xue, Y., 2022. Dietary α -lipoic acid requirement and its effects on antioxidant status, carbohydrate metabolism, and intestinal microflora in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture* 547, 737531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737531>

Yang, Y., Li, W., Liu, Y., Li, Y., Gao, L., Zhao, J., 2014. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 1285–1292. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.64>

Zhang, H., Ding, Q., Wang, A., Liu, Y., Teame, T., Ran, C., Yang, Y., He, S., Zhou, W., Olsen, R.E., Zhang, Z., Zhou, Z., 2020. Effects of dietary sodium acetate on food intake, weight gain, intestinal digestive enzyme activities, energy metabolism and gut microbiota in cultured fish: Zebrafish as a model. *Aquaculture* 523, 735188. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735188>

CAPÍTULO 1

Bioquímica e modulação metabólica aplicada na aquicultura: Catabolismo e anabolismo interligados pelo estado redox

Juan Rafael Buitrago Ramírez¹; José María Monserrat^{1,2}

¹Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Instituto de Oceanologia (IO), Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil.

²Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil.

1. Metabolismo de organismos aquáticos

O meio aquático apresenta diversas características que induz os organismos que nele habitam adaptações fisiológicas desenvolvidas com o objetivo de otimizar suas funções vitais (Reed et al., 2015). Isto deu origem ao estabelecimento de um grande número de nichos ecológicos e conseqüentemente de espécies (Connell and Orias, 1964; Mittelbach et al., 1988). A maneira como a fisiologia de um organismo funciona está em grande parte ordenada pelas adaptações que permitem a este extrair matéria e energia do meio com a finalidade de realizar o ciclo biológico básico de nascer, crescer, se reproduzir e morrer (Staeher et al., 2012). No entanto, o meio aquático apresenta, em maior ou menor medida, determinados desafios que cada indivíduo deve superar para a sobrevivência da espécie: disponibilidade de oxigênio, luz, temperatura, salinidade e pH (Dunson and Travis, 2015; Jackson et al., 2011; Nordahl et al., 2018; Schulte, 2007; Wenger et al., 2016; Zigman, 1982).

Estes entre muitos fatores determinam a estrutura celular, tecidual e sistêmica, cuja organização depende da assimilação e transformação biológica da energia e matéria disponível no meio (Heras et al., 2020; Hirata et al., 2003; Laiz-Carrión et al., 2002; Shi et al., 2006; Soares et al., 2006). Esta dependência pode ser interpretada como necessidade energética, o qual constitui a demanda energética mínima para a realização dos processos fisiológicos compatíveis com a vida em condições de retenção ou ganho de energia iguais a zero (Dietz et al., 2012). Mudanças na necessidade de manutenção provocadas por interações entre o organismo e fatores ambientais são evidências de como os processos adaptativos que favorecem o sucesso de uma espécie (Boratyński et al., 2013).

A maneira como os organismos transformam a energia e matéria assimilada denomina-se metabolismo, uma vez que qualquer processo fisiológico depende de matéria e energia, o metabolismo atua constantemente em resposta ao meio e à genética do indivíduo (Judge and Dodd, 2020). Processos de estruturação e organização de componentes biológicos dependem da síntese de moléculas constitutivas, disto encarga-se o metabolismo anabólico, no entanto, termodinamicamente, sua organização e manutenção depende de investimentos constantes de energia, que é fornecida pela atividade do metabolismo catabólico onde se transforma a matéria em energia biologicamente disponível como o ATP (Judge e Dodd, 2020). A integração do anabolismo e catabolismo compõe o metabolismo como todo, onde em síntese, ou anabolismo, agrupa todos os processos de transformação e complexação de moléculas para a obtenção de estruturas associadas ao crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução. Já o catabolismo agrupa os processos de transformação e degradação de moléculas para a obtenção de energia (Halver and Hardy, 2003).

Assim, os processos fisiológicos podem ser definidos como a diferença entre as taxas de entrada de energia e as taxas em que é utilizada para a ocorrência do processo, por conseguinte, a taxa de crescimento, por exemplo, poderia ser definido como a derivada

$dW/dt = HW_i^m - KW_i^n$ onde W representa o peso para o tempo t , HW_i representa a taxa de assimilação de energia ou anabolismo e em contrapartida KW_i representaria a taxa de perda de massa, que biologicamente interpreta-se como catabolismo, uma vez que tanto as taxas de assimilação quanto as taxas de perda de massa são escalonáveis em função ao peso ou à superfície do animal, m e n representam a potência alométrica de incorporação e gasto de energia, respetivamente (Essington et al., 2001).

A partir da derivada anterior, Von Bertalanffy deduziu seu modelo de crescimento $W = W_\infty (1 - \exp^{-k(t-t_0)})^b$ para o qual se assumem n e m como constantes, onde o catabolismo cresce de maneira proporcional ao peso do animal ($n = 1$) e m toma o valor de $2/3$ (0,67) se baseando na regra metabólica da superfície.

Desta forma, este modelo não discrimina de maneira explícita os valores de m e n , mas simplifica de maneira eficiente a quantidade de fatores a serem levados em conta (Essington et al., 2001; Lee et al., 2020). Embora o modelo de Von Bertalanffy consiga em geral descrever adequadamente o crescimento dos peixes é importante ter em conta que dentro da aquicultura os parâmetros m e n não são tão facilmente consideráveis como constantes, isto quer dizer que, a robustez do modelo depende da pouca variação das condições ambientais no meio natural, onde, praticamente, a assimilação do alimento e a perda de massa por catabolismo não chegam a se alterar por fatores diferentes à sazonalidade ou a contaminação (Essington et al., 2001; Lee et al., 2020; Lester et al., 2004). Já em sistemas produtivos onde o consumo e assimilação dependem da qualidade do alimento, e o catabolismo pode ser influenciado por fatores próprios do confinamento, assim como pela dieta, existe um desafio maior para a determinação do potencial de crescimento de uma espécie (Li et al., 2022; Nobre et al., 2019). Dados, m e n como fatores variáveis, no contexto da aquicultura criam-se tanto desafios, quanto possíveis oportunidades para a otimização da atividade. A exploração de estratégias que levem à

maior assimilação de nutrientes (otimização do anabolismo) ou a diminuição do catabolismo por unidade de massa optida deveria ser alvo de pesquisa dentro da área aquícola, o que em termos matemáticos se definiria a obtenção de $n < m < 1$ (Essington et al., 2001; Lee et al., 2020; Li et al., 2022; Nobre et al., 2019).

Em animais aquáticos assim como terrestres os principais substratos usados no anabolismo e catabolismo são, aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos (Halver and Hardy, 2003). A participação destas moléculas dentro do metabolismo pode variar em função do nicho ecológico e a ligação deste com os hábitos alimentares da espécie; animais consumidores primários se alimentam principalmente de organismos fotossintéticos (produtores primários) que ocorrem no ecossistema natural, estes animais normalmente são considerados como herbívoros, espécies animais que consomem outros animais como principal fonte de alimento são considerados carnívoros, assim animais que incluem dentro de sua dieta produtores primários, consumidores primários e/ou predadores são classificados como onívoros (Yodzis, 2001). No entanto essa classificação desestimula a grande diversidade de nichos que podem ser agrupados dentro destes três hábitos alimentares, é por esse motivo que já a seis décadas foi criado um dos conceitos mais resilientes dentro da ecologia, como é o nível trófico (Trites, 2019). Esse conceito distribui os tipos de espécies dentro de uma pirâmide de quatro níveis. Na base da pirâmide se localiza o nível 1, o qual agrupa a totalidade de organismos fotossintéticos, no nível 2 encontram-se os consumidores primários, no terceiro nível temos organismos predadores, cujo hábito alimentar também pode incluir produtores primários, e por fim teríamos o quarto nível de predadores estritos de outros animais (Trites, 2019; Yodzis, 2001). Graças à transformação que o nível trófico faz dos hábitos alimentares à categorias numéricas, foi desenvolvido um sistema que modela satisfatoriamente o consumo de alimento de um organismo através de dados de conteúdo estomacal, isótopos estáveis ou modelos tróficos

de um ecossistema. Com isso, neste sistema se transforma a variável categórica hábito alimentar para uma variável numérica contínua, onde calcula-se o quanto aporta cada nível trófico à dieta de uma espécie e a posiciona dentro de um lugar da pirâmide trófica. Por exemplo, um animal que 50% de sua dieta depende de organismos fotossintéticos (nível 1) e 50% de animais consumidores primários (nível 2) possui um nível trófico de 2,5 segundo a equação:

$TL = 1 + \sum (P_i \cdot TL_i) / \sum P_i$, onde a TL representa o nível trófico, P_i representa a proporção do i-ésimo alimento consumido de TL_i que representa o nível trófico do i-ésimo item consumido (Trites, 2019).

Os animais posicionados entre os níveis 2,0 e 2,19 podem ser considerados como organismos herbívoros, de 2,80 para cima os animais são carnívoros e os que apresentam níveis entre 2,2 e 2,79 são catalogados como onívoros (Froese and Pauly, 2000).

2. Substratos energeticos

Existe uma grande correlação entre o TL e a maneira como o organismo distribui os nutrientes entre o catabolismo e o anabolismo, já que isto depende da disponibilidade desses na dieta (Birkett and Lange, 2001). Em consequência, os animais aquáticos em geral apresentam a tendência de utilizar os aminoácidos como fonte de energia. Existem evidências de enzimas que participam na oxidação de aminoácidos e apresentam K_m até 10 vezes mais baixos do que enzimas homólogas provenientes de espécies não aquáticas. Entre os aminoácidos metabolicamente mais ativos estão a alanina, o aspartato, a leucina, isoleucina, prolina, glutamina, valina, entre outros, os quais aportam entre um 80 e 90% do ATP necessário (Halver and Hardy, 2003; Jia et al., 2017; Nuche-Pascual et al., 2021). Essa priorização das reações catabólicas sobre as anabólicas em aminoácidos, parece ser uma estratégia adaptativa gerada pela baixa disponibilidade de outros possíveis substratos

energéticos como carboidratos no meio aquático. Chama a atenção que dentro da evolução da vida, o surgimento das reações catalíticas de aminoácidos (desaminações, transaminações e descarboxilações) foi anterior à aparição do ciclo de Krebs, inclusive para aspartato, glutamina, lisina, leucina, alanina, valina, isoleucina, prolina e arginina a aparição das vias catabólicas ocorreu de maneira simultânea às vias de síntese (Cunchillos and Lecointre, 2003). Não é uma surpresa que estes aminoácidos sejam também, com exceção da lisina, os mais utilizados pelos organismos aquáticos para a produção de energia. Isso aponta para o fato de que as vias anabólicas para estes aminoácidos aparecerem para manter sua disponibilidade como substratos energéticos (Cunchillos e Lecointre, 2003).

Outro dos substratos energéticos utilizados pelos animais aquáticos são lipídios, um dos grupos de macromoléculas mais abundantes dentro do corpo junto à proteína, aliás em algumas espécies o conteúdo de lipídico pode ultrapassar ao de proteína fixada no corpo (Tocher, 2003). Os lipídios são macromoléculas solúveis em substâncias não polares e que apresentam, em geral, um comportamento bastante hidrofóbico (Parrish, 1999). Estes agrupam uma grande diversidade de compostos como ácidos graxos, lipídios polares dentro dos quais estão os fosfolipídios, como os fosfoglicerídios ou os esfingolipídios, compostos por sua vez, de dois ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol que adicionalmente possui um grupo polar de fosfato também esterificado (Parrish, 1999; Tocher, 2003). Esses, juntamente com os esteróis, são os principais compostos lipídicos estruturais da membrana celular, ademais, os esteróis são compostos apolares de hidrocarburo tetracíclico, que não possuem ácidos graxos na sua estrutura (Parrish, 1999). Já os lipídios neutros são compostos por ácidos graxos esterificados a um álcool como o glicerol, onde sua principal função é servir como reserva energética em animais. Já em espécies aquáticas encontram-se representados principalmente por triglicerídeos e em

menor medida por ceras ésteres que principalmente estão presentes em organismos zooplânctônicos como copépodos (Cavallo e Peck, 2020; Napolitano, 1999). Por fim, também existem os glicolipídios, que em função a sua polaridade podem ser classificado como polares, no entanto sua polaridade obedece a presença de um ou mais açúcares dentro da sua estrutura, esses podem ser encontrados em bactérias, plantas e animais (Tocher, 2003).

Essas macromoléculas também podem ser catalogadas em função aos tipos de ácidos graxos que os compõem. Esta classificação depende do tamanho do ácido graxo em função à quantidade de carbonos que possui (e.g. C =**18**), à quantidade de insaturações ou ligações etilênicas que possui (e.g. 18:**3n**) e à posição dessas insaturações dentro da estrutura (e.g. 18:**3n-3**) Em muitos casos os ácidos graxos recebem nomes que geralmente estão relacionados com o nome em inglês da matéria da qual foram isolados por primeira vez, como o α -linolênico (18:3n-3) isolado de óleo de sementes de linhaça (Tocher, 2003). Outra maneira comum de nomear os ácidos graxos é mediante uma nomenclatura greco-latina que referencia o número de carbonos e de insaturações que possui, por exemplo os ácidos octadecatrienóico (18:3n-3), eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) ou docosaexaenóico (DHA; 22:6n-3). Ácidos graxos com duas ou mais insaturações recebem o nome de ácidos graxo poli-insaturados (PUFA), adicionalmente é comum encontrar o termo de ácidos graxos altamente insaturados, o qual faz referência à ácidos graxos com mais de 20 carbonos e mais de 3 insaturações dentro da sua estrutura (Gladyshev et al., 2009; Guschina e Harwood, 2009).

Em ambientes marinhos os lipídios são geralmente transferidos dos níveis tróficos mais baixos para os níveis mais altos como consequência da predação, isto implica que a maior parte dos lipídios no ambiente marinho vêm da atividade lipogênica dos produtores primários (fitoplâncton) ou do zooplâncton. Isto não significa que o lipídio consumido

pelos níveis tróficos mais altos não sofre modificações, pelo contrário, o predador apresenta enzimas de alongação e dessaturação de ácidos graxos para adequar estes às necessidades fisiológicas que surgem do desenvolvimento, crescimento e mudanças ambientais, no entanto, no geral os peixes marinhos, por exemplo, apresentam baixa ou nenhuma capacidade lipogênica (Iverson, 2009). Esta situação muda bastante em ambientes de água doce, devido à baixa disponibilidade de presas ricas em lipídio. Em animais deste ambiente, o tecido adiposo e o fígado possuem a capacidade de sintetizar lipídio a partir da glicose ou de aminoácidos como a alanina. Os crustáceos, por outro lado, possuem perfis metabólicos variados, apresentando uma capacidade de síntese de lipídio a partir de diversos substratos como ácidos graxos de cadeia curta como o acetato. Grandes diferenças entre espécies são observadas também quanto ao catabolismo lipídico dos animais. A artêmia, por exemplo, apesar de possuir quantidades consideráveis de DHA, realiza rapidamente a catabolização, diferentemente de muitas outras espécies zooplantônicas que tendem a preservar os níveis de DHA por muito mais tempo, um dos motivos para isso acontecer é a temperatura ambiental à que as espécies têm se adaptado. Organismos adaptados à temperaturas frias ou temperadas tendem a preservar os níveis de DHA por mais tempo, já que este em baixas temperaturas, mantém sua fluidez permitindo o funcionamento da membrana celular, no entanto animais de regiões mais quentes possuem uma alta atividade catabólica do DHA, já que por exemplo, no caso da artêmia, a importância fisiológica do DHA ocorre durante a criptobiose e reativação metabólica. Já dentro da ontogenia larval, os ácidos graxos que geralmente são preservados são ácidos graxos saturados que possuem maior estabilidade às altas temperaturas nas que este organismo ocorre (Olsen, 1999).

Substratos, como a glicose, em peixes não são ativamente oxidados quando comparadas com as taxas de oxidação em mamíferos e aves, as quais tendem a se manter altas com

dietas de variado teor de carboidratos, isto aponta a que as diferenças no metabolismo glicolítico de espécies aquáticas está ligado mais às suas características como animais ectotérmicos e à disponibilidade destes nutrientes dentro da dieta (Polakof et al., 2012). Para crustáceos, a capacidade de oxidação da glicose é bastante limitada, no entanto tem sido observado que diante à ação de estressores ambientais ocorre a liberação de sinalizadores endócrinos, como o hormônio hiperglicêmico de crustáceos, que promove a fosforólise do glicogênio para a produção de glicose no hepatopâncreas e músculo (Wang et al., 2016). A ocorrência deste mecanismo em situações de estresse evidencia a participação da glicose como um substrato energético diante do aumento na demanda energética (Wang et al., 2016). Em contrapartida, a liberação a glicose a partir do glicogênio pode ser inibida como efeito de peptídeos similares a insulina, como o fator insulínico de crescimento. Além disso, é importante ressaltar o fato dos organismos aquáticos não tolerarem bem a ingesta de carboidratos simples, devido à sua rápida absorção e aos problemas que acarreta seu alto índice glicêmico (Li et al., 2021a).

3. Produção de energia a partir dos substratos energéticos

Sendo os organismos vivos sistemas organizados e abertos, é necessária a construção de estruturas que isolem o sistema, mantenham sua organização e possuam a capacidade de replicar tanto seus componentes quanto o sistema inteiro (Lucas e Watson, 2002). Todo o processo anterior depende de matéria e energia que quando transformada, permite o funcionamento e substituição de componentes necessários para este fim (Houlihan, 1991; Lucas e Watson, 2002). É essencial dentro do sistema vivo a existência de elementos que contenham a informação necessária para a síntese e ressíntese da maquinaria enzimática

deste, para isso dentro dos sistemas vivos implementou-se a conformação de macromoléculas compostas de nucleotídeos cuja específica organização em forma de DNA possui a informação para a síntese de proteínas (Morange, 2009). Os fins e tipos de proteínas são tão diversos quanto a complexidade do sistema vivo, além disso sua concentração depende da função a realizar, da intensidade com a que essa deve ser realizada e velocidade à que cada proteína funciona (Jaenisch e Bird, 2003; Vogel e Marcotte, 2012). A síntese proteica é um dos processos que mais demandam energia dentro da célula, devido a isto a célula possui diversas vias de produção de energia, sobressaindo dentre todas, a fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Carter e Houlihan, 2001). Essa acontece na membrana interna da mitocôndria à qual é acoplada um complexo enzimático chamado sistema transportador de elétrons (ETS) que tem por função a oxidação de nucleotídeos reduzidos (NADH e FADH₂) (Cowan, 2004). Os produtos resultantes dessa oxidação são prótons e elétrons, que quando distribuídos em lados opostos da membrana, criam um potencial eletroquímico que por sua vez é transformado em força motriz mediante à proteína F₁F₀, a qual permite a passagem de prótons de um lado da membrana para o outro. A mobilização dos prótons transfere a energia motriz necessária para a proteína ATP-sintase acoplar o nucleotídeo ADP à um grupo fosfato, dando como resultado a síntese de uma molécula de ATP (Cowan, 2004; Gnaiger, 2020). Assim a OXPHOS depende da produção de nucleotídeos reduzidos, os quais são formados a partir da molécula acetil-CoA integrada como substrato ao ciclo de Krebs, onde através da descarboxilação e oxidação de compostos intermediários do ciclo ocorre a redução de NAD⁺ e FAD, assim como a produção de CO₂ e ATP (Cowan, 2004; Gnaiger, 2020).

O acetil-CoA provém do catabolismo de diferentes substratos como a glicose, aminoácidos e ácidos graxos, que quando fornecidos na dieta são metabolizados em vias como a glicólise, β oxidação e o catabolismo de aminoácidos ramificados (Cowan, 2004;

Pietrocola et al., 2015). Em relação a glicólise, a formação do acetil CoA depende do piruvato formado nesta, que quando ingressa na mitocôndria através da ação dos carregadores mitocôndriais de piruvato (MCP), é descarboxilada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDC), composto pelas subunidades catalíticas piruvato desidrogenase, diidrolipoamida S acetiltransferase e diidrolipoamida desidrogenase (também chamadas como piruvato desidrogenase; PDH), que transformam o piruvato em acetil CoA. O PDC também possui as subunidades reguladoras, piruvato desidrogenase kinase (PDK) a qual fosforilando a PDH, a regula negativamente e a subunidade piruvato desidrogenase fosfatase (PDP) que possui a capacidade de desfosforar a PDH de volta (Patel et al., 2014; Wenes et al., 2022). Estas duas subunidades reguladores são sensores do status energético da célula se ativando pelo aumento relativo do acetil CoA, NADH e ATP (alto status energético), no caso da PDK ou pelo aumento relativo do CoA, NAD⁺ e ADP (baixo status energético) que ativam alostericamente à PDP (Patel et al., 2014; Wenes et al., 2022).

Em relação à β -oxidação, a produção de acetil CoA ocorre como produto final onde um ácido graxo é ativado no citosol, mediante a adição de uma CoA por alguma das enzimas da família das acil-CoA sintetase, em uma reação ATP dependente. A ativação dos ácidos graxos (formação do acil CoA) permite que a proteína da membrana mitocondrial externa, a carnitina palmitoiltransferase (CPT1), ligue uma carnitina no acil CoA ao mesmo tempo que é despojado da CoA, permitindo a passagem deste até a membrana interna da mitocôndria através do antiportador carregador de soluto 20 (SLC25A20), em troca de uma carnitina livre. Finalmente com a ação da proteína carnitina palmitoiltransferase 2 (CPT2), a acilcarnitina é separada e ativada de novo pela CoA formando-se de novo uma carnitina livre e um acil CoA, o qual é finalmente exportado para a matriz mitocondrial, este

processo é nomeado injeção de carnitina. A partir deste ponto o acil CoA é β -oxidado, gerando NADH e acetil CoA (Cowan, 2004; Houten e Wanders, 2010).

É possível ocorrer a geração de acetil CoA a partir do catabolismo de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina). Os aminoácidos precisam passar por um processo de desaminação catalisado pela enzima transaminase de aminoácidos ramificados (BCAT1), em seguida são transformados em α cetoácidos ramificados, este processo ocorre a nível citosólico, no entanto a descarboxilação dos α cetoácidos é realizada na mitocôndria pela enzima desidrogenase de cetoácidos ramificados e então ocorre a passagem através da membrana mitocondrial com o auxílio da injeção de carnitina usando a CPT1 e CPT2 (Ahmad et al., 2021; Neinast et al., 2019). Os produtos da descarboxilação dos α cetoácidos são NADH, o acetil CoA junto com outros tipos de acil CoA (Ahmad et al., 2021; Neinast et al., 2019). Uma via alternativa para a obtenção de acetil CoA pode ocorrer no fígado a partir do etanol, o qual é transformado em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase IB, graças a propriedade do acetaldeído que pode se difundir livremente na mitocôndria. Uma vez que o acetaldeído entra na mitocôndria, é transformado em acetato, em uma reação catalisada pela enzima aldeído desidrogenase da família 2, desta maneira o acetato acaba sendo transformado em acetil CoA mediante a enzima acil CoA sintetase, da família ativadora de ácidos graxos de cadeia curta (ACSS1) (Cowan, 2004).

Como foi observado a maior parte das substratos energéticos quando catabolizadas são transformadas em acetil CoA e NADH, existem alguns aminoácidos que promovem o funcionamento do ciclo de Krebs, sua função é servir para a síntese de intermediários do ciclo. É o caso do aspartato, o qual quando desaminado pela enzima aspartato transaminase (AST), é transformado em oxaloacetato no ciclo de Krebs, o qual quando acoplado ao acetil CoA dá lugar a formação de citrato em uma reação catalisada pela enzima citrato sintase, concomitantemente, o ácido glutâmico conjugado ao piruvato pode ser

transformado em α cetogluturato pela ação da enzima alanina aminotransferase (ALT). Estas reações são chamadas de anapleróticas (Cowan, 2004), que apesar de não renderem diretamente em ATP, são essenciais para manter as concentrações de compostos intermediários do ciclo de Krebs, que por sua vez permitem a descarboxilação do acetil CoA e a redução de NAD^+ e FAD (Wright e Fhyn, 2001). Uma das particularidades da enzimas ALT é a sua capacidade de desaminar a alanina dando lugar à formação de ácido glutâmico e piruvato, que como já foi mencionado, é transformado em acetil CoA pelo PDC (Ballantyne, 2001). No fígado de peixes a formação de piruvato por desaminação da alanina é 10 vezes maior do que pela glicose e 5 vezes maior do que pelo lactato, convertendo a alanina em um dos mais importantes substrato energéticos para esses organismos (Ballantyne, 2001).

O processo de desaminação de aminoácidos requer compostos receptores da amônia gerada já que esta, apesar de ser útil em algumas circunstâncias para a síntese de outros aminoácidos como por exemplo a glutamina, os excessos de amônia devem ser excretados na água, para isso os organismos aquáticos possuem um sistema de enzimas transdesaminadoras sobre o qual é suportado o metabolismo do nitrogênio (Li et al., 2020). Retomando o caso da enzima ALT, é possível ver que o grupo amina é transferido da alanina para o α cetogluturato que é transformado em ácido glutâmico, este aminoácido possui uma grande importância já que pode ser precursor do neurotransmissor ácido aminobutírico γ (GABA) ou da glutatona, o principal antioxidante não protéico das células. Ademais, o ácido glutâmico também funciona como um receptor de grupos amino, centralizando em grande parte o processo de desaminação e produção de amônia nele, desta forma a enzima glutamato desidrogenase, desamina oxidativamente o ácido glutâmico transformando-o em α cetogluturato e liberando NH_4^+ para a matriz mitocondrial, apesar de que à nível citosólico também ocorre a formação de NH_4^+ a partir

de outros aminoácidos, este processo é o mais importante dentro do metabolismo do nitrogênio (Li et al., 2020; Wright e Fhyn, 2001).

Outros compostos que também contribuem à formação de amônia são os nucleotídeos. Em organismos aquáticos tem sido observado que a representação dos nucleotídeos no total de NH_4^+ produzida é bastante limitada, isto pode se dever ao fato destes não participarem diretamente como substratos energéticos (Ballantyne, 2001). Apesar disso, os nucleotídeos possuem importantes funções, auxiliam na produção e transferência de energia, servem como reguladores da atividade enzimática, por exemplo como transdutores de sinais de tipo hormonal (Agafontsev et al., 2019; Nakamura et al., 2012; Rudolph, 1994) e podem atuar como coenzimas de uma grande variedade de proteínas (Li e Gatlin, 2006; Rudolph, 1994). Um dos exemplos mais relevantes dentro dos nucleotídeos é o ATP, este atua como carregador e doador de energia em reações bioquímicas energeticamente não favoráveis, aportando a energia contida nas ligações fosfato altamente energéticas que possui (Rudolph, 1994). Além disso, pode atuar como doador de grupos fosfato, por exemplo em processos de regulação proteica (Bonora et al., 2012; Rudolph, 1994). Adicionalmente, tem se observado que, extracelularmente, o ATP também possui a capacidade de atuar como um sinalizador em processos relacionados ao sistema nervoso e imune (Dou et al., 2018; Gordon, 1986).

Os nucleotídeos em processos anabólicos também podem se associar a sacarídeos ou ácidos graxos como precursores para a síntese de glicogênio ou lipídio, respectivamente (Gyamfi et al., 2019; Katz, 2022). Aliás, nucleotídeos com estrutura cíclica como o cAMP e o cGMP atuam como segundos mensageiros ligados à sinalização endócrina, da mesma maneira, uma de suas funções mais importantes é servir de precursores de ácidos nucleicos a partir dos quais é formado o material genético de um organismo (Plaxton, 2004).

Embora os nucleotídeos sejam essenciais para a produção de DNA e RNA, o que determina a função destas macromoléculas é a sua organização. A partir desta organização, a nível molecular, é extraída a informação dentro do processo de transcrição de um gene (fragmento de DNA que contém a informação necessária para a síntese de uma ou mais proteínas) mediante a síntese RNA mensageiro (mRNA), que tem como função levar a informação codificada no gene para componentes de tradução como são os ribossomos cuja função é transformar a informação contida no mRNA para proteína. Uma vez que a expressão de proteínas é um processo de grande gasto energético, a síntese proteica é amplamente regulada em função à demanda metabólica da célula ou organismo (Pérez-Ortín et al., 2019). Grande parte da expressão gênica na célula depende da maneira como esta se diferenciou. A diferenciação faz referência à maneira como uma célula se transforma (os genes que expressa) fenotipicamente para realizar uma função dentro de um tecido (Mohn e Schübeler, 2009). É devido a essa diferenciação que o miócito de um indivíduo apesar de possuir o mesmo material genético de um adipócito, realizam funções diferentes, assim a diferenciação destas provoca fenótipos diferentes ou proteínas diferentes que cada grupo celular possui como consequência de diversos perfis de sinalização para a repressão ou ativação de genes (Mohn e Schübeler, 2009). Esse tipo de sinalização chamado de metilação faz referência à ligação de um grupo metil em determinadas regiões do DNA, o qual evita a expressão do gene metilado, da mesma maneira, as histonas que são proteínas que ajudam à compactação da cromatina podem ser metiladas, isto cria associações mais ajustadas entre o DNA e a histona evitando a expressão dos topologicamente vinculados à histona, este tipo de sinalização muda por completo o fenótipo da célula, o qual pode ser herdado mitoticamente, facilitando a formação de tecidos (Carter e Zhao, 2021).

Outra importante regulação na expressão de genes é a acetilação, esta é a adição de um grupo acetila nas histonas, o que provoca mudanças na associação DNA-histona, as quais acabam favorecendo a expressão dos genes topologicamente relacionados com a histona acetilada (Pietrocola et al., 2015). Este processo é dependente da ação de enzimas acetiltransferases, as quais ligam os grupos acetilo às histonas e cuja atividade parcialmente depende da redução relativa das concentrações de NAD^+ e do aumento das concentrações de acetil CoA (Bradshaw, 2021; Nativio et al., 2020). Assim como a ativação e expressão de genes é necessária para manter a função metabólica da célula, silenciar a expressão por motivos energéticos e adaptativos é necessário para permitir a ativação de vias metabólicas alternativas ou antagônicas (Plaxton, 2004). Dentre os processos de regulação negativa da expressão gênica está a própria desacetilação de histonas, um processo regulado por enzimas desacetilases. Um exemplo de desacetilases é a família de desacetilases NAD^+ dependentes (SIRT) (Alamdari et al., 2013). Estas são enzimas com a capacidade de desacetilar uma grande quantidade de proteínas em diferentes compartimentos da célula, no núcleo, como já mencionado, onde podem exercer sua função sobre as histonas, assim como no citosol e na mitocôndria sobre outros tipos de proteína. Por ser as sirtuínas enzimas que regulam a função de outras proteínas, é importante ressaltar o fato destas receberem, por sua vez, uma regulação alostérica positiva pela NAD^+ (Li e Kazgan, 2011).

Esta característica outorga às SIRT a capacidade de funcionar como sensores do status energético da célula, explicando sua especial relevância na função mitocondrial (Sauve et al., 2006). Em humanos, tem sido observado que a atividade de desacetilação da SIRT1 (sirtuina nuclear), serve como ativadora da proteína PGC-1 α , estreitamente envolvida com a ativação positiva de vias para a produção de energia, como a β -oxidação (Sauve et al., 2006).

Outras proteínas como a TORC2, por exemplo, podem ser reguladas negativamente pela SIRT1, inibindo em consequência processos relacionados com a gliconeogênese (Nogueiras et al., 2012). Essa é uma importante evidência dos efeitos de promoção que as sirtuínas, ou pelo menos a SIRT1, exerce sobre o metabolismo energético (Nogueiras et al., 2012; Sauve et al., 2006). Segundo a lógica da ligação entre SIRT1 e o metabolismo energético devido à relação da sirtuína com o estado redox do NAD⁺, parece possível pensar que as sirtuínas também podem se vincular ao metabolismo redox e a capacidade antioxidante da célula (Tao et al., 2014). Como exemplo disso, em camundongos desprovidos da sirtuína SIRT3, observou-se diminuição dos benefícios da restrição calórica sobre o estresse oxidativo, com um respectivo aumento na produção de ROS, e animais que expressavam de maneira adequada a SIRT3 apresentaram diminuição na produção de ROS mediada possivelmente pela MnSOD, como sugere a diminuição da acetilação da MnSOD com a expressão da SIRT3 (Tao et al., 2014). Na aquicultura, a atividade e expressão das sirtuínas precisa ser bastante explorada, no entanto, existe literatura disponível sobre estas desacetilases em animais aquáticos (Chen et al., 2022; Nie et al., 2020; Simó-Mirabet et al., 2017; Vasquez e Tomanek, 2019). É importante ressaltar que essas proteínas podem ocupar uma função central, tanto no metabolismo energético quanto no status redox, apontando a possibilidade de uma estreita ligação entre estes dois parâmetros fisiológicos (Singh et al., 2018).

Em síntese, quando as quantidades de nutrientes e de energia são altos, ocorre uma produção de NADH e de acetil CoA em quantidades fisiologicamente adequadas, assim com uma disponibilidade de acetil CoA, pode ocorrer um aumento da atividade de acetilação de histonas entre outras proteínas levando ao aumento das taxas de síntese proteica (Alamdari et al., 2013). Além disso, esses momentos precedem episódios de baixa disponibilidade de energia pela intensidade na síntese proteica, diante disso, os níveis

relativos de NADH deveriam diminuir para suprir a demanda energética da síntese e a concentração crescente de NAD⁺ deveria promover a atividade das sirtuínas, diminuindo a intensidade da expressão gênica, passando a um estado onde o metabolismo catabólico é priorizado para a produção de energia (Alamdari et al., 2013; Sauve et al., 2006). Esse processo claramente representa um mecanismo de controle entre a síntese anabólica e o catabolismo de biomoléculas, onde as concentrações de NADH e acetil CoA funcionam como sinalizadores moleculares redirecionando o metabolismo para determinadas vias metabólicas (Shi e Tu, 2015).

4. Integração do Catabolismo e o anabolismo a partir do estado redox

Se a estes mecanismos de modulação e controle metabólico adicionarmos o fato das concentrações de NADH serem alteradas pelo status redox da célula e/ou organismo, temos que um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da consequente oxidação do NADH pode promover desacetilação de proteínas, através da ativação das sirtuínas que termina na diminuição da síntese proteica (Xiao et al., 2018). Devido ao aumento na concentração de NAD⁺, pode-se aumentar a relação entre ADP+AMP/ATP, com isso é possível esperar a subsequente ativação da proteína AMPK, como sensor do status energético da célula (Hardie et al., 2012).

A oxidação de NADH, neste caso pelas ROS, pode levar a uma diminuição dos substratos da OXPHOS, levando à uma redesignação das vias metabólicas para a produção de energia, que ao mesmo tempo leva à produção de ROS (Vinogradov e Grivennikova, 2016). Isso ocorre porque uma das fontes de ROS mais importantes dentro da célula é precisamente a mitocôndria, onde os mecanismos para a produção de energia

inexoravelmente também implicam a produção de ROS (Liemburg-Apers et al., 2015). No entanto, como já foi relatado, a atividade das sirtuínas ocorre com a ativação da expressão de proteínas antioxidantes como a MnSOD, da mesma maneira, a ativação da AMPK permite a fosforilação de fatores de transcrição como a Nrf2, a qual na sua migração para o núcleo celular promove a expressão de proteínas relacionadas à defesa antioxidante, entre estas a MnSOD, tioredoxinas ou a GCL a qual participa como a principal enzima para a síntese de glutathione (Joo et al., 2016; Zimmermann et al., 2015). Desta maneira, a ativação das defesas antioxidantes permite a homeostasia metabólica controlando o possível dano oxidativo que o ROS pode causar sobre as biomoléculas celulares (Vomhof-Dekrey e Picklo, 2012).

Como observávamos, o catabolismo de aminoácidos ramificados como a leucina é um processo importante para a síntese de energia, em especial para animais aquáticos (Ahmad et al., 2021). No entanto, aumentos na concentração de leucina já foram relacionados com a ativação de proteínas como a alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), a qual também é regulada positivamente por sinalização endócrina promotora do crescimento. Desta forma, hormônios como o fator insulínico de crescimento (IGF) servem como ativadores da via de sinalização da mTOR a qual funciona como promotor do anabolismo célula, isso acontece através da mediação feita pelas proteínas fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) a qual é ativada pela sinalização transmembrana da IGF, onde a ligação desta aos respectivos receptores promove a fosforilação da PI3K, que por sua vez fosforila a proteína cinase B (Akt) a qual acaba ativando a mTOR (Cho et al., 2009; Nie et al., 2018). Uma das particularidades desta via de sinalização é que proteínas como as proteínas 1 e 2 de esclerose tuberosa (TSC1 e TSC2), que atuam como inibidores da mTOR, são ativadas pela AMP-cinase (AMPK) a qual é um complexo enzimático cuja função é monitorar os níveis de energia da célula para em momentos de deficiência energética (altos níveis

relativos da AMP) ativar vias para a produção de energia. Da mesma maneira, a AMPK também pode ser inibida pela ativação da Akt o qual deriva em ciclos de ativação e desativação da mTOR e da AMPK como ciclos de regulação metabólica e homeostasia (Feng et al., 2007). Incrementos na concentração de aminoácidos como a arginina e a leucina são fatores para a inibição da TSC1 e TSC2, isso favorece a ativação da mTOR e conseqüentemente a síntese de proteína e o crescimento (Yoshizawa, 2004). O conhecimento sobre a mecânica metabólica e a maneira como esta é regulada, pode trazer importantes informações para a formulação de dietas que compreendam o fornecimento de nutrientes e aditivos que modulam a resposta metabólica e conseqüentemente zootécnica de um animal (Yoshizawa, 2004). Por exemplo, no caso da regulação positiva que sofrem as vias anabólicas quando as concentrações de aminoácidos, como a leucina e a arginina, são altas podem indicar que esses aminoácidos são metabolicamente limitantes para a síntese proteica, assim, sendo estes substratos energéticos intensamente utilizados por animais aquáticos, seu uso para vias anabólicas deveria ocorrer se as suas concentrações se mantiverem suficientemente altas para a ativação da mTOR, após o preenchimento das necessidades energéticas (Yoshizawa, 2004).

5. Metabolismo e aquicultura

Assim como a leucina e a arginina podem participar como moduladores da expressão diferencial de vias metabólicas, aminoácidos, como o triptofano, têm demonstrado efeitos positivos quando suplementados na dieta da espécie *Sparus aurata*, na qual observou-se, no fígado, um aumento na expressão de proteínas relacionadas ao sistema imune e resistência contra processos infecciosos, sugerindo a suplementação do triptofano como uma possível alternativa para a promoção da função imune (Cerqueira et al., 2020). Alguns trabalhos apontam a capacidade do triptofano de provocar alterações no comportamento dos animais, é o caso da espécie de ciclídeo *Cichlasoma dimerus*, na que a suplementação

com triptofano diminuiu a agressividade dos indivíduos, principalmente nos que apresentaram uma maior atividade serotoninérgica (Morandini et al., 2019). Esses resultados condizem com o encontrado para *Oncorhynchus mykiss*, cuja suplementação com triptofano, além de promover o desempenho zootécnico, também provocou diminuição dos níveis de cortisol e glicose, ambos biomarcadores de estresse, ao mesmo tempo que aumentou as concentrações do hormônio triiodotironina (T_3) no plasma, sugerindo o uso do triptofano como promotor do metabolismo energético, devido sua função como precursor para a síntese da T_3 (Hoseini et al., 2020). Segundo o trabalho anterior, a suplementação com aminoácidos pode trazer efeitos relevantes para a produção aquícola, no entanto é necessário explorar se a preservação dos aminoácidos, mediante a inibição do seu catabolismo, pode gerar efeitos similares à suplementação sem um investimento econômico adicional na formulação da dieta.

Em gatos e caninos têm sido observado que a inclusão de matérias-primas fermentáveis na dieta, como a goma guar e/ou polpa de beterraba, podem aumentar a produção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido propiônico (Verbrugghe et al., 2012), que é utilizado como substrato para a gliconeogênese através de reações anapleróticas do ciclo de Krebs, no qual entra no nível do succinil CoA para a síntese de oxalacetato como precursor da glicose (Verbrugghe et al., 2012). Nesses animais foi observado que o ácido propiônico, gerado pela fermentação intestinal da fibra, diminui a utilização de aminoácidos como substratos gliconeogênicos (Verbrugghe et al., 2012; Wambacq et al., 2016), que em animais estritamente carnívoros como os gatos traz informações interessantes sobre como a utilização de nutrientes pode mudar em função à frações das dietas e às matérias-primas cujo aporte nutricional é geralmente desestimado (Verbrugghe et al., 2012).

Por outro lado, a glicólise ou a promoção desta em animais aquáticos representa outro desafio. Apesar de ser importante diminuir a utilização da proteína como fonte de energia

através da promoção do catabolismo lipídico. A utilização metabólica da glicose como fonte de energia plantea vantagens comparativas claramente à utilização da proteína, mas também à utilização do lipídio, devido a que a glicose circulante provém principalmente de carboidratos mais complexos encontrados na dieta, que provém de matérias primas geralmente menos onerosas quando comparadas com fontes de lipídio como óleo de peixes e farinha de peixe, como fonte de proteína que são economicamente mais custosas e de oferta pouco sustentável no tempo (Li et al., 2021b, 2021a; Wang et al., 2016). Como já mencionado, a capacidade dos peixes e crustáceos para a oxidação da glicose é baixa, no entanto, existem alternativas farmacológicas para a modulação da tolerância patológica à insulina que apresentam potenciais alternativas para a promoção da glicólise em organismos de interesse aquícola. A transdução da sinalização insulínica é mediada pela ligação desta no respectivo receptor (receptor insulínico; IR). Interessantemente, em espécies filogeneticamente afastadas, têm sido visto que a atividade destes receptores sobre modulações de tipo redox onde já foi observado que o incremento da concentração de ROS pode regular negativamente a função dos IR (Garant et al., 1999; Rentería et al., 2008). Esta depende da autofosforilação de resíduos de tirosina da β -cadeia do IR. Compostos tióicos beneficiam a autofosforilação da IR diminuindo a tolerância à insulina (Dröge, 2005; Garant et al., 1999).

Em células ovárica de hamster e células hepáticas de rato que expressam o IR selvagem de humano, foi evidenciado que a suplementação do meio com o antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC), o qual possui um grupo tiol dentro da sua estrutura, protege os resíduos de cisteína dos IR da oxidação (Garant et al., 1999). Um dos mecanismos de regulação da sinalização insulínica provém do efeito promotor da produção de H_2O_2 que esta provoca, pela ativação da NAD(P)H oxidase. Já foi observado que as modificações redox, que sofrem os resíduos de cisteína no IR, regulam os efeitos da sinalização insulínica, e diminuem a

autofosforilação das β -cadeias. Desta forma, tanto a NAC quanto outros compostos tióicos como a GSH, possuem a capacidade de manter a transdução do sinal insulínico por mais tempo (Dröge, 2005; Garant et al., 1999).

Este padrão de regulação redox sobre resíduos de cisteína a partir de compostos pro-oxidantes é bastante comum dentro da bioquímica celular (Barford, 2004). Por conseguinte, a célula possui a capacidade de sintetizar ou obter do meio, compostos antioxidante ou pro-antioxidantes (pro-oxidantes sub-toxicos) que contenham o possível dano ou feedback positivo anormal ocasionado pelos ROS sobre o metabolismo redox. Nesse processo podem ser ativadas vias para a síntese de compostos antioxidantes como a do eixo de Keap1-Nrf2-ARE, este eixo é amplamente controlado pelas mudanças do status redox na célula, compostos como o H_2O_2 e o NO têm provado sua capacidade de oxidar resíduos de cisteína da proteína Keap1 (Bolisetty e Jaimes, 2013). Uma vez que essa proteína atua como sequestrante da Nrf2, evitando sua migração para o núcleo e função como fator de transcrição, a oxidação dos resíduos de cisteína da Keap1 provoca alterações conformacionais na sua estrutura que permitem a liberação da Nrf2 para o núcleo celular (Bolisetty e Jaimes, 2013). O papel da Nrf2 é promover a expressão de genes necessários para o controle de compostos pro-oxidantes, os quais compõem o sistema antioxidante da célula, assim a migração da Nrf2 ao núcleo permite a ligação desta no promotor gênico de elementos de resposta antioxidante (ARE). Acredita-se que a partir desse processo são regulados positivamente ao redor de 200 genes de importância antioxidante (Hayes e Dinkova-Kostova, 2014).

Como observou-se, o metabolismo é amplamente regulado por mecanismos e reações de óxido-redução nas que muitas vezes as ROS ocupam um papel central (Sies e Jones, 2020). As ROS são moléculas derivadas do oxigênio molecular, formadas a partir de reações de oxido-redução (H_2O_2 , hidroperóxidos, oxigênio molecular singleto, ozônio, ácido

hipobromoso e ácido hipocloroso) ou de excitação eletrônica. O fato de algumas possuírem um elétron desemparelhado as converte em espécies radicaladas (radical anion superóxido, radical hidroxil, radical peroxil e radical alcóxil) (Lushchak e Storey, 2021). A geração de ROS pela atividade metabólica ocorre, por exemplo na mitocôndria tanto na matriz mitocondrial, pela atividade de enzimas como o PDC e α cetoglutarato desidrogenase, e na membrana interna pela coenzima Q citocromo c reductase. Entre esses processos, é produzido ao redor do 90% do ROS mitocondrial, em concentrações fisiologicamente favoráveis ou de eustresse oxidativo, nestas condições as ROS promovem os processos de proliferação celular, migração celular e angiogênese, aumentos ocasionais podem ativar vias adaptativas ao estresse e a via do Nrf2, no entanto um incremento excessivo do ROS o de distresse oxidativo, leva a respostas inflamatórias, fibrogênese, crescimento tumoral, inibição do crescimento e morte celular, devido a isto a produção de ROS é controlada mediante a síntese de compostos antioxidantes (Sies e Jones, 2020).

Um antioxidante é qualquer composto que em determinadas concentrações consiga evitar a oxidação de outra molécula, estes podem atuar diretamente removendo compostos pro-oxidantes, inibindo a produção de pro-oxidantes, e/ou indiretamente promovendo a produção de antioxidantes endógenos (Sun et al., 2018). Dentre os compostos antioxidantes exógenos encontramos o tocoferol, o ácido ascórbico e carotenoides, assim como compostos fenólicos que têm demonstrado serem úteis, não só para a remoção de compostos pro-oxidantes, mas também para a promoção do sistema antioxidante (Bora et al., 2022; Croft, 2016; Forman et al., 2014; Lovell, 2000; Mutalipassi et al., 2021; Smirnoff, 2018; Stahl e Sies, 2003).

O tocoferol, ou vitamina E, é considerado como um nutriente essencial dentro da dieta, este apresenta diferentes formas estruturais chamadas como alfa, beta, gamma e delta. Devido

às suas características lipofílicas é principalmente estocado nas membranas celulares e tecido adiposo na forma alfa, protegendo ácidos graxos do dano oxidativo.

No entanto seus efeitos parecem ir além da simples remoção de pro-oxidantes. Uma das principais evidências sobre isto são as diferenças entre a atividade antioxidante das diferentes formas de tocoferol quando testadas *in vitro* ou *in vivo* (Bora et al., 2022). Onde, *in vitro* a maior atividade é apresentada pela forma *delta* seguido da *beta*, *gamma* e *alfa*, no entanto *in vivo* a *alfa*, por apresentar uma maior biodisponibilidade e presença nos tecidos, também apresenta a maior atividade antioxidante, seguida das formas *beta*, *gamma* e *delta* (Bora et al., 2022; Traber, 2010). É importante ressaltar o fato de que os tocoferóis, diferentes ao *alfa*, podem ser metabolizados ativamente mediante proteínas da família da Citocromo p450 (Traber, 2010). Isto demonstra que em sistemas vivos a ação dos antioxidantes pode ser regulada de maneira ativa pelos diferentes componentes do sistema biológico ou compostos exógenos.

No caso do ácido ascórbico ou vitamina C, como nutriente essencial dentro da dieta, possui uma grande importância para a fisiologia do organismo. Apesar do ácido ascórbico ser um nutriente essencial para teleósteos, crustáceos e moluscos, em geral as espécies de elasmobrânquios e alguns peixes ósseos não teleósteos podem sintetizá-lo nas quantidades necessárias (Lovell, 2000). Como antioxidante, o ácido ascórbico é um efetivo removedor de compostos pró-oxidantes, ajudando principalmente no controle de vários radicais pró-oxidantes, mesmo com sua baixa reatividade ao H₂O₂ (Lovell, 2000; Smirnoff, 2018). Graças a sua possibilidade de reação com tocoferóis radicalizados, participa ativamente na regeneração do tocoferol oxidado agindo indiretamente como protetor da membrana celular (Smirnoff, 2018).

Outro grupo de compostos, aos quais atribui-se funções antioxidantes, são os carotenóides, os quais também possuem uma função importante na remoção de substâncias pró-oxidantes como a o radical peroxil (ROO•) e o oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$), onde devido às pequenas mudanças no estado energético dos carotenóides, estes permanecem praticamente intactos e podem remover de maneira reiterada a produção de $^1\text{O}_2$. Em relação ao ROO•, devido à natureza lipofílica dos carotenoides, possuem uma importante função na proteção da membrana celular contra a peroxidação lipídica (Stahl e Sies, 2003).

Enquanto aos polifenóis, estes agrupam uma grande diversidade divididas entre flavonoides, ácidos fenólicos, ligninas e estilbenos, estes ocorrem de maneira ampla em organismos vegetais como metabólitos secundários contribuindo com várias funções entre as que estão a proteção contra estressores tanto bióticos como abióticos (Ahmadifar et al., 2021; Kennedy, 2014). Devido à sua estrutura química, os polifenóis são compostos por uma grande capacidade para remover compostos radicalizados, deslocando elétrons desemparelhados provenientes de compostos eletrofílicos para dentro da sua estrutura (Croft, 2016). No entanto, a função destes compostos como removedores diretos de ROS tem sido questionada devido às baixas concentrações destes dentro da dieta e à sua capacidade de promover a expressão de mecanismos protetivos contra compostos tóxicos. Segundo isso, é possível pensar que sua função antioxidante está ligada à sinalização e ativação de mecanismos protetivos endógenos. Em contraste, já foi observado que muitos dos compostos fenólicos, que atuam como removedores de compostos pro-oxidante *in vitro*, *in vivo* produzem a ativação de respostas típicas de fase II para a metabolização de xenobióticos, isto acompanhado por um incremento na acumulação da Nrf2 no núcleo e a consequente ativação da expressão de gene relacionado à resposta antioxidante celular (Croft, 2016; Forman et al., 2014). Muitos dos polifenóis, dos quais espera-se uma capacidade de contenção e remoção de ROS, no nível celular são transformados em

quinonas eletrofilicas, as quais reagem rapidamente com compostos nucleofílicos, explicando a ativação de enzimas da fase II observadas com o ingresso de polifenóis no organismo, ao tempo que perturbações na concentração de compostos nucleofílicos, como a glutathiona ou a própria geração de substâncias eletrofilicas, deveriam favorecer a ativação da via da Nrf2 e da resposta antioxidante celular (Croft, 2016; Forman et al., 2014; Lund, 2021). Contudo, como as concentrações nas que o polifenóis podem causar efeitos deletérios são superiores às que normalmente poderia ser consumidas e absorvidas da dieta, seu efeito acaba sendo subtóxico e hormeticamente benéfico como promotor de diversas funções fisiológicas redox-dependentes (Forman et al., 2014).

Além disso, o consumo de polifenóis também tem mostrado benefícios como moduladores da microbiota intestinal atuando como prebióticos e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (Ahmadifar et al., 2021). Por outro lado, os polifenóis também têm demonstrado atividade antibacteriana, no caso dos flavonóides, e antifúngica e antiviral, por exemplo em taninos (Daglia, 2012). A nível endócrino alguns flavonóides apresentam a capacidade de se ligar a receptores de estrógenos, atuando como sinalizadores positivos ou inibindo a função de esteróides, por competição pelo sítio de ligação (Ahmadifar et al., 2021).

Na aquicultura, apesar de que o uso de antioxidantes como suplementos dietéticos ainda é incipiente, no caso do α tocoferol, por conta de existir uma demanda nutricional deste composto, tem sido observado um amplo número de funções fisiológicas e produtivas que são auxiliadas por este composto. A redução da peroxidação lipídica é uma das suas funções mais notáveis, principalmente em animais aclimatados à baixas temperaturas, nas que devido ao aumento no conteúdo de PUFA's nas membranas celulares, pode ocorrer um aumento do dano oxidativo nestas (El-Sayed e Izquierdo, 2022; Mourente et al., 2007). Este efeito pode estar relacionado com resultados observados com a suplementação com tocoferol, os quais evidenciam melhoras no crescimento, no sistema imune, capacidade

antioxidante e fecundidade, entre outros (El-Sayed e Izquierdo, 2022; Li et al., 2014; Zhao et al., 2018). Além disso, também tem sido observada a diminuição na expressão da AST e ALT, o qual pode estar relacionado com o aumento na eficiência proteica, observados por exemplo no peixe híbrido *Channa argus* × *Channa maculata* (Zhao et al., 2018).

Quanto ao ácido ascórbico, assim como o tocoferol, existe requerimento nutricional por este composto, o qual encontra-se envolvido em diversas funções participando ativamente na espermatogênese, manutenção da imunidade inata, metabolismo do colágeno e, interessantemente, na captação de iodeto pelos tecidos tiroidianos, pois a deficiência em ácido ascórbico pode causar sérios problemas de hipotireoidismo (Lovell, 2000). A nível produtivo, o papel fisiológico desse composto se traduz em aumentos no crescimento, maturação sexual, fecundidade, número de leucócitos e resistência a patógenos (Lovell, 2000).

Por outro lado, compostos como carotenoides, apesar de não serem nutrientes essenciais para todos os organismos de interesse produtivo, no caso do carotenóide astaxantina, além de ser considerado como nutriente essencial para alguns crustáceos (Torrissen e Christiansen, 1995) tem apresentado outras vantagens diante sua suplementação, principalmente contra o dano oxidativo em lipídios, em espécies como de salmonídeos e crustáceos, como o *Litopennaeus vanamei*, apesar das taxas de absorção de astaxantina são baixas (12%) sua estabilidade nos tecidos favorece e otimiza o efeito da sua suplementação (Bjerkeng, 2008). Interessantemente, o uso de carotenóides na aquicultura começou como uma alternativa para acentuar a coloração em animais ornamentais, assim como da carne em salmonídeos (Bjerkeng, 2008; de Carvalho e Caramujo, 2017). Além disso, tem sido observado que a sua suplementação, principalmente nos primeiros estágios de vida, pode promover o desenvolvimento e sobrevivência dos animais, justificando o enriquecimento

do alimento vivo com este composto, a fim de potencializar o desempenho dos animais em fases larvais (Bjerkeng, 2008; Torrissen e Christiansen, 1995).

A respeito dos polifenóis, um dos compostos que mais sobressaem dentro deste grupo é a quercetina, um flavonóide testado em várias espécies aquícolas e que demonstrou promover respostas benéficas no crescimento, conversão alimentar, capacidade antioxidante, conteúdo de aminoácidos em carne, diminuição de triglicerídeos em plasma, diminuição na peroxidação lipídica, atividade das enzimas digestivas e sistema imune (Ahmadifar et al., 2021; Taştan e Salem, 2021). Um dos exemplos do potencial das isoflavonas como regulador da resposta endócrina pode ser evidenciado nos efeitos da genisteína (possivelmente como modulador de vias de sinalização de estrógenos), onde em machos da espécie *Oncorhynchus mykiss* foi observada um pequeno, porém constante, aumento na síntese de vitelogenina, uma diminuição na concentração de testosterona, acelerado desenvolvimento testicular junto com à uma diminuição da concentração espermática no momento da desova. Já em fêmeas, houve também um aumento da síntese de vitelogenina e diminuição dos níveis de testosterona, assim como da oogênese (Ahmadifar et al., 2021).

6. Acido lipoico e Acetado como moduladores do catabolismo e o anabolismo

Outro antioxidante testado frequentemente em diversas espécies é o ácido lipóico (LA) (da Silva Martins et al., 2014; Giustina et al., 2020; Huang et al., 2019; Jiménez-Lamana e Slaveykova, 2016; Kütter et al., 2013). Quimicamente é um organossulfurado, possuindo ou uma ponte dissulfeto no seu estado oxidado ou dois grupos tiol dentro da sua estrutura, quando reduzido na forma de ácido diidrolipoico (DHLA) (Salehi et al., 2019). O LA possui um centro quiral do qual derivam-se dois isômeros óticos R e S-ácido lipóico, embora o isômero S-LA não esteja presente na natureza (Salehi et al., 2019). O LA está

presente de maneira ubíqua na natureza sendo sintetizado por bactérias, fungos, plantas e animais (Salehi et al., 2019). Bioquimicamente, esse composto participa no ciclo de Krebs como coenzima da PDC na unidade protéica PDH e da α cetoglutarato desidrogenase, ambas com uma grande importância na produção de energia (Usacheva et al., 2022). Apesar da síntese do LA ser feita a partir da cisteína e de ácidos graxos, a maior parte dele provém da dieta (Usacheva et al., 2022). Como antioxidante, atua como removedor de ROS quando se encontra na forma DHLA, que possui também a opção de regenerar outros antioxidantes da sua forma oxidada, como o ácido ascórbico e o tocoferol (Packer et al., 1995). Existe abundante evidência do LA como modulador da síntese de proteínas de importância na produção de energia e função antioxidante, isto pode estar relacionado a duas possíveis características, à capacidade do DHLA de reduzir grupos tiólicos de proteínas em regiões que sofrem regulação redox, da mesma maneira quando suplementado o LA, este rapidamente pode ser reduzido para DHLA através a oxidação do NADH na célula, o que pode provocar diminuições temporais da capacidade redutora da célula, predispondo-a para a ativação de vias relacionadas à síntese de defesas antioxidantes em paralelo a vias para a produção de energia devido à importância do NADH em ambos processos (Yang et al., 2014b).

O LA seguindo o anterior, realiza uma regulação positiva do sistema antioxidante agindo como pro-oxidante durante sua redução intracelular, o qual condiz com a evidência existente que vincula a suplementação com LA e a ativação e liberação da Nrf2 para o núcleo (Pilar Valdecantos et al., 2015; Yang et al., 2014b). Adicionalmente, ao mesmo tempo em que o LA reduz as concentrações relativas de NADH (Haramaki et al., 1997) num processo homólogo ao estresse oxidativo, também são ativadas vias envolvidas na produção de energia possivelmente pela ativação de sirtunas como a SIRT1 diante do incremento de NAD^+ , que por sua vez promove a ativação de AMPK cinases como a

LKB1, a qual é alvo de desacetilação da SIRT1 (Ruderman et al., 2010). Desta maneira ocorre, mediado pela ativação da AMPK, a inibição da gluconeogênese, lipogênese e síntese proteica enquanto são reguladas positivamente vias destinadas à oxidação de substratos energéticos (Hardie et al., 2012). Paradoxalmente, o LA quando suplementado tem demonstrado diminuir a utilização de aminoácidos, por exemplo ramificados, como fonte de energia, isso estaria apontando à uma possível capacidade do LA para diminuir a necessidade proteica dos animais através do aumento na eficiência proteica (Shi et al., 2018). Neste ponto é importante reiterar o papel dos aminoácidos ramificados não só como substratos energéticos, mas também como ativadores da via da Mtor, uma vez que a suplementação com LA, além de representar uma promoção do catabolismo oxidativo (Nie et al., 2018), poderia chegar a promover a ativação da mTOR com a preservação de aminoácidos ramificados, isso deveria acontecer em determinadas concentrações de LA nas que a regulação positiva da AMPK não se torna um fator de inibição do anabolismo (Lv et al., 2014; Shi et al., 2018).

Uma vez que é fundamental, dentro da aquicultura, diminuir as taxas de produção de energia a partir dos aminoácidos, existe também a preocupação de que uma excessiva utilização do lipídio, como fonte de energia, pode ir em detrimento do rendimento alimentar dos animais. (Ding et al., 2022a; Wang et al., 2010). Isto somado ao fato do lipídio ser proveniente das mesmas matérias-primas de origem animal extraídas do meio aquático natural que a proteína (Olsen, 2011). No entanto, retomando a evidência sobre a regulação redox que sofrem os tióis dos receptores insulínicos, é possível assumir que o LA ou o DHLA podem promover, em organismo aquáticos, a utilização de glicose como fonte de energia (Yang et al., 2014a). Acerca disso, existe evidência experimental que sugere fortemente que o LA pode estimular a captação da glicose circulante promovendo a glicólise (Moini et al., 2002). No camarão *Macrobrachium nipponese*, por exemplo,

observou-se com a suplementação com LA uma regulação positiva da atividade das enzimas hexokinase, fosfofructokinase e PDH, todas vinculadas à glicólise (Ding et al., 2022b; Xiong et al., 2022). Embora não tenham sido encontradas diferenças no ganho de peso dos animais na concentração de 700 mg Kg⁻¹ de LA, houve um incremento significativo da sobrevivência quando comparados com os animais que não receberam LA, no entanto na concentração de 1400 mg Kg⁻¹ de LA esta diferença desapareceu uma vez que o ganho de peso diminuiu significativamente (Ding et al., 2022b). Por outro lado, no peixe *Cyprinus carpio* foi observado que a adição de LA em dietas com altos teores de glicose promoveu o ganho de peso, diminuindo os efeitos negativos da alimentação com dietas com um índice glicêmico alto (Santos et al., 2016). Existem vários trabalhos sobre o uso do LA a nível experimental na aquicultura, no entanto a utilização e difusão do LA como aditivo em rações para organismo aquático, depende do consenso sobre seu efeito na fisiologia produtiva do animal, para isto a utilização de ferramentas estatísticas que permitam uma análise quantitativa da informação científica disponível pode ser uma opção que permita o estabelecimento de estratégias e objetivos para a suplementação com LA (Kelley e Kelley, 2019). Em contraste com os resultados obtidos com animais aquáticos, em humanos têm se chegado a alguns consensos sobre os efeitos do LA na fisiologia e saúde das pessoas. Para isso foram utilizadas abordagens meta-analíticas onde é compilada a informação disponível sobre o efeito de um composto ou fármaco em variáveis resposta de interesse nutricional e clínico (Kelley e Kelley, 2019; MAK et al., 2010). A utilização deste tipo de ferramentas na produção animal ainda é incipiente, devido à complexidade e diversidade dos sistemas trabalhados, no entanto, pranteiam possibilidades metodológicas claras para o fortalecimento da aquicultura e da nutrição de organismo aquáticos como práticas de precisão (Tey e Brindal, 2022).

A nutrição de precisão, segundo Zhang et al. (2020), faz referência à todas as estratégias que permitam suprir as necessidades nutricionais de uma espécie de maneira ótima, tendo em conta o ambiente e ontogenia do animal, para isto a nutrição deve ser avaliada como um conjunto de fatores que abrangem, o manejo alimentar, o metabolismo (bioquímica e bioenergeticamente), qualidade do produto (e.g. carne) e infraestrutura de criação e suporte. A proposta de utilizar suplementos nutricionais dentro da aquicultura pretende abordar os desafios que apresenta otimizar o manejo alimentar e metabólico dos animais com fins produtivos (Zhang et al., 2020). No caso específico do LA, este surge como possibilidade para diminuir o requerimento protéico dos animais a partir do controle metabólico da dieta, no entanto, apesar do LA poder promover a utilização de glicose como fonte de energia, em vários trabalhos, têm se apresentado a diminuição dos teores de lipídio na carcaça, prejudicando o desempenho produtivo dos animais (Huang et al., 2019; Kütter et al., 2012; Shi et al., 2018). Embora isso possa estar relacionado à dose e a espécie utilizada, como apontam os resultados obtidos por Kütter et al. (2012), é possível pensar que uma suplementação ou reconfiguração da dieta para o aumento do aporte energético, somado à diminuição do catabolismo proteico, poderia se potencializar o efeito do LA como interagente com a dieta fornecida. Com base nisto, tem se testado estratégias nutricionais como o aumento do conteúdo de lipídio e carboidrato na dieta (Ding et al., 2022b; Li et al., 2012; Shi et al., 2017, 2018; Xu et al., 2018), no entanto estas tentativas têm sido, em alguns casos, pouco produtivas, uma vez que a inclusão não representou uma diferença significativa sobre o desempenho ou foi em detrimento deste (Ding et al., 2022b; Huang et al., 2019). As causas desses resultados podem ser variadas, como a dose de LA, a espécie trabalhada e a composição da dieta (Medeiros et al., 2017; Terjesen et al., 2004). Medeiros et al. (2017), por exemplo, pode estar aportando evidência sobre as possíveis interações do LA com a composição da dieta, no trabalho utilizando a espécie *Piaractus*

mesopotamicus alimentada com diferentes fontes de lipídio: óleo de soja (SBO), óleo de linhaça (LO) e uma mistura de partes iguais de óleo de sésamo (SSO) e LO. Os autores não evidenciaram um efeito do LA sobre o ganho de peso, focando na estocagem de lipídio, apesar de que não foram encontrados efeitos significativos do tipo de óleo e do LA sobre o conteúdo lipídico. Quando calculado o componente de interação entre LA e o tipo de óleo, foi encontrado um efeito estatisticamente significativo deste. Os animais alimentados com a dieta SSO+LO apresentaram aumento do conteúdo lipídico quando suplementados com LA em comparação ao grupo que recebeu LO sem a presença de LA dentro da dieta, isso sugere que o efeito fisiológico do LA pode estar regulado pela composição da dieta consumida.

Mesmo que o aumento do lipídio e o carboidrato na dieta são alternativas razoáveis para potenciar o efeito do LA, diminuindo a utilização da proteína como fonte de energia, é possível pensar em outros compostos. O acetato, por exemplo, é um ácido graxo de cadeia curta que é suscetível a ser utilizado como fonte de energia. Após sua ativação para a formação de acetil CoA, em uma reação ATP dependente catalisada por enzimas da família das Acil CoA sintetase (Hernández et al., 2019; Schug et al., 2016), pode entrar na mitocôndria participando como substrato no ciclo Krebs para a formação de energia. Ademais, como sugere o trabalho de Huggins (1969), pode ser utilizado em reações anapleróticas, onde a suplementação de indivíduos adultos de *Artemia salina*. com ^{14}C acetato mostrou a presença de radioatividade em compostos como como citrato, succinato e malato, todos intermediários do ciclo de Krebs, indicando que de maneira direta ou indireta o acetato pode ser utilizado de maneira diversa pelo organismo (Huggins, 1969). Além disso, por ter se apresentado como precursor do citrato e malato poderia chegar a promover a síntese de lipídio como foi achado no cladocero, *Daphnia magna* e no copépodo *Cyclops strenus*, onde a adição de acetato $1\text{-}^{14}\text{C}$ na água de criação, mostrou nos

animais coletados, radioatividade distribuída por vários metabólitos lipídicos incluindo fosfolipídios, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, ácidos graxos livre e colesterol (Farkas et al., 1981). Interessantemente, o acetato radioativo também aportou carbono para a síntese de alanina, ácido glutâmico, glutamina e prolina em *Artemia* sp. indicando que este, também pode servir de substrato para a síntese de aminoácidos (Huggins, 1969), mesmo que esses resultados não sejam diretamente transponíveis à vertebrados ou a outros tipos de crustáceos como camarões, é possível pensar que alguns destes processos podem acontecer de maneira análoga nestes organismos. Alguns trabalhos com acetato como suplemento nutricional apresentam, no caso do *Danio rerio*, melhoras no desempenho zootécnico aumentando o ganho de peso e o conteúdo calórico da carcaça dos animais com eficiências alimentares equiparáveis ao controle (Zhang et al., 2020). Por outro lado, em *Litopennaeus vanamei*, tem se observado que o acetato de sódio pode, pelo menos, promover a taxa específica de crescimento quando comparado com animais não suplementados (Silva et al., 2016). No entanto, o trabalho de Silva et al. (2016) apresenta um panorama ainda mais promissor sobre a utilização de outros sais orgânicos como fumarato, succinato, butirato, e propionato de sódio os quais promoveram em *L. vannamei* melhora no peso final dos animais, taxa específica de crescimento e conversão alimentar, inclusive acima do que o acetato de sódio conseguiu. Mesmo que neste trabalho pressupõe-se os efeitos observados como a consequência de incrementos da enzimática digestiva e função intestinal, também é importante reconhecer o possível papel que esses compostos possam ter como substratos e moduladores do metabolismo energético.

LA e acetato juntos, experimentalmente podem aportar evidências sobre os efeitos da promoção simultânea de vias antagônicas, as quais são reguladas de maneira cíclica por ritmos biológicos endógenos ou exógenos (Ramanathan et al., 2018). Sob este conceito, uma estratégia para a aquicultura deveria estar focada no aumento da amplitude do período

do ritmo biológico sem modificar sua frequência entendida, neste caso, como o número de períodos. Assumindo que vias de sinalização, como a de AMPK, cuja ativação ocorre em situações de baixa disponibilidade de energia, ou de mTOR a qual é promovida por um status energético alto, é claro que seus perfis de ativação deveriam ter uma grande ingerência sobre o comportamento produtivo de um animal. A promoção de maneira simultânea ou de maneira separada e em sincronia com os ciclos biológicos do animal poderiam incrementar as respostas de cada via sem fugir de situações de homeostase (Figura 1) (Alam et al., 2020; Inoki et al., 2012).

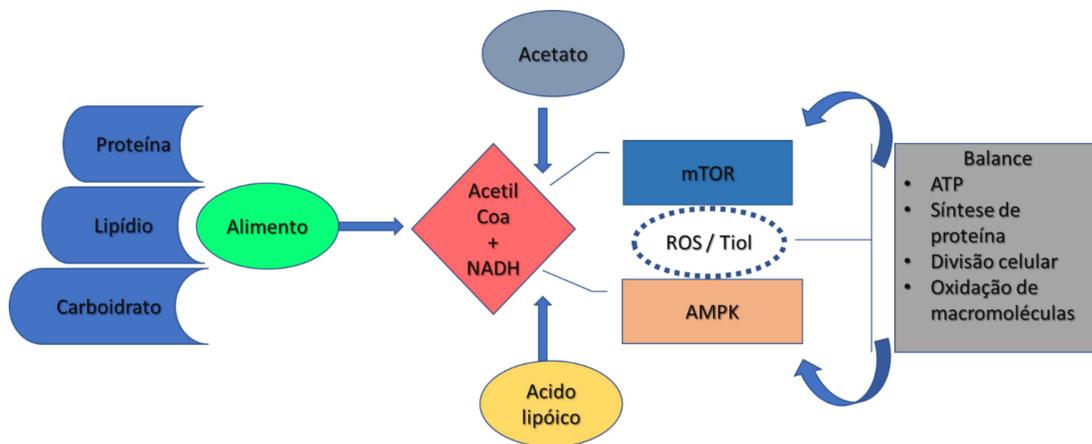
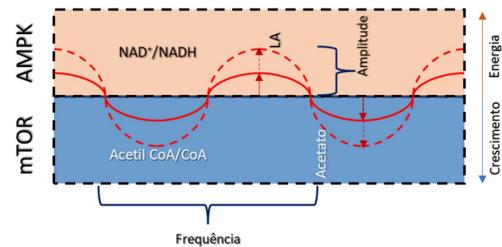


Figura 1. Modulações dos ciclos biológicos pelo ácido lipóico (LA) e o acetato através das vias de sinalização da AMPK e mTOR e amplificação dos ciclos biológicos. Dependendo do ciclo biológico a célula, órgão tecido ou organismo prioriza as funções de produção de energia ou de síntese proteica. Estímulos gerados com o LA deveriam amplificar vias para a produção de energia, para depois biologicamente derivar em processos de síntese amplificados pelo acetato. Estes mecanismos dependem de diversos fatores como a composição nutricional da dieta, concentrações de acetato e LA fornecido e a capacidade destes de influir nas concentrações de metabólitos/mensageiros como são o acetil CoA e o NADH.

Mecanicamente nesta combinação, teríamos ao LA promovendo a produção de energia através da AMPK, após o aumento das concentrações relativas de NAD⁺, concomitantemente à ativação das sirtuínas (Yang et al., 2014b), enquanto isso o acetato deveria ser transformado em acetil CoA, neste ponto é possível assumir que indireta e diretamente os dois processos estão promovendo a ativação da AMPK (Maruta et al., 2016). No entanto, o aumento do acetil CoA deveria acabar inibindo o catabolismo de macromoléculas de modo que com os aumentos de NADH, a partir de acetil CoA no ciclo de Krebs, deveriam causar uma regulação negativa sobre as sirtuínas, permitindo o aumento da atividade das acetiltransferases (Shi e Tu, 2015), que por sua vez se articularia à via da mTOR cuja ativação é dependente, principalmente, da transdução da sinalização endócrina de hormônio de crescimento. Além disso, pode ocorrer também por uma alta disponibilidade de aminoácidos ramificados provenientes da dieta (Matsumura et al., 2005), os quais são preservados pela ação do LA como a partir da regulação positiva do catabolismo β oxidativo e glicolítico (Huang et al., 2020) e pela ação do acetato através do aumento das concentrações relativas de acetil CoA (Acetil CoA/CoA) (Shi e Tu, 2015).

Desta forma, a ativação da mTOR finalmente deveria promover o crescimento e o desempenho produtivo (Moriasa et al., 2022). Outra possível situação é o acetato ser uma fonte de energia efetiva, é também um composto de fácil absorção (Fleming et al., 1991) pelo qual a diferença entre a energia bruta e digestível deste composto poderia ser desconsiderada, isto implicaria um aumento da energia digestível total da dieta e da eficiência energética dos animais em situações em que o acetato é utilizado como substituto de outras fontes de energia (Bakke et al., 2010; Schrama et al., 2018).

A integração do LA e o acetato é só um exemplo do que poderiam chegar a ser formulações de pre-mixes meta-nutricionais que amoldem o metabolismo do animal e o programem epigeneticamente para a produção. Por exemplo, compostos adicionais como a betaina ou a colina, podem ser utilizadas como preservadoras da metionina na sua função de doar grupos metilo, assim a suplementação da colina, por exemplo, pode beneficiar a sinalização epigenética do organismo, diminuir a necessidade nutricional por metionina ao mesmo tempo que é beneficiada a síntese de metabólitos dependentes de grupos metilo, como a creatinina e a carnitina (Eklund et al., 2005; Khosravi et al., 2015; Marín-García e Llobat, 2021).

Talvez a maior importância da combinação do acetato e o LA, entre outras possíveis opções, é o potencial que estes apresentam para aumentar a taxa de incorporação de biomassa, m (da equação $dWt/dt = HWt^m - KWt^n$) no caso do acetato, limitando as taxas de derivação de nutrientes provenientes da dieta para sua transformação em acetil CoA ao mesmo tempo que este permite a acetilação de histonas (expressão gênica) (Shi e Tu, 2015) e síntese proteica. Enquanto o LA, além dos efeitos observados sobre o metabolismo energético, segundo a evidência de sua capacidade protetiva contra o dano oxidativo, poderia levar à diminuição de n por mecanismos como a diminuição da ubiquitinação e degradação proteasomal de proteína oxidadas ao mesmo tempo que regula negativamente

processos relacionados com a inflamação, isto significaria um menor investimento de energia na ressíntese de proteínas degradadas (Keller, 2006) permitindo a utilização de aminoácidos disponíveis para a síntese proteica, proliferação celular e crescimento (Marchingo e Cantrell, 2022).

Experimentalmente, dentro do que conhecemos, não existem trabalhos que tenham testado a integração destes compostos, no entanto, para esse tipo de experimento é preciso, primeiramente, desenvolver estratégias metodológicas que diminuam as possíveis fontes de erro experimental por fatores como a própria interação destes compostos com a dieta, como já foi mencionado no caso do LA. Uma possível alternativa, pode ser a utilização de sujeitos experimentais em fases nas que ainda contam com o vitelo como principal fonte de nutrientes. Usando como sujeitos experimentais embriões de *Danio rerio*, observou-se que a suplementação com LA promove a taxa de eclosão, proliferação celular pós-eclosão somado a um incremento do hormônio de crescimento fibroblástico, também se achou um incremento da atividade da SOD (Francis et al., 2012). Apesar disso não houve diferenças no consumo de vitelo (avaliado como a relação entre a área do saco vitelino e o comprimento do animal) entre os tratamentos, o qual segundo os resultados obtidos pode indicar um uso mais eficiente dos nutrientes disponíveis (Francis et al., 2012), onde o LA deve estar ou diminuindo o investimento energético para limitar a ação pró-oxidante de produtos gerados pelo metabolismo acelerado, ou redistribuindo os nutrientes limitando a utilização de proteína como fonte de energia e permitindo o redirecionamento desta para o crescimento. Mais evidências são necessárias para estabelecer como o LA pode atuar em condições nas que é possível assumir uma disponibilidade de nutrientes ajustados ao requerimento da espécie.

Apesar do *Danio rerio* ser um animal amplamente utilizado como modelo na aquicultura, existem grandes diferenças entre o metabolismo de teleósteos e outros animais, como os

crustáceos, pelo qual uma avaliação mais detalhada sobre o efeito do LA em animais aquáticos durante a fase vitelínica é necessária para estabelecer protocolos e métodos de suplementação de meta-nutrientes em dietas para animais aquáticos.

Referências

Agafontsev, A.M., Ravi, A., Shumilova, T.A., Oshchepkov, A.S., Kataev, E.A., 2019. Molecular receptors for recognition and sensing of nucleotides. *Chemistry – A European Journal* 25, 2684–2694. doi:<https://doi.org/10.1002/chem.201802978>

Ahmad, I., Ahmed, I., Fatma, S., Peres, H., 2021. Role of branched-chain amino acids on growth, physiology and metabolism of different fish species: A review. *Aquaculture Nutrition* 27, 1270–1289. doi:<https://doi.org/10.1111/anu.13267>

Ahmadifar, E., Yousefi, M., Karimi, M., Raieni, R.F., Dadar, M., Yilmaz, S., Dawood, M.A.O., Abdel-Latif, H.M.R., 2021. Benefits of dietary polyphenols and polyphenol-rich additives to aquatic animal health: An overview. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 29, 478–511. doi:[10.1080/23308249.2020.1818689](https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1818689)

Alam, M.S., Liang, X.-F., Liu, L., 2020. Indirect effect of different dietary protein to energy ratio of bait fish mori diets on growth performance, body composition, nitrogen metabolism and relative AMPK & mTOR pathway gene expression of Chinese perch. *Aquaculture Reports* 16, 100276. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100276>

Alamdari, N., Aversa, Z., Castellero, E., Hasselgren, P.-O., 2013. Acetylation and deacetylation- novel factors in muscle wasting. *Metabolism - Clinical and Experimental* 62, 1–11. doi:[10.1016/j.metabol.2012.03.019](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.03.019)

- Bakke, A.M., Glover, C., Krogh, A., 2010. Feeding, digestion and absorption of nutrients, in: Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *The Multifunctional Gut of Fish, Fish Physiology*. Academic Press, pp. 57–110. doi:[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03002-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03002-5)
- Ballantyne, J.S., 2001. Amino acid metabolism, in: *Nitrogen Excretion, Fish Physiology*. Academic Press, pp. 77–107. doi:[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)20004-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20004-1)
- Barford, D., 2004. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Current Opinion in Structural Biology* 14, 679–686. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.09.012>
- Birkett, S., Lange, K. de, 2001. Limitations of conventional models and a conceptual framework for a nutrient flow representation of energy utilization by animals. *British Journal of Nutrition* 86, 647–659. doi:[10.1079/BJN2001441](https://doi.org/10.1079/BJN2001441)
- Bjerkeng, B., 2008. Carotenoids in aquaculture: Fish and crustaceans, in: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.), *Carotenoids: Volume 4: Natural Functions*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 237–254. doi:[10.1007/978-3-7643-7499-0_12](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-7499-0_12)
- Bolisetty, S., Jaimes, E.A., 2013. Mitochondria and reactive oxygen species: Physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6306–6344. doi:[10.3390/ijms14036306](https://doi.org/10.3390/ijms14036306)
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J.M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2012. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling* 8, 343–357. doi:[10.1007/s11302-012-9305-8](https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8)

Bora, J., Tongbram, T., Mahnot, N., Mahanta, C.L., Badwaik, L.S., 2022. Chapter 14 - Tocopherol, in: Kour, J., Nayik, G.A. (Eds.), *Nutraceuticals and Health Care*. Academic Press, pp. 259–278. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89779-2.00008-9>

Boratyński, Z., Koskela, E., Mappes, T., Schroderus, E., 2013. Quantitative genetics and fitness effects of basal metabolism. *Evolutionary Ecology* 27, 301–314. doi:[10.1007/S10682-012-9590-2/FIGURES/3](https://doi.org/10.1007/S10682-012-9590-2/FIGURES/3)

Bradshaw, P.C., 2021. Acetyl-CoA metabolism and histone acetylation in the regulation of aging and lifespan. *antioxidants* (Basel, Switzerland) 10. doi:[10.3390/antiox10040572](https://doi.org/10.3390/antiox10040572)

Browne, R.A., 2018. *Artemia Biology*. CRC Press.

Carter, B., Zhao, K., 2021. The epigenetic basis of cellular heterogeneity. *Nature Reviews Genetics* 22, 235–250. doi:[10.1038/s41576-020-00300-0](https://doi.org/10.1038/s41576-020-00300-0)

Carter, C.G., Houlihan, D.F., 2001. Protein synthesis, in: *Nitrogen Excretion, Fish Physiology*. Academic Press, pp. 31–75. doi:[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)20003-X](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20003-X)

Cavallo, A., Peck, L.S., 2020. Lipid storage patterns in marine copepods: Environmental, ecological, and intrinsic drivers. *ICES Journal of Marine Science* 77, 1589–1601. doi:[10.1093/icesjms/fsaa070](https://doi.org/10.1093/icesjms/fsaa070)

Cerqueira, M., Schrama, D., Silva, T.S., Colen, R., Engrola, S.A.D., Conceição, L.E.C., Rodrigues, P.M.L., Farinha, A.P., 2020. How tryptophan levels in plant-based aquafeeds affect fish physiology, metabolism and proteome. *Journal of Proteomics* 221, 103782. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103782>

Chen, Q., Liu, Q., Hao, T., Cui, K., Zhao, Z., Mai, K., Ai, Q., 2022. Long-chain fatty acids regulate SIRT3 expression by affecting intracellular NAD⁺ levels in large yellow croaker

(*Larimichthys crocea*). *Aquaculture* 553, 738015.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738015>

Cho, D., Mier, J.W., Atkins, M.B., 2009. PI3K/Akt/mTOR Pathway: A Growth and Proliferation Pathway, in: Bukowski, R.M., Figlin, R.A., Motzer, R.J. (Eds.), *Renal Cell Carcinoma: Molecular Targets and Clinical Applications*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 267–285. doi:[10.1007/978-1-59745-332-5_15](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-332-5_15)

Clegg, J.S., 1965. The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 14, 135–143. doi:[https://doi.org/10.1016/0010-406X\(65\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0010-406X(65)90014-9)

Clegg, J.S., Trotman, C.N.A., 2002. Physiological and biochemical aspects of *Artemia* Ecology, in: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J S, Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia: Basic and Applied Biology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 129–170. doi:[10.1007/978-94-017-0791-6_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0791-6_3)

Connell, J.H., Orias, E., 1964. The ecological regulation of species diversity. *The American Naturalist* 98, 399–414. doi:[10.1086/282335](https://doi.org/10.1086/282335)

Cowan, K.J., 2004. The mitochondria: Powerhouse of the cell, in: *Functional Metabolism*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 211–241. doi:<https://doi.org/10.1002/047167558X.ch8>

Croft, K.D., 2016. Dietary polyphenols: AntioxidForman,

H.J., Davies, K.J.A., Ursini, F., 2014. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 66, 24–35. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.014>

Cunchillos, C., Lecointre, G., 2003. Evolution of amino acid metabolism inferred through cladistic analysis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47960–47970. doi:10.1074/jbc.M213028200

da Silva Martins, Á.C., Flores, J.A., Junior, W.W., Zanette, J., Primel, E.G., Caldas, S.S., Monserrat, J.M., 2014. Modulation of antioxidant and detoxification responses induced by lipoic acid in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) subjected to hypoxia and re-oxygenation. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 47, 335–348. doi:10.1080/10236244.2014.940702

Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 174–181. doi:https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007

de Carvalho, C.C.C.R., Caramujo, M.J., 2017. Carotenoids in aquatic ecosystems and aquaculture: A colorful business with implications for human health. *Frontiers in Marine Science* 4. doi:10.3389/fmars.2017.00093

Dhont, J., Van Stappen, G., 2003. Biology, tank production and nutritional value of *Artemia*, in: *Live Feeds in Marine Aquaculture*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 65–121. doi:https://doi.org/10.1002/9780470995143.ch3

Dietz, C., Kroeckel, S., Schulz, C., Susenbeth, A., 2012. Energy requirement for maintenance and efficiency of energy utilization for growth in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.): The effect of strain and replacement of dietary fish meal by wheat gluten. *Aquaculture* 358–359, 98–107. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2012.06.028

Ding, Z., Xiong, Y., Zheng, J., Zhou, D., Kong, Y., Qi, C., Liu, Y., Ye, J., Limbu, S.M., 2022a. Modulation of growth, antioxidant status, hepatopancreas morphology, and carbohydrate metabolism mediated by alpha-lipoic acid in juvenile freshwater prawns

Macrobrachium nipponense under two dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 546. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737314

Ding, Z., Xiong, Y., Zheng, J., Zhou, D., Kong, Y., Qi, C., Liu, Y., Ye, J., Limbu, S.M., 2022b. Modulation of growth, antioxidant status, hepatopancreas morphology, and carbohydrate metabolism mediated by alpha-lipoic acid in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium nipponense* under two dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 546, 737314. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737314

Dou, L., Chen, Y.-F., Cowan, P.J., Chen, X.-P., 2018. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 188, 67–73. doi:10.1016/j.clim.2017.12.006

Dröge, W., 2005. Oxidative enhancement of insulin receptor signaling: Experimental findings and clinical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 1071–1077. doi:10.1089/ars.2005.7.1071

Dunson, W.A., Travis, J., 2015. The role of abiotic factors in community organization. *The American Naturalist* 138, 1067-1091. <https://doi.org/10.1086/285270> 138, 1067–1091. doi:10.1086/285270

Eklund, M., Bauer, E., Wamatu, J., Mosenthin, R., 2005. Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutrition Research Reviews* 18, 31–48. <https://doi.org/10.1079/NRR200493>

El-Sayed, A.-F.M., Izquierdo, M., 2022. The importance of vitamin E for farmed fish—A review. *Reviews in Aquaculture* 14, 688–703. <https://doi.org/10.1111/raq.12619>

- Essington, T.E., Kitchell, J.F., Walters, C.J., 2001. The von Bertalanffy growth function, bioenergetics, and the consumption rates of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 2129–2138. <https://doi.org/10.1139/f01-151>
- Farkas, T., Kariko, K., Csengeri, I., 1981. Incorporation of [1-14C] acetate into fatty acids of the crustaceans *Daphnia magna* and *Cyclops strenus* in relation to temperature. *Lipids* 16, 418–422. <https://doi.org/10.1007/BF02535008>
- Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., Levine, A.J., 2007. The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Research* 67, 3043–3053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4149>
- Fleming, S.E., Choi, S.Y., Fitch, M.D., 1991. Absorption of short-chain fatty acids from the rat cecum *in vivo*. *The Journal of Nutrition* 121, 1787–1797. <https://doi.org/10.1093/jn/121.11.1787>
- Forman, H.J., Davies, K.J.A., Ursini, F., 2014. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine* 66, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045>
- Francis, S., Delgoda, R., Young, R., 2012. Effects of embryonic exposure to α -lipoic acid or ascorbic acid on hatching rate and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Research* 43, 777–788. <https://doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02889.x>
- Froese, R., Pauly, D., 2000. FishBase 2000: Concepts, designs and data sources, ICLARM contribution. ICLARM.

Garant, M.J., Kole, S., Maksimova, E.M., Bernier, M., 1999. Reversible change in thiol redox status of the insulin receptor α -subunit in intact cells. *Biochemistry* 38, 5896–5904. <https://doi:10.1021/bi982844p>

Giustina, A.D., de Souza Goldim, M.P., Danielski, L.G., Garbossa, L., Junior, A.N.O., Cidreira, T., Denicol, T., Bonfante, S., da Rosa, N., Fortunato, J.J., Palandi, J., de Oliveira, B.H., Martins, D.F., Bobinski, F., Garcez, M., Bellettini-Santos, T., Budni, J., Colpo, G., Scaini, G., Giridharan, V. V, Barichello, T., Petronilho, F., 2020. Lipoic acid and fish oil combination potentiates neuroinflammation and oxidative stress regulation and prevents cognitive decline of rats after sepsis. *Molecular Neurobiology* 57, 4451–4466 <https://doi:10.1007/s12035-020-02032-y>

Gladyshev, M.I., Arts, M.T., Sushchik, N.N., 2009. Preliminary estimates of the export of omega-3 highly unsaturated fatty acids (EPA+DHA) from aquatic to terrestrial ecosystems, in: Kainz, M., Brett, M.T., Arts, Michael T (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 179–210. https://doi:10.1007/978-0-387-89366-2_8

Gnaiger, E., 2020. Mitochondrial pathways and respiratory control. *Bioenergetics Communications* 2020, 2–2. <https://doi:10.26124/BEC:2020-0002>

Gordon, J.L., 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal* 233, 309–319. <https://doi:10.1042/bj2330309>

Guschina, I.A., Harwood, J.L., 2009. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry, in: Kainz, M., Brett, M.T., Arts, M.T. (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–24. https://doi:10.1007/978-0-387-89366-2_1

Gyamfi, D., Ofori Awuah, E., Owusu, S., 2019. Chapter 2 - Lipid Metabolism: An Overview, in: Patel, V.B. (Ed.), *The Molecular Nutrition of Fats*. Academic Press, pp. 17–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811297-7.00002-0>

Halver, J.E., Hardy, R.W., 2003. 14 - Nutrient Flow and Retention, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 755–770. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50015-X>

Haramaki, N., Han, D., Handelman, G.J., Tritschler, H.J., Packer, L., 1997. Cytosolic and mitochondrial systems for NADH- and NADPH-dependent reduction of α -lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 535–542. [https://doi:10.1016/S0891-5849\(96\)00400-5](https://doi:10.1016/S0891-5849(96)00400-5)

Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 251–262. <https://doi:10.1038/nrm3311>

Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 199–218. <https://doi:10.1016/j.tibs.2014.02.002>

Heras, J., Chakraborty, M., Emerson, J.J., German, D.P., 2020. Genomic and biochemical evidence of dietary adaptation in a marine herbivorous fish. *Proceedings of the Royal Society B* 287. <https://doi:10.1098/RSPB.2019.2327>

Hernández, M.A.G., Canfora, E.E., Jocken, J.W.E., Blaak, E.E., 2019. The short-chain fatty acid acetate in body weight control and insulin sensitivity. *Nutrients* 11. <https://doi:10.3390/nu11081943>

Hirata, T., Kaneko, T., Ono, T., Nakazato, T., Furukawa, N., Hasegawa, S., Wakabayashi, S., Shigekawa, M., Chang, M.H., Romero, M.F., Hirose, S., 2003. Mechanism of acid

adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284, 1199–1212. <https://doi:10.1152/AJPREGU.00267.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H60531683011.JPG>
G

Hoseini, S.M., Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., Pagheh, E., Iri, Y., Kor, A., 2020. Effects of dietary tryptophan supplementation and stocking density on growth performance and stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 519, 734908. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734908>

Houlihan, D.F., 1991. Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics, in: *Advances in Comparative and Environmental Physiology: Volume 7*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–43. https://doi:10.1007/978-3-642-75897-3_1

Houten, S.M., Wanders, R.J.A., 2010. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33, 469–477. <https://doi:10.1007/s10545-010-9061-2>

Huang, C.-C., Sun, J., Ji, H., Oku, H., Chang, Z.-G., Tian, J.-J., Yu, E.-M., Xie, J., 2019. Influence of dietary alpha-lipoic acid and lipid level on the growth performance, food intake and gene expression of peripheral appetite regulating factors in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 505, 412–422. <https://doi:10.1016/j.aquaculture.2019.02.054>

Huang, C., Sun, J., Ji, H., Kaneko, G., Xie, X., Chang, Z., Deng, W., 2020. Systemic effect of dietary lipid levels and α -lipoic acid supplementation on nutritional metabolism in zebrafish (*Danio rerio*): focusing on the transcriptional level. *Fish Physiology and Biochemistry* 46, 1631–1644. <https://doi:10.1007/S10695-020-00795-8>

- Huang, D., Lei, Y., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, W., Mai, K., 2019. Protective effects of dietary α -lipoic acid on abalone *Haliotis discus hannai* against the oxidative damage under waterborne cadmium stress. *Aquaculture Nutrition* 25, 263–270. <https://doi:10.1111/ANU.12849>
- Huggins, A.K., 1969. The metabolism of 2-¹⁴C sodium acetate by the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of alterations in salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 29, 439–445. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91763-0](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91763-0)
- Inoki, K., Kim, J., Guan, K.-L., 2012. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 52, 381–400. <https://doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537>
- Iverson, S.J., 2009. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, 281–308. https://doi:10.1007/978-0-387-89366-2_12
- Jackson, D.A., Peres-Neto, P.R., Olden, J.D., 2011. What controls who is where in freshwater fish communities – the roles of biotic, abiotic, and spatial factors. 58, 157-170. <https://doi.org/10.1139/f00-239>.
- Jaenisch, R., Bird, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33, 245–254. <https://doi:10.1038/ng1089>
- Jia, S., Li, X., Zheng, S., Wu, G., 2017. Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish. *Amino Acids* 49, 2053–2063. <https://doi:10.1007/s00726-017-2481-7>

- Jiménez-Lamana, J., Slaveykova, V.I., 2016. Silver nanoparticle behaviour in lake water depends on their surface coating. *Science of the Total Environment* 573, 946–953. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.181>
- Joo, M.S., Kim, W.D., Lee, K.Y., Kim, J.H., Koo, J.H., Kim, S.G., 2016. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. *Molecular and Cellular Biology* 36, 1931–1942. <https://doi:10.1128/MCB.00118-16>
- Judge, A., Dodd, M.S., 2020. Metabolism. *Essays in Biochemistry* 64, 607–647. <https://doi:10.1042/EBC20190041>
- Katz, A., 2022. A century of exercise physiology: key concepts in regulation of glycogen metabolism in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*. <https://doi:10.1007/s00421-022-04935-1>
- Keller, J.N., 2006. Interplay between oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer’s disease. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2006, 12129. <https://doi:10.1155/JBB/2006/12129>
- Kelley, G.A., Kelley, K.S., 2019. Systematic reviews and meta-analysis in nutrition research. *British Journal of Nutrition* 122, 1279–1294. <https://doi:10.1017/S0007114519002241>
- Kennedy, D.O., 2014. Polyphenols and the human brain: Plant “secondary metabolite” ecologic roles and endogenous signaling functions drive benefits. *Advances in Nutrition* 5, 515–533. <https://doi:10.3945/an.114.006320>
- Khosravi, S., Jang, J.-W., Rahimnejad, S., Song, J.-W., Lee, K.-J., 2015. Choline essentiality and its requirement in diets for juvenile parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*).

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 28, 647–653.
<https://doi:10.5713/ajas.14.0532>

Kütter, M.T., Monserrat, J.M., Primel, E.G., Caldas, S.S., Tesser, M.B., 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). Aquaculture 368–369, 29–35.
<https://doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2012.09.010>

Kütter, M.T., Monserrat, J.M., Santos, R.A., Tesser, M.B., 2013. Dose-response effects of the antioxidant α -lipoic acid in the liver and brain of pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). Journal of Applied Ichthyology 29, 1123–1128.
<https://doi:10.1111/jai.12137>

Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2002. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. Fish Physiology and Biochemistry 2002 27:3 27, 179–188. <https://doi:10.1023/B:FISH.0000032725.96481.B8>

Lee, L., Atkinson, D., Hirst, A.G., Cornell, S.J., 2020. A new framework for growth curve fitting based on the von Bertalanffy growth function. Scientific Reports 10, 7953.
<https://doi:10.1038/s41598-020-64839-y>

Lester, N.P., Shuter, B.J., Abrams, P.A., 2004. Interpreting the von Bertalanffy model of somatic growth in fishes: the cost of reproduction. Proceedings. Biological Sciences 271, 1625–1631. <https://doi:10.1098/rspb.2004.2778>

Li, H., Chatzifotis, S., Lian, G., Duan, Y., Li, D., Chen, T., 2022. Mechanistic model based optimization of feeding practices in aquaculture. Aquacultural Engineering 97, 102245.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2022.102245>

- Li, J., Liang, X.-F., Tan, Q., Yuan, X., Liu, L., Zhou, Y., Li, B., 2014. Effects of vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture* 430, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.019>
- Li, P., Gatlin, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.009>
- Li, X., Han, T., Zheng, S., Wu, G., 2021a. Nutrition and functions of amino acids in aquatic crustaceans, in: Wu, G. (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in the Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals*. Springer International Publishing, Cham, pp. 169–198. https://doi:10.1007/978-3-030-54462-1_9
- Li, X., Kazgan, N., 2011. Mammalian sirtuins and energy metabolism. *International Journal of Biological Sciences* 7, 575–587. <https://doi:10.7150/ijbs.7.575>
- Li, X., Li, Z., Liu, J., Murphy, B.R., 2012. Growth, precocity, enzyme activity and chemical composition of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, fed different dietary protein-to-energy ratio diets. *Aquaculture Research* 43, 1719–1728. <https://doi:10.1111/J.1365-2109.2011.02981.X>
- Li, X., Zheng, S., Wu, G., 2021b. Nutrition and functions of amino acids in fish, in: Wu, G. (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in the Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals*. Springer International Publishing, Cham, pp. 133–168. https://doi:10.1007/978-3-030-54462-1_8
- Li, X., Zheng, S., Wu, G., 2020. Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish. *Amino Acids* 52, 671–691. <https://doi:10.1007/s00726-020-02851-2>
- Liemburg-Apers, D.C., Willems, P.H.G.M., Koopman, W.J.H., Grefte, S., 2015. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose

metabolism. Archives of Toxicology 89, 1209–1226.
<https://doi:10.1007/s00204-015-1520-y>

Lovell, R.T., 2000. Dietary requirements for ascorbic acid by warmwater fish. Ascorbic Acid in Aquatic Organisms: Status and Perspectives 97–104.
<https://doi:10.1201/9781420036312>

Lucas, A., Watson, J.J., 2002. Bioenergetics of aquatic animals. Bioenergetics Of Aquatic Animals. <https://doi:10.1201/9781482295313>

Lund, M.N., 2021. Reactions of plant polyphenols in foods: Impact of molecular structure. Trends in Food Science & Technology 112, 241–251.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.056>

Lushchak, V.I., Storey, K.B., 2021. Oxidative stress concept updated: Definitions, classifications, and regulatory pathways implicated. EXCLI Journal 20, 956–967.
<https://doi:10.17179/excli2021-3596>

Lv, C., Wu, C., Zhou, Y., Shao, Y., Wang, G., Wang, Q., 2014. Alpha lipoic acid modulated high glucose-induced rat mesangial cell dysfunction via mTOR/p70S6K/4E-BP1 pathway. International Journal of Endocrinology 2014, 658589. <https://doi:10.1155/2014/658589>

MacRae, T.H., 2016. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. Cell Stress and Chaperones 21, 9–18. <https://doi:10.1007/s12192-015-0635-7>

Mak, A., Cheung, M.W.L., Fu, E.H.Y., Ho, R.C.M., 2010. Meta-analysis in medicine: an introduction. International Journal of Rheumatic Diseases 13, 101–104.
<https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2010.01471.x>

- Marchingo, J.M., Cantrell, D.A., 2022. Protein synthesis, degradation, and energy metabolism in T cell immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 19, 303–315. <https://doi:10.1038/s41423-021-00792-8>
- Marín-García, P.J., Llobat, L., 2021. How does protein nutrition affect the epigenetic changes in pig? A Review. *Animals* 11. <https://doi:10.3390/ani11020544>
- Maruta, H., Yoshimura, Y., Araki, A., Kimoto, M., Takahashi, Y., Yamashita, H., 2016. Activation of AMP-activated protein kinase and stimulation of energy metabolism by acetic acid in L6 myotube cells. *PloS one* 11, e0158055–e0158055. <https://doi:10.1371/journal.pone.0158055>
- Matsumura, T., Morinaga, Y., Fujitani, S., Takehana, K., Nishitani, S., Sonaka, I., 2005. Oral administration of branched-chain amino acids activates the mTOR signal in cirrhotic rat liver. *Hepatology Research* 33, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.07.001>
- Medeiros, A., Segura, J., Oliveira, K., Sussel, F., Oliveira, R., Viegas, E., 2017. Growth performance and chemical composition of pacus (*Piaractus mesopotamicus*) fed with vegetable oil sources and alpha-lipoic acid. *Boletim do Instituto de Pesca* 43, 74–84. [doi:10.20950/1678-2305.2017.74.84](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017.74.84)
- Mittelbach, G.G., Osenberg, C.W., Leibold, M.A., 1988. Trophic relations and ontogenetic niche shifts in aquatic ecosystems, in: Ebenman, B., Persson, L. (Eds.), *Size-Structured Populations*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 219–235.
- Mohn, F., Schübeler, D., 2009. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends in Genetics* 25, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.005>

- Moini, H., Tirosh, O., Park, Y.C., Cho, K.-J., Packer, L., 2002. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 397, 384–391. <https://doi:10.1006/abbi.2001.2680>
- Morandini, L., Ramallo, M.R., Scaia, M.F., Höcht, C., Somoza, G.M., Pandolfi, M., 2019. Dietary l-tryptophan modulates agonistic behavior and brain serotonin in male dyadic contests of a cichlid fish. *Journal of Comparative Physiology A* 205, 867–880. <https://doi:10.1007/s00359-019-01373-x>
- Morange, M., 2009. The central dogma of molecular biology. *Resonance* 14, 236–247. <https://doi:10.1007/s12045-009-0024-6>
- Morisasa, M., Yoshida, E., Futijani, M., Kimura, K., Uchida, K., Kishida, T., Mori, T., Goto-Inoue, N., 2022. Fish protein promotes skeletal muscle hypertrophy via the Akt/mTOR signaling pathways. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 68, 23–31. <https://doi:10.3177/jnsv.68.23>
- Mourente, G., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2007. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiology and Biochemistry* 33, 269–280. <https://doi:10.1007/s10695-007-9139-4>
- Mutalipassi, M., Esposito, R., Ruocco, N., Viel, T., Costantini, M., Zupo, V., 2021. Bioactive compounds of nutraceutical value from fishery and aquaculture discards. *Foods* 10. <https://doi:10.3390/foods10071495>
- Nakamura, M., Bhatnagar, A., Sadoshima, J., 2012. Overview of pyridine nucleotides Review Series. *Circulation Research* 111, 604–610. <https://doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247924>

- Napolitano, G.E., 1999. Fatty Acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems, in: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 21–44. https://doi:10.1007/978-1-4612-0547-0_3
- Nativio, R., Lan, Y., Donahue, G., Sidoli, S., Berson, A., Srinivasan, A.R., Shcherbakova, O., Amlie-Wolf, A., Nie, J., Cui, X., He, C., Wang, L.-S., Garcia, B.A., Trojanowski, J.Q., Bonini, N.M., Berger, S.L., 2020. An integrated multi-omics approach identifies epigenetic alterations associated with Alzheimer’s disease. *Nature Genetics* 52, 1024–1035. <https://doi:10.1038/s41588-020-0696-0>
- Neinast, M., Murashige, D., Arany, Z., 2019. Branched chain amino acids. *Annual Review of Physiology* 81, 139–164. <https://doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114455>
- Nie, C., He, T., Zhang, W., Zhang, G., Ma, X., 2018. Branched chain amino acids: Beyond nutrition metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 954. <https://doi:10.3390/ijms19040954>
- Nie, J., Yu, Z., Yao, D., Wang, F., Zhu, C., Sun, K., Aweya, J.J., Zhang, Y., 2020. *Litopenaeus vannamei* sirtuin 6 homolog (LvSIRT6) is involved in immune response by modulating hemocytes ROS production and apoptosis. *Fish & Shellfish Immunology* 98, 271–284. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.029>
- Nobre, A.M., Valente, L.M.P., Conceição, L., Severino, R., Lupatsch, I., 2019. A bioenergetic and protein flux model to simulate fish growth in commercial farms: Application to the gilthead seabream. *Aquacultural Engineering* 84, 12–22. <https://doi.org/10.1016/J.AQUAENG.2018.11.001>
- Nogueiras, R., Habegger, K.M., Chaudhary, N., Finan, B., Banks, A.S., Dietrich, M.O., Horvath, T.L., Sinclair, D.A., Pfluger, P.T., Tschöp, M.H., 2012. Sirtuin 1 and Sirtuin 3:

Physiological modulators of metabolism. *Physiological Reviews* 92, 1479–1514.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2011>

Nordahl, O., Tibblin, P., Koch-Schmidt, P., Berggren, H., Larsson, P., Forsman, A., 2018. Sun-basking fish benefit from body temperatures that are higher than ambient water. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285, 20180639.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0639>

Nuche-Pascual, M.T., Ruiz-Cooley, R.I., Herzka, S.Z., 2021. A meta-analysis of amino acid $\delta^{15}\text{N}$ trophic enrichment factors in fishes relative to nutritional and ecological drivers. *Ecosphere* 12, e03570. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3570>

Olsen, Y., 2011. Resources for fish feed in future mariculture. *Aquaculture Environment Interactions* 1, 187–200. <https://doi.org/10.3354/aei00019>

Olsen, Y., 1999. Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs: What can freshwater ecologists learn from mariculture?, in: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 161–202.
https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0_9

Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 227–250.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00017-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00017-R)

Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples, in: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer New York, New York, NY, pp. 4–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0_2

Patel, M.S., Nemeria, N.S., Furey, W., Jordan, F., 2014. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 289, 16615–16623. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.563148>

Pérez-Ortín, J.E., Tordera, V., Chávez, S., 2019. Homeostasis in the central dogma of molecular biology: The importance of mRNA instability. *RNA Biology* 16, 1659–1666. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1655352>

Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Madeo, F., Kroemer, G., 2015. Acetyl Coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metabolism* 21, 805–821. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.014>

Pilar Valdecantos, M., Prieto-Hontoria, P.L., Pardo, V., Módol, T., Santamaría, B., Weber, M., Herrero, L., Serra, D., Muntané, J., Cuadrado, A., Moreno-Aliaga, M.J., Alfredo Martínez, J., Valverde, Á.M., 2015. Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 84, 263–278. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.019>

Plaxton, W.C., 2004. Principles of metabolic control, in: *Functional Metabolism*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–24. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch1>

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>

Ramanathan, C., Kathale, N.D., Liu, D., Lee, C., Freeman, D.A., Hogenesch, J.B., Cao, R., Liu, A.C., 2018. mTOR signaling regulates central and peripheral circadian clock function. *PLOS Genetics* 14, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007369>

Reed, T.E., Prodöhl, P., Hynes, R., Cross, T., Ferguson, A., McGinnity, P., 2015. Quantifying heritable variation in fitness-related traits of wild, farmed and hybrid Atlantic salmon families in a wild river environment. *Heredity* 2015 115:2 115, 173–184. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.29>

Rentería, M.E., Gandhi, N.S., Vinuesa, P., Helmerhorst, E., Mancera, R.L., 2008. A comparative structural bioinformatics analysis of the insulin receptor family ectodomain based on phylogenetic information. *PLOS ONE* 3, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003667>

Ruderman, N.B., Julia Xu, X., Nelson, L., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Lan, F., Ido, Y., 2010. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298, E751–E760. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00745.2009>

Rudolph, F.B., 1994. The biochemistry and physiology of nucleotides. *The Journal of Nutrition* 124, 124S-127S. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_1.124S

Salehi, B., Berkay Yılmaz, Y., Antika, G., Boyunegmez Tumer, T., Fawzi Mahomoodally, M., Lobine, D., Akram, M., Riaz, M., Capanoglu, E., Sharopov, F., Martins, N., Cho, W.C., Sharifi-Rad, J., 2019. Insights on the use of α -lipoic acid for therapeutic purposes. *Biomolecules* 9, PMC6723188. <https://doi.org/10.3390/biom9080356>

Santos, R.A., Caldas, S., Primel, E.G., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2016. Effects of lipoic acid on growth and biochemical responses of common carp fed with carbohydrate diets. *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 1699–1707. <https://doi.org/10.1007/S10695-016-0250-2/FIGURES/1>

Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., Boeke, J.D., 2006. The biochemistry of sirtuins. *Annual Review of Biochemistry* 75, 435–465.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133500>

Schrama, J.W., Haidar, M.N., Geurden, I., Heinsbroek, L.T.N., Kaushik, S.J., 2018. Energy efficiency of digestible protein, fat and carbohydrate utilisation for growth in rainbow trout and Nile tilapia. *British Journal of Nutrition* 119, 782–791.
<https://doi.org/10.1017/S0007114518000259>

Schug, Z.T., Vande Voorde, J., Gottlieb, E., 2016. The metabolic fate of acetate in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16, 708–717. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.87>

Schulte, P.M., 2007. Responses to environmental stressors in an estuarine fish: Interacting stressors and the impacts of local adaptation. *Journal of Thermal Biology* 32, 152–161.
<https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2007.01.012>

Shi, L., Tu, B.P., 2015. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology* 33, 125–131.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003>

Shi, X.-C., Jin, A., Sun, J., Yang, Z., Tian, J.-J., Ji, H., Yu, H.-B., Li, Y., Zhou, J.-S., Du, Z.-Y., Chen, L.-Q., 2017. α -lipoic acid ameliorates n-3 highly-unsaturated fatty acids induced lipid peroxidation via regulating antioxidant defenses in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish and Shellfish Immunology* 67, 359–367.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.036>

Shi, X., Jin, A., Sun, J., Tian, J., Ji, H., Chen, L., Du, Z., 2018. The protein-sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* : Effects on lipolysis,

fatty acid β -oxidation and protein synthesis. *British Journal of Nutrition* 120, 977–987.
<https://doi.org/10.1017/S000711451800226X>

Shi, X., Li, D., Zhuang, P., Nie, F., Long, L., 2006. Comparative blood biochemistry of *Amur sturgeon*, *Acipenser schrenckii*, and Chinese surgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiology and Biochemistry* 2006 32:1 32, 63–66.
<https://doi.org/10.1007/S10695-006-7134-9>

Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 363–383.
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>

Silva, B.C., Nolasco-Soria, H., Magallón-Barajas, F., Civera-Cerecedo, R., Casillas-Hernández, R., Seiffert, W., 2016. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. *Aquaculture Nutrition* 22, 997–1005.
<https://doi.org/10.1111/anu.12315>

Simó-Mirabet, P., Bermejo-Nogales, A., Caldach-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., 2017. Tissue-specific gene expression and fasting regulation of sirtuin family in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Comparative Physiology B* 187, 153–163.
<https://doi.org/10.1007/s00360-016-1014-0>

Singh, C.K., Chhabra, G., Ndiaye, M.A., Garcia-Peterson, L.M., Mack, N.J., Ahmad, N., 2018. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 28, 643–661. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7290>

Smirnoff, N., 2018. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine* 122, 116–129.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>

- Soares, M.G.M., Menezes, N.A., Junk, W.J., 2006. Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia* 2006 568:1 568, 353–367. <https://doi.org/10.1007/S10750-006-0207-Z>
- Staehr, P.A., Testa, J.M., Kemp, W.M., Cole, J.J., Sand-Jensen, K., Smith, S. V., 2012. The metabolism of aquatic ecosystems: History, applications, and future challenges. *Aquatic Sciences* 74, 15–29. <https://doi.org/10.1007/S00027-011-0199-2/FIGURES/3>
- Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24, 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)
- Sun, Y., Yang, C., Tsao, R., 2018. Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays, in: *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch1>
- Tao, R., Vassilopoulos, A., Parisiadou, L., Yan, Y., Gius, D., 2014. Regulation of MnSOD enzymatic activity by Sirt3 connects the mitochondrial acetylome signaling networks to aging and carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 1646–1654. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5482>
- Taştan, Y., Salem, M.O.A., 2021. Use of phytochemicals as feed supplements in aquaculture: A review on their effects on growth, immune response, and antioxidant status of finfish. *Journal of Agricultural Production* 2, 32–43. <https://doi.org/10.29329/AGRIPRO.2021.344.5>
- Terjesen, B., Park, K., Tesser, M.B., Portella, M.C., Zhang, Y., Dabrowski, K., 2004. Lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free amino acids selectively in the teleost fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of Nutrition* 134, 2930–2934. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.2930>

Tey, Y.S., Brindal, M., 2022. A meta-analysis of factors driving the adoption of precision agriculture. *Precision Agriculture* 23, 353–372. <https://doi.org/10.1007/s11119-021-09840-9>

Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>

Torrissen, O.J., Christiansen, R., 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. *Journal of Applied Ichthyology* 11, 225–230. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1995.tb00022.x>

Traber, M.G., 2010. Regulation of xenobiotic metabolism, the only signaling function of α -tocopherol? *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 661–668. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900440>

Trites, A.W., 2019. Marine mammal trophic levels and trophic interactions, in: Cochran, J.K., Bokuniewicz, H.J., Yager, P.L. (Eds.), *Encyclopedia of Ocean Sciences* (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 589–594. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11618-5>

Usacheva, A.M., Chernikov, A. V, Karmanova, E.E., Bruskov, V.I., 2022. Pharmacological aspects of the use of lipoic acid (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 55, 1138–1146. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02549-7>

Vasquez, M.C., Tomanek, L., 2019. Sirtuins as regulators of the cellular stress response and metabolism in marine ectotherms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 236, 110528. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110528>

Verbrugghe, A., Hesta, M., Daminet, S., Polis, I., Holst, J.J., Buyse, J., Wuyts, B., Janssens, G.P.J., 2012. Propionate absorbed from the colon acts as gluconeogenic substrate

in a strict carnivore, the domestic cat (*Felis catus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96, 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01220.x>

Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G., 2016. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, 863–871. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.004>

Vogel, C., Marcotte, E.M., 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* 13, 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>

Vomhof-Dekrey, E.E., Picklo, M.J.S., 2012. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 1201–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.005>

Wambacq, W., Rybachuk, G., Jeusette, I., Rochus, K., Wuyts, B., Fievez, V., Nguyen, P., Hesta, M., 2016. Fermentable soluble fibres spare amino acids in healthy dogs fed a low-protein diet. *BMC Veterinary Research* 12, 130. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0752-2>

Wang, X., Li, E., Chen, L., 2016. A Review of carbohydrate nutrition and metabolism in crustaceans. *North American Journal of Aquaculture* 78, 178–187. <https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1141129>

Wang, Y., Li, X., Guo, Y., Chan, L., Guan, X., 2010. α -Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α signaling in the skeletal muscle of aged mice. *Metabolism* 59, 967–976. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.10.018>

Wenes, M., Jaccard, A., Wyss, T., Maldonado-Pérez, N., Teoh, S.T., Lepez, A., Renaud, F., Franco, F., Waridel, P., Yacoub Maroun, C., Tschumi, B., Dumauthioz, N., Zhang, L., Donda, A., Martín, F., Migliorini, D., Lunt, S.Y., Ho, P.-C., Romero, P., 2022. The mitochondrial pyruvate carrier regulates memory T cell differentiation and antitumor function. *Cell Metabolism* 34, 731-746.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.03.013>

Wenger, A.S., Whinney, J., Taylor, B., Kroon, F., 2016. The impact of individual and combined abiotic factors on daily otolith growth in a coral reef fish. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28875>

Wright, P.A., Fhyn, J.H., 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion, *Fish Physiology* 20, 149-200. HYPERLINK "https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20006-5" https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20006-5

Xiao, W., Wang, R.-S., Handy, D.E., Loscalzo, J., 2018. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxidants & Redox Signaling* 28, 251–272. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7216>

Xiong, Y., Li, Q., Ding, Z., Zheng, J., Zhou, D., Wei, S., Han, X., Cheng, X., Li, X., Xue, Y., 2022. Dietary α -lipoic acid requirement and its effects on antioxidant status, carbohydrate metabolism, and intestinal microflora in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture* 547, 737531. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737531>

Xu, C., Li, E., Liu, S., Huang, Z., Qin, J.G., Chen, L., 2018. Effects of α -lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant status and lipid catabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed different lipid percentage. *Aquaculture* 484, 286–292. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.09.036>

Yang, Y., Li, W., Liu, Y., Li, Y., Gao, L., Zhao, J., 2014a. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 35, 1285–1292. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.64>

Yang, Y., Li, W., Liu, Y., Sun, Y., Li, Y., Yao, Q., Li, J., Zhang, Q., Gao, Y., Gao, L., Zhao, J., 2014b. Alpha-lipoic acid improves high-fat diet-induced hepatic steatosis by modulating the transcription factors SREBP-1, FoxO1 and Nrf2 via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 1207–1217. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.001>

Yodzis, P., 2001. Trophic Levels, in: Levin, S.A. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, New York, pp. 695–700. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226865-2/00274-1>

Yoshizawa, F., 2004. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.07.013>

Zhang, H., Ding, Q., Wang, A., Liu, Y., Teame, T., Ran, C., Yang, Y., He, S., Zhou, W., Olsen, R.E., Zhang, Z., Zhou, Z., 2020. Effects of dietary sodium acetate on food intake, weight gain, intestinal digestive enzyme activities, energy metabolism and gut microbiota in cultured fish: Zebrafish as a model. *Aquaculture* 523, 735188. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735188>

Zhang, Y., Lu, R., Qin, C., Nie, G., 2020. Precision nutritional regulation and aquaculture. *Aquaculture Reports* 18, 100496. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100496>

Zhao, H., Ma, H.-J., Gao, S.-N., Chen, X.-R., Chen, Y.-J., Zhao, P.-F., Lin, S.-M., 2018. Evaluation of dietary vitamin E supplementation on growth performance and antioxidant

status in hybrid snakehead (*Channa argus* × *Channa maculata*). *Aquaculture Nutrition* 24, 625–632. <https://doi.org/10.1111/anu.12552>

Zigman, S., 1982. Yellow lens pigment: An adaptation for activity in bright sunlight, in: Calkins, J. (Ed.), *The Role of Solar Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems*. Springer US, Boston, MA, pp. 399–405. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8133-4_38

Zimmermann, K., Baldinger, J., Mayerhofer, B., Atanasov, A.G., Dirsch, V.M., Heiss, E.H., 2015. Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signaling axis-A role for the unfolded protein response. *Free Radical Biology & Medicine* 88, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.030>

CAPÍTULO 2

Efeito do ácido lipóico sobre a utilização de nutrientes vitelinos, metabolismo energético e balanço redox através do tempo em *Artemia* sp.

Juan Rafael Buitrago Ramírez¹, Robson Matheus Marreiro Gomes¹, Alan Araujo¹, Sonia

Astrid Buitrago¹, José María Monserrat^{1,2}

¹Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos(BIFOA), Instituto de Oceanologia (IO), Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil.

²Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Rio Grande, Brazil.

Resumo

O ácido lipóico (LA) é uma coenzima mitocondrial e modulador metabólico que, dependendo da concentração e tempo de exposição, pode se comportar como um agente antioxidante ou pro-oxidante, além de isso o LA possui uma comprovada capacidade de modular o metabolismo promovendo a oxidação de lipídio e glicose para a produção de energia. Para avaliar o efeito do LA no metabolismo energético e balanço redox através do tempo utilizou-se como modelo animal náuplios de *Artemia* sp., explorando o fato de estes animais terem acesso direto a nutrientes estocados como reservas vitelinas cujo modo e taxas de utilização poderiam mudar em função à modulação metabólica provocada pelo LA. As concentrações deste antioxidante administradas na água foram 0.05; 0.1; 0,5; 1.0; 5.0; e 10.0 μ M, assim foram avaliadas possíveis diferenças na concentração de proteína, triglicerídeos, glicose, lactato nas amostras de artêmia e de nitrogênio amoniacal total

(TAN) na água de cultivo. Foi também avaliado o efeito destas concentrações de LA sobre a capacidade (*in vitro*) e atividade (*in vivo*) do sistema transportador de elétrons (ETS) e capacidade antioxidante e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos tempos 6, 12, 18 e 24 h pós-eclosão. Houve diminuição nas concentrações de glicose dos animais tratados com LA e foi verificada uma queda na produção de amônia no tratamento com 0.5 μM de LA. Tanto a capacidade do ETS quanto a atividade foram reguladas positivamente com a adição do LA com os efeitos mais significativos nas concentrações 5.0 e 10.0 μM no caso da capacidade do ETS para os tempos de 12 e 24h, já para atividade todos os tratamentos aos que foi adicionado LA apresentaram os maiores valores às 24 h, período no qual a produção de ROS diminuiu significativamente para o tratamento com 10.0 μM . O LA apresentou grande capacidade de modular o metabolismo da artêmia de forma tempo-dependente, exibindo consistente regulação positiva do metabolismo energético do animal aunada à diminuição na produção de ROS e menor excreção de compostos nitrogenados na água.

Palavras-chave: antioxidantes, aquicultura, metabolismo energético, suplementos nutricionais, compostos nitrogenados.

1. Introdução

A maneira como os animais transformam a matéria e a energia administrada na dieta pode variar amplamente em função às características genótípicas e ambientais (Cristóbal-Azkarate et al., 2016; Koyama et al., 2020; Seibel e Drazen, 2007), porém em geral, os animais de ambientes aquáticos dependem prioritariamente da proteína como fonte de energia.

Assim a utilização desta para a ressíntese de proteína e crescimento depende consideravelmente da necessidade energética (Li et al., 2020). Conseqüentemente o lipídio e o carboidrato fornecidos na dieta ocupam papel secundário como substratos energéticos.

Estima-se que aproximadamente o 80% do ATP necessário é sintetizado a partir do catabolismo de aminoácidos em peixes (Jia et al., 2017; Li et al., 2021). Apesar do lipídio ocupar um papel importante como substrato energético, seu uso ocorre principalmente em períodos pré prandiais especialmente quando estes são prolongados (Navarro e Gutiérrez, 1995).

Para carboidrato existe um consenso enquanto a que o aporte deste para a síntese de ATP em organismos aquáticos é baixo, embora a utilização deste também se incrementa em períodos de jejum prolongado, em muitas espécies é observada principalmente que mobilização do lipídio é mais significativa para a produção de energia (Navarro e Gutiérrez, 1995; Wang et al., 2016). Isto pode se dever à baixa disponibilidade de carboidratos digestíveis no meio aquático natural ou ao metabolismo ectotérmico que estes animais possuem (Polakof et al., 2012). No contexto da aquicultura existe o interesse de minimizar a utilização da proteína como fonte de energia já que esta provem de matérias primas na dieta com considerável custo econômico, por ser ingredientes frequentemente extraídos do ambiente natural (Hua et al., 2019). Assim a otimização do uso dos aminoácidos provenientes da proteína para processos anabólicos vinculados ao desenvolvimento e crescimento mediante diversas estratégias como a suplementação com compostos capazes de modular metabolismo é uma alternativa a ser explorada na procura de uma atividade aquícola mais sustentável (Mohseni et al., 2008; Ozório et al., 2001; Shi et al., 2018a).

O uso de suplementos alimentares dentro da aquicultura vem tendo cada vez mais acolhida para a melhora de parâmetros fisiológicos que influenciam no rendimento produtivo incluir (Carbone e Faggio, 2016; Encarnação, 2016; Fuchs et al., 2015; Hoseinifar et al., 2018; Kütter et al., 2012; Xu et al., 2021).

Isto cobra ainda maior importância dentro das novas tendências como são a regulação nutricional de precisão, sob princípios como a otimização na alimentação e a ciclagem da matéria orgânica gerada para a diminuição na emissão de poluentes incluídos (Zhang et al., 2020). A regulação nutricional de precisão requer a otimização da alimentação, do produto, do suporte técnico e tecnológico para o gerenciamento de dejetos e do metabolismo (Zhang et al., 2020). Assim os suplementos nutricionais entendidos como moduladores metabólicos poderiam se transformar em uma ferramenta para acoplar a fisiologia com as demandas zootécnicas que recaem sobre uma espécie de interesse produtivo (Lu et al., 2019; Panserat et al., 2009; Walsh et al., 2021).

Existem compostos com comprovada capacidade de modular de maneira significativa o metabolismo energético de espécies aquáticas (Huang et al., 2020; Mohseni et al., 2008; Panserat et al., 2009). Dentre os compostos com potencial para este fim está o ácido lipóico (LA), um conhecido antioxidante de provados benefícios a nível fisiológico já que, além de ter a capacidade de conter ou diminuir o impacto de eventos pro-oxidantes, modula o metabolismo do organismo priorizando vias metabólicas para a biogênese mitocondrial, mobilização de substratos energéticos e produção de energia (Maczurek et al., 2008; Sohaib et al., 2018). Tem se observado que a mobilização de reservas energéticas provocadas pelo LA leva à diminuição na oxidação da proteína para a produção de energia, através da regulação positiva da glicólise e da β -oxidação (Ding et al., 2022; Shi et al., 2018; Xu et al., 2019). No contexto da aquicultura, isto posicionaria ao LA como um promotor da eficiência proteica e um potencial suplemento para a

diminuição da necessidade proteica dos organismos cultivados (Ding et al., 2022; Shi et al., 2018).

Mesmo existindo evidências do LA promover a eficiência proteica de animais tanto aquáticos quanto terrestres, os resultados obtidos por Terjesen et al. (2004) divergem desta ideia, o qual pode estar apontando a possíveis interações do LA com o metabolismo da espécie e/ou com a dieta administrada para esta, (Castro et al., 2013; Huang et al., 2019, 2020) possíveis efeitos de uma dieta não ajustada às necessidades do animal poderia provocar resultados pouco conclusivos sobre a maneira como o LA funciona no nível metabólico. No entanto, uma possível estratégia a nível experimental para evitar a possibilidade de ruído sobre a avaliação do efeito metabólico do LA poderia ser a utilização de modelos animais em fases nas quais estes dependam das reservas vitelinas, sobre as quais é possível assumir, se ajustam às necessidades dos animais pelo menos para aquele estágio de desenvolvimento (Tong et al., 2017; Vázquez et al., 1994).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as mudanças metabólicas na utilização de nutrientes em náuplios de *Artemia* sp. recém eclodidos quando tratados com LA e o efeito deste composto sobre o balanço redox dos animais. A escolha de nauplios de *Artemia* sp. como modelo animal obedece ao fato deste animal depender das reservas vitelinas, o qual possibilita a oferta do LA dentro de um contexto nutricional onde os requerimentos da espécie são atendidos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Artemia sp.

Os cistos de *A. salina* foram incubadas para eclosão em cones de imhoff em uma relação de 1 g de cistos L⁻¹ a 28 °C de temperatura, salinidade 28 g L⁻¹, aeração e luz constante. Após 24h de incubação os náuplios recém eclodidos foram coletados em um único

beaquer do qual foram tomadas duas alíquotas de 1 mL para diluir cada uma em 99 mL de água de mar, destas suspensões diluídas foi tomado 1 mL com pipeta de vidro e contou-se a quantidade de organismos em duplicata. Foi feita uma média das contagens de cada beaquer de 100 mL e das médias obtidas a partir destes, o valor resultante foi multiplicado por 100 para conhecer a quantidade de artemias mL⁻¹ do beaquer de coleta, assim a densidade de artemia foi ajustada a 250 . mL⁻¹ trocando o 100% da água do beaquer de coleta por água tratada com hipoclorito de sódio 15% (concentração final 0,015%) e declorada com tiosulfato de sódio.

2.2. Padronização do protocolo da atividade in vivo do sistema transportador de elétrons (ETS)

Este protocolo baseou-se parcialmente no protocolo de Reid et al. (2018) com *Danio rerio*. O procedimento usa a resazurina como fluoróforo, a qual quando reduzida pelas proteínas mitocôndrias pertencentes ao ETS é transformada em resorufina, uma substância fluorescente (excitação: 530 nm; emissão: 590 nm). A variação de fluorescência por minuto foi considerada um indicador de atividade do ETS. Para padronizar o protocolo em artemia, foi testada a influência da concentração de resazurina (0.005, 0.0075, 0.010 mg mL⁻¹ de concentração final) e a densidade de animais (60, 120, 240 náuplios de *A. salina* mL⁻¹) nas leituras de fluorescência mediante um delineamento fatorial completo com três réplicas por tratamento. As leituras foram feitas em placas brancas de 96 poças a 28 °C durante uma hora com uma frequência de leitura de 2 min utilizando o espectrofluorímetro Synergy™ HT - BioTek.

Adicionalmente para avaliar a sensibilidade do protocolo a mudanças na atividade da ETS foi testado o efeito do cianeto de potássio (KCN), um inibidor do complexo IV do ETS, sobre a leitura da cinética da fluorescência, para isso foram utilizadas as concentrações

finais de 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de KCN. Imediatamente após a adição do KCN a náuplios dispostos nas poças de placas brancas de 96 poças ($240 \text{ náuplios mL}^{-1}$) foi adicionada a resazurina (0.01 mg mL^{-1}) a 9 poças de cada concentração de KCN e a 9 poças as quais receberam unicamente água destilada como veículo do KCN. Adicionalmente usou-se diclorofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) na concentração final de $8.3 \mu\text{M}$ (Rodrigues et al., 2021), lida nos comprimentos $485 \text{ nm}_{\text{ex}}$ e $520 \text{ nm}_{\text{em}}$, em 9 poças adicionais expostas às diferentes concentrações de KCN ou água destilada para verificar a produção de ROS como marcador adicional da atividade mitocondrial com o fim de verificar o efeito do KCN sobre a mitocôndria a partir de um método padronizado. É importante enfatizar que os náuplios mantiveram-se vivos após as medições de ETS e ROS, inclusive após a exposição ao KCN.

Para estimar a capacidade *in vivo* da mitocôndria de reduzir a resazurina, foi extraída a fração mitocondrial da *A. salina*. Esta análise foi desenvolvida para determinar quantitativamente a contribuição da fração mitocondrial da artemia na atividade performada *in vivo*. Para isto, frações mitocondriais foram isoladas em triplicata de três amostras de artemia, incubadas de separadamente sob as mesmas condições já mencionadas, adicionalmente frações na mitocondriais foram recuperadas para avaliar sua contribuição na fluorescência observada nos espécimes de artemia viva.

2.3. Isolação da fração mitocondrial

Duas g de náuplios de *Artemia* sp. recém eclodidos, foram gentilmente homogeneizados usando um homogeneizador de Teflon em 16 mL de tampão 1 (0.125 M sacarose, 0.375 M sorbitol, 1 mM EGTA, 150 mM KCl, 0.5% albumina de soro bovino livre de ácidos graxos e 20 mM HEPES KOH, pH 7.5) esfriado em gelo. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 10 s a $3026 \times g$ e 4°C . O sobrenadante foi recuperado e centrifugado de novo por 15

min a 17409 x g e 4°C. Depois de se descartar o sobrenadante resultante da anterior centrifugação o pellet foi resuspendido em 32 ml do tampão 2 (0.125 M sacarose, 0.375 M sorbitol, 0.025 mM EGTA, 150 mM KCl, 0.5% albumina de soro bovino livre de ácidos graxos e 20 mM HEPES KOH, pH 7.5) para uma nova centrifugação a 1082 x g, 4°C por 5 min. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e centrifugado por 15 min a 17409 x g e 4°C. O pellet gerado (fração mitocondrial) foi resuspendido em 300 ul do tampão 2 (Rodriguez-Armenta et al., 2018).

2.4. Medição da capacidade redutora da mitocôndria de *Artemia* sp.

De uma alíquota da fração mitocondrial determinou-se a concentração de proteína mediante o método de Biureto. A seguir, em placas brancas de 96 poças, o meio de reação (5 mM succinato de sódio, 0.125 M sacarose, 0.065 M KCl, 0.002 M K₂HPO₄ e 0.01 M KOH-HEPES, pH 7.5) mais água destilada ou adenosina difosfato (ADP; concentração final de 103 uM), ou ADP 103 uM + KCN (concentração final de 103 µM) e resazurina na concentração final de 32.5 µM) foram adicionados na sequência. Finalmente o tampão 2 foi adicionado como branco da análise; fração 1 (pellet resultante da primeira centrifugação); fração 2 (frações descartadas das subseqüentes centrifugações); e a fração mitocondrial, todas estas na concentração final de 1 mg de proteína mL⁻¹. A capacidade de redução da resazurina da mitocôndria foi medida pela fluorescência gerada (530 nm de excitação e 590 nm de emissão) lida por 10 min a 28°C como leituras a cada 1 min (González-Durruthy et al., 2016; Gray et al., 2019; Rodriguez-Armenta et al., 2018). Os dados de fluorescência foram multiplicados pela quantidade de proteína presente em cada uma das frações de acordo com as expressões:

$$mT_{mit} = m_{mit} \times prot_{mit}.g^{-1} \text{ de artêmia}$$

$$mT_{fl} = m_{fl} \times prot_{fl}.g^{-1} \text{ de artêmia}$$

$$mT_{f2} = m_{f2} \times \text{prot}_{f2} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de artêmia}$$

Onde:

mT_{mit} , mT_{f1} e mT_{f2} representam as inclinações da fração mitocondrial, fração 1 e da fração 2, respectivamente pelo total da quantidade de proteína presente em cada fração por 1 g de artêmia. Por sua vez, m_{mit} , m_{f1} , e m_{f2} , representam a inclinação em unidades de fluorescência obtida da fração mitocondrial, a fração 1 e a fração 2, expostas a succinato + ADP. Multiplicando os valores de m_{mit} , m_{f1} e m_{f2} pela quantidade de proteína em uma grama de artêmia ($\text{prot}_{mit} \cdot \text{g}^{-1}$ de artêmia, $\text{prot}_{f1} \cdot \text{g}^{-1}$ de artêmia e $\text{prot}_{f2} \cdot \text{g}^{-1}$ de artêmia, respectivamente), foram estimados os valores de mT_{mit} , mT_{f1} e mT_{f2} .

Com base nos valores obtido de mT_{mit} , mT_{f1} , and mT_{f2} , foi calculada a participação percentual de cada uma das frações na taxa de redução da resazurina. Adicionalmente, as diferenças estatísticas entre as inclinações da fluorescência em função do tempo para cada substrato (succinato, succinato+ADP e succinato+ADP+KCN) para cada fração avaliada.

2.5. Exposição in vivo da Artemia sp. ao ácido lipoico (LA)

Para avaliar o efeito do LA sobre os náuplios de artêmia foram feitos dois experimentos. No primeiro foi realizada a exposição dos animais ao LA para avaliar as mudanças sobre o consumo das reservas de nutrientes do vitelo, e sobre a capacidade antioxidante e do ETS durante 24 h pós-eclosão. Este tempo foi determinado segundo Paffenhöfer (1967), que sinala o tempo de 30 h pós-eclosão como o momento onde a Artemia sp. consumiu a maior parte do seu vitelo, se tornado dependente da alimentação exógena. Já no segundo experimento avaliou-se a influência do LA na atividade do ETS in vivo e produção de ROS para verificar as observações feitas in vitro (experimento 1) nos parâmetros de capacidade do ETS e capacidade antioxidante.

2.6.Experimento 1

Em 8 placas de 24 poças foram estocados 2 mL de artêmia (24 h após-reidratação dos cistos) por poça em uma densidade de 250 náuplios mL⁻¹, 6 placas foram tratadas com as concentrações finais de 0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 5.0; e 10.0 µM de LA, uma das placas foi utilizada como tratamento controle do veículo do LA, tratada só com dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração final de 0.005 %. A placa restante foi deixada como controle experimental ao qual só foi adicionada água destilada. A cada 6 h durante 24 h foram coletados os náuplios de três poças de cada tratamento, filtrados com telas de 60 µm de poro, depositados em microtubos de 2 ml previamente pesados, rapidamente submersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para análises posteriores. Em paralelo, a água resultante de cada poça foi utilizada para dosar a concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN) pelo método de fenol-hipoclorito (Helder e De Vries, 1979).

Para a quantificação de TAN usou-se uma curva de calibração com cloreto de amônia feita de maneira posterior à análise das amostras de água, devido a interferências encontradas do DMSO sobre a reação, este teve que ser adicionado à curva padrão na concentração utilizada para o experimento.

2.7.Experimento 2

Estocaram-se em 4 placas de 96 poças, náuplios de *A. salina* 24 h após-reidratação dos cistos, na densidade de 250 náuplios mL⁻¹, 12 poças por placa foram expostas a 0.05; 0.1; 0.5; 1.0; 5.0; e 10.0 µM de ácido lipóico ou ao veículo do LA, o dimetil sulfoxido (DMSO) na concentração final de 0,005 %. Em cada caso só 20 µL de cada solução foram adicionados nas poças, evitando uma diluição extrema da salinidade da água (o fator de diluição foi do 1%). Adicionalmente contou-se com um controle de poças não tratadas para avaliar o efeito do DMSO nos animais. Como a taxa metabólica dos nauplios

de artêmia se mantém baixa nos tempos 6 e 12 h, a atividade da ETS só foi avaliada nos tempos 18 e 24 h do tempo experimental. Para isso foram adicionados nas placas os fluoróforos resazurina e H₂DCF-DA, 6 poças para cada fluoróforo e para cada concentração de LA ou para os controles. A fluorescência de cada fluoróforo foi lida a cada 2 min nos comprimentos já mencionados durante 3 h para obter as variações de fluorescência delineado para medir ROS em rotíferos (Rodrigues et al. 2021).

2.8. Análises bioquímicas

2.8.1. Processamento das amostras

Os microtubos com amostras foram pesados e foi descontado o peso do microtubo para conhecer o peso da amostra coletados, as amostras foram diluídas 5 vezes com o buffer para determinação da capacidade do ETS (0,09 M Na₂HPO₄, 0,09 M KHPO₄, 0,45 mg/ml polivinilpirrolidona, 22,5 µM de MgSO₄ e 0.16% de Triton X-100) (Gopalan et al., 1996; Owens e King, 1975) e sonicadas a 40 KHz com tip de 3 mm de diâmetro em pulsos de 30 s durante 3 min mantendo permanentemente as amostras em gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi armazenado em microtubos de 500 µL e mantido a -80°C para posteriores análises.

2.8.2. Determinação da concentração de proteínas

Para a análise de proteína foi utilizado o Kit da Bioclin para proteínas totais. Assim, tomaram-se 7.5 µL do sobrenadante das amostras, do tampão de homogeneização (branco) ou uma solução de 40 mg albumina mL⁻¹ (padrão proteico) foram adicionados mais 375 µL do reagente de Biureto (Sánchez Rojas e Cano Pavón, 2005) em microtubos de 1.5 ml.

A seguir as soluções resultantes foram homogeneizadas com o auxílio do vórtex e incubadas durante 10 min. Em seguida, foram transpassadas a microplacas de 96 poças transparentes de fundo chato usando duas poças por amostra, branco e padrão. As absorbâncias foram lidas a 550 nm em espectrofluorímetro.

As concentrações de proteína das amostras foram calculadas em função a absorbância obtida da solução padrão de proteína. Os resultados de proteína foram expressos em mg g⁻¹ de artemia.

2.8.3.Determinação da concentração de glicose

A dosagem foi feita utilizando o kit monorreagente da Bioclin (RS, Brazil) segundo as indicações do fabricante, utilizaram-se os homogeneizados das amostras de artêmia, o tampão de homogeneização como branco da análise e uma solução padrão de glicose na concentração de 1 mg mL⁻¹. O procedimento foi realizado em placas transparente de 96 poços sendo que, após a adição do monorreagente para glicose e alíquotas das amostras em duplicata, as placas foram incubadas a 37 °C por 10 min e lidas a 505 nm. As concentrações de glicose das amostras foram calculadas em função a absorbância obtida da solução padrão de glicose. Os resultados de glicose foram expressos em mg g⁻¹ de artemia.

2.8.4.Determinação da concentração de lactato

Foi feito com o auxílio do kit comercial para lactato (Bioclin, RS, Brazil) baseado na produção de NADH após a reação de lactato e NAD⁺ para gerar piruvato + NADH catalisada pela enzima lactato desidrogenase. A produção de NADH foi aferida fluorometricamente para cada amostra em duplicata nos comprimentos 340 nm_{ex} e 440 nm_{em} (Ince et al., 1992). Usou-se uma solução padrão de lactato de 0.3 mg mL⁻¹ da qual

foram feitas 6 diluições seriadas até a concentração de 0.004 mg mL^{-1} com a qual foi construída uma curva de calibração. As concentrações de lactato das amostras foram aferidas 5 min após adição da enzima lactato desidrogenase e a solução de NAD^+ e calculou-se em função à fluorescência obtida da curva de calibração de lactato. As leituras foram feitas em placas brancas de 96 poças, cada amostra replicada três vezes. Os resultados de lactato foram expressos em mg g^{-1} de artêmia.

2.8.5.Determinação da concentração de triglicerídeos

A análise foi feita com os homogeneizados de artêmia iniciais não diluídos para isto, usando o kit comercial monorreagente da Bioclin (RS, Brazil). Brevemente, a análise foi feita em placas de 96 poças transparentes, as amostras, o branco e padrão de triglicerídeos (1 mg mL^{-1}) foram analisados por duplicado e agregados depois da adição do monorreagente nas poças das placas. A seguir as placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min e a absorbância foi contabilizada no comprimento de 500 nm . As concentrações de triglicerídeos das amostras foram calculadas em função a absorbância obtida da solução padrão de triglicerídeos. Os resultados foram expressos em mg de triglicerídeos g^{-1} de artêmia.

2.8.6.Determinação da capacidade do sistema transportador de elétrons (ETS)

Alíquotas das amostras homogeneizadas foram levadas até uma concentração de 0.5 mg mL^{-1} . Em placas transparentes de 96 poças, de cada diluição tomaram-se $6.25 \text{ } \mu\text{L}$ x 2 poças de cada amostra (ou de buffer de homogeneização como branco) e adicionou-se $91.65 \text{ } \mu\text{L}$ de buffer de reação ($0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $0,1 \text{ M KHPO}_4$, $0,275 \text{ mg/ml}$ polivinilpirrolidona, $15 \text{ } \mu\text{M}$ de MgSO_4), $27.8 \text{ } \mu\text{L}$ de cloreto de tetrazolio 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil (Sigma-Aldrich) a 3 mg mL^{-1} por último,

adicionaram-se 6.25 μL de uma solução de NADH/NADPH (30/2.2 mM respectivamente) diluídas em buffer tris(hidroximetil)aminometano ao 0.01%. As placas foram lidas durante 30 min a 490 nm e 28°C de temperatura (Owens e King, 1975).

A capacidade da ETS foi calculada como:

$$\text{ETS atividade (mg O}_2\text{ min}^{-1}\text{ g}^{-1}\text{ proteína)} = (m/p) * 0,06$$

Onde: **m** é a inclinação da cinética em unidades de absorbância por minuto, **p** é e a quantidade de proteína em gramas da alíquota de amostra usada para a reação e **0,06** é o fator de conversão para mg de O₂. Os resultados da atividade do ETS foram expressos em mg O₂ min⁻¹ g⁻¹ proteína.

2.8.7.Determinação da capacidade antioxidante total

Com as amostras ajustadas para a concentração de 0.5 mg de proteína mL⁻¹ foi feita a análise de capacidade antioxidante contra o radical peroxil. Os resultados foram expressos como a área relativa das curvas de fluorescência gerada através do tempo pela oxidação de H₂DCF-DA (Sigma-Aldrich) em presença da amostra quando era adicionada ou não à solução do gerador do radical peroxil, diidrocloreto de 2,2-azobis-2-metilpropionamidina (ABAP; Sigma-Aldrich). Nesta análise, quanto maior a área relativa obtida, menor a capacidade antioxidante da amostra e vice-versa (Amado et al., 2009).

2.9.Análises estatísticas

Após a comprovação dos pressupostos de normalidade homoscedasticidade e independência das variáveis foi feita uma ANOVA de duas vias (tempo e concentração de LA) e Bonferroni como teste pós-hoc para comparação das médias de cada tratamento. No caso do controle experimental sem veículo calculou-se para cada variável resposta avaliada uma média única agrupando todos os tempos de coleta, assim estes dados não

entraram dentro das comparações entre tratamentos. As inclinações da capacidade redutora da mitocôndria isolada da *A. salina* foram comparadas através de uma ANOVA e prova de contrastes de Bonferroni após a verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias (Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente). Por fim, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) com as médias de cada grupo experimental para cada tempo, escalando as variáveis utilizadas com média 0 e desvio padrão 1.

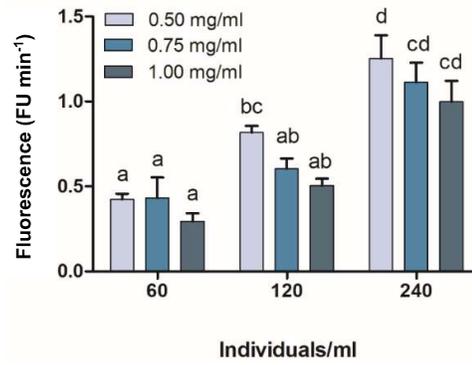
3.Resultados

3.1.Padronização do protocolo da atividade in vivo do sistema transportador de elétrons (ETS)

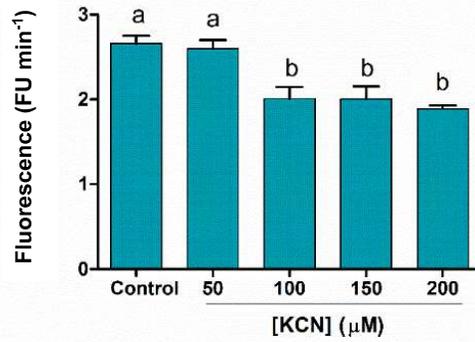
Houve um efeito significativo da densidade dos animais sobre os incrementos de unidades de fluorescência por min, no entanto, a concentração de resazurina como observa-se na Figura 1a não teve um efeito significativo ($p>0,05$).

A exposição ao KCN promoveu uma resposta dependente no caso da determinação do ETS utilizando resazurina (Figura 1b; $p<0.050$) enquanto para a produção de ROS não houve diferenças entre as concentrações de KCN (Figura 1c; $p>0.05$).

(a)



(b)



(c)

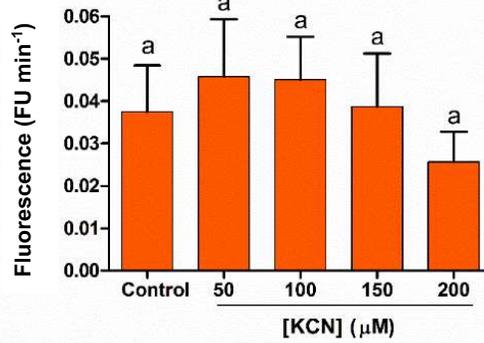


Figura 1. (a). Incremento de fluorescência por minuto usando diferentes densidades de náuplios de *Artemia* sp. e diferentes concentrações de resazurina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n = 3). (b) Efeito do KCN na atividade do sistema de transporte de elétrons (ETS) e (c) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em (b) e (c) os dados são expressos como média \pm erro padrão (n = 9). Em todos os casos, letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

3.2. Medição da capacidade redutora da mitocôndria da *Artemia* sp.

Todas as frações foram capazes de reduzir a resazurina. No entanto, as taxas de redução encontradas para a fração mitocondrial foram em média cerca de cinco vezes maiores às encontradas nas outras frações. Percentualmente a fração mitocondrial exposta ao succinato+ADP representou o $80,29 \pm 12,43\%$ do total da inclinação de redução da resazurina, seguido da fração 2 ($14,90 \pm 0,5\%$) e a fração 1 ($4,80 \pm 0,8\%$) (Figura 2a). Para a fração mitocondrial, foram encontradas diferenças significativas entre as inclinações de fluorescência por minuto dependendo do tipo de substrato, onde a fração mitocondrial exposta a succinato+ADP apresentou as maiores taxas de redução da resazurina, seguido da tratada só com succinato. As amostras expostas a succinato+ADP+KCN apresentaram as menores taxas de crescimento da fluorescência (Figura 2b).

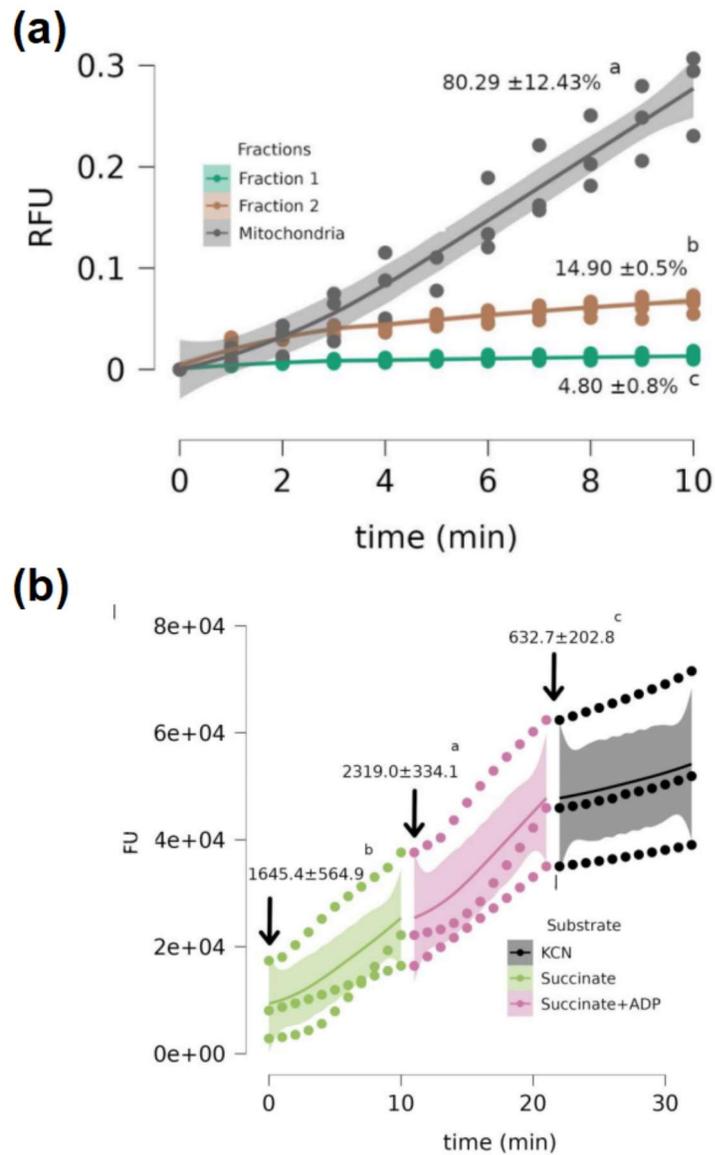


Figura 2. (a) Inclinações das leituras em unidades relativas fluorescência (RFU) ao longo do tempo (min) estimadas para as frações 1, 2 e a fração mitocondrial exposta ao succinato+ADP. Os valores percentuais \pm SD indicam a contribuição de cada fração para o incremento líquido de fluorescência por min e por mg de proteínas em 1 g de *Artemia* sp. Letras diferentes indicam diferenças entre as inclinações das diferentes frações ($p < 0,05$). (b) Resposta da fração mitocondrial aos diferentes substratos. Os valores \pm SD indicam as

inclinações médias do incremento de fluorescência por mg de proteínas em 1 g de *Artemia* sp. para cada substrato avaliado. As faixas coloridas representam os intervalos de confiança (95%) calculados para cada substrato. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias percentuais de inclinação ($p < 0,05$).

3.3.Experimento 1

3.3.1.Concentração de proteína

Os resultados são expostos na Figura 2. Para o tempo 6 h só o tratamento com 10 μM apresentou diferenças com o tratamento SCtrl (controle com DMSO) sendo as amostras deste último as que maiores teores de proteína apresentaram. No tempo 12h todos os grupos administrados com LA apresentaram valores de proteína inferiores ao SCtrl, no entanto para o tempo 18 h o tratamento com 0,5 μM de LA apresentou valores proteína superiores aos do SCtrl, os quais contrastam com os valores obtidos pelo tratamento com 0,05 μM que foram inferiores aos do SCtrl. Finalmente para as 24 h não foram encontradas diferenças entre nenhum dos tratamentos.

3.3.2.Nitrogênio amoniacal total (TAN)

Nos tempos 18 e 24 h houve diminuição na concentração de TAN na água do tratamento com 0,5 μM de LA quando comparado contra o SCtrl (Figura 3).

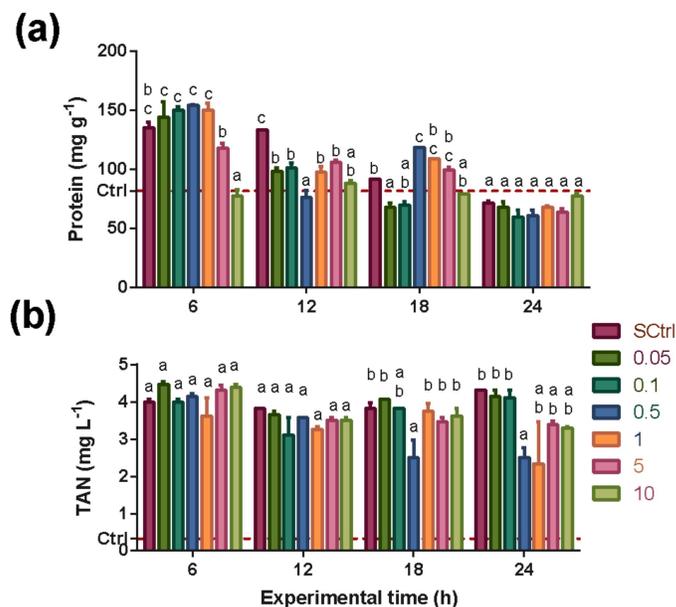


Figura 3. Níveis de proteína (a) nos náuplios de *Artemia* sp. e concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN) (b) na água ao longo do tempo (h). A linha pontilhada vermelha representa a média geral dos animais de controle. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. SCtrl: controle de solvente.

3.3.3. Concentração de glicose

Os resultados para glicose são apresentados na Figura 4. Para o tempo de 6 h o tratamento com 10 μM apresentou valores de glicose significativamente menores aos do SCtrl, assim para o tempo de 12 h o tratamento com 5 μM de LA reportou os vales mais baixos de glicose. Para o tempo de 18 h todos os grupos que receberam LA apresentaram valores de glicose inferiores aos encontrados no SCtrl, já para o tempo de 24 h só os tratamentos com 0,5, 1 e 5 μM de LA apresentaram diferenças quando comparados contra o SCtrl.

3.3.4. Concentração de lactato

A concentração do lactato apresentou diferenças entre tratamentos, assim para o tempo de 6 h, os valores mais baixos de lactato foram apresentados pelos tratamentos com 0,05 e

0,1 μM de LA, para o tempo de 12 h houve um aumento do lactato nos tratamentos 1 e 10 μM quando comparados com o SCtrl. No tempo de 18 h em geral os valores de lactato dos tratamentos com LA foram inferiores aos apresentados pelo SCtrl, exceto nos tratamentos com 0,5 e 5 μM de LA. Finalmente no tempo de 24 h o tratamento 0,05 μM de LA apresentou valores de lactato acima dos valores apresentados pelo SCtrl (Figura 4).

3.3.5. Conteúdo de triglicerídeos

O conteúdo de triglicerídeos diminuiu no tempo de 6 h nos grupos tratados com as maiores concentrações de LA (1, 5 e 10 μM de LA) (Figura 4).

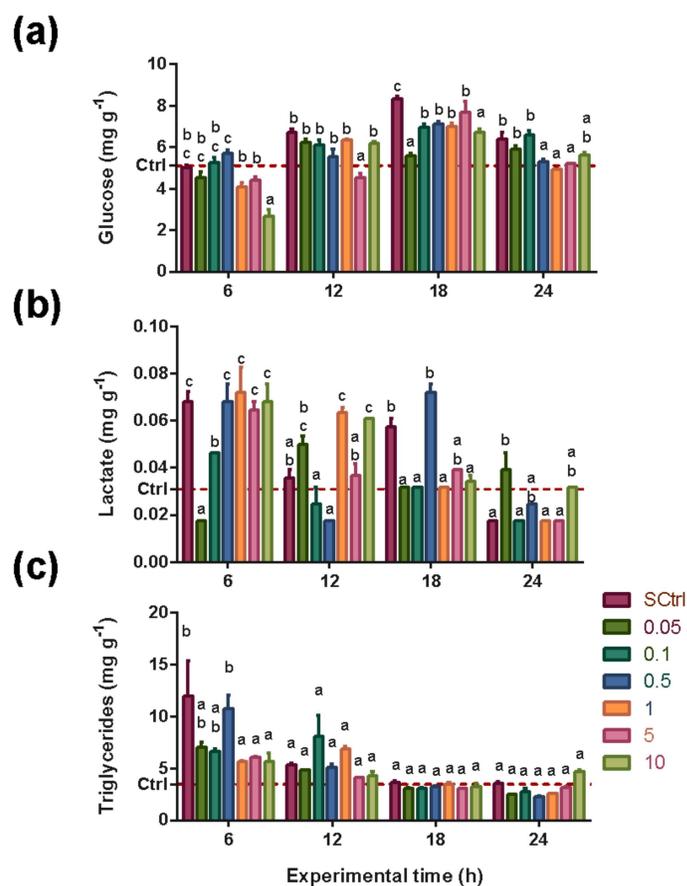


Figura 4. Níveis de glicose (a), lactato (b) e triglicerídeos (c) ao longo do tempo (h). A linha pontilhada vermelha representa a média geral dos animais de controle. Os dados são

expressos como média \pm erro padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p<0,05) entre os tratamentos. SCtrl: controle de solvente.

3.3.6. Capacidade da ETS

Houve diferenças entre os grupos tratados com LA e o grupo SCtrl em todos os tempos exceto no tempo de 18 h. No tempo de 6 h encontrou-se uma menor capacidade do ETS nos tratamentos 0,05 e 0,1 μ M. Já após 12 h, a capacidade do ETS dos grupos com 1, 5 e 10 μ M de LA foi superior à encontrada no SCtrl. Para o tempo de 24 h observou-se de novo uma capacidade do ETS superior nos tratamentos 5 e 10 μ M de LA quando comparados com SCtrl (Figura 4a).

3.3.7. Capacidade antioxidante total

No geral o LA teve um efeito de diminuir a capacidade antioxidante (ACAP), só para o tratamento de 10 μ M no tempo de 24 h foi observado um aumento da capacidade antioxidante, apenas quando comparado com os tratamentos 1 e 5 μ M (Figura 5).

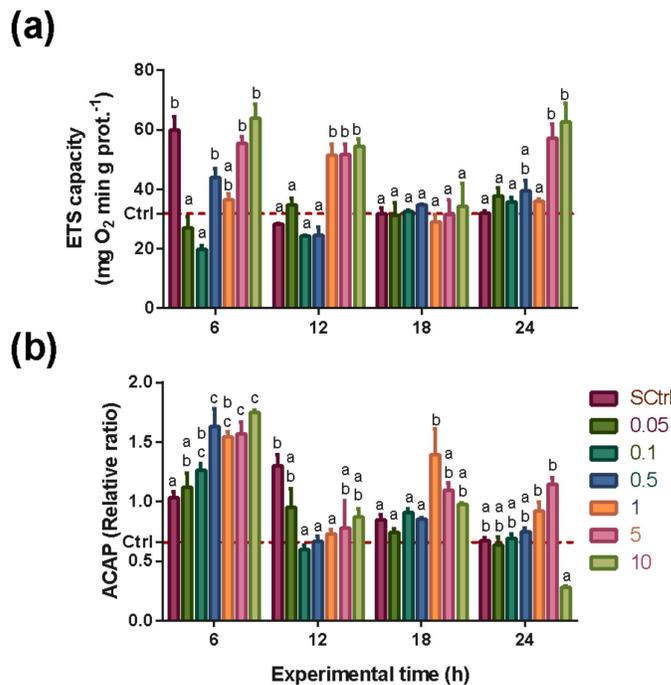


Figura 5. Atividade ETS (a) e capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) (b) ao longo do tempo (h). A linha pontilhada vermelha representa a média geral dos animais de controle. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. SCtrl: controle de solvente.

3.3.8. Análise de PCA

As quatro primeiras componentes da PCA explicaram um 83.61% da variância da matriz de dados (PC1 41,19%, PC2 21,37%, PC3 12,75%, PC4 8,29%). Foram achadas correlações positivas entre o PC1 e o teor de proteína, lactato e triglicerídeos, dentre outros. Para a PC2 existem duas variáveis correlacionadas forte e negativamente com esta, -0.85% concentração de LA e a capacidade do ETS -0,86%, a qual também apresenta correlações positivas, consideráveis com as variáveis proteína e glicose com 42 e 41% de correlação respectivamente. A PC3 apresentou as maiores correlações com os parâmetros TAN (75%), glicose (-44%) e lactato (-52%). PC4 apresentou as maiores correlações com os parâmetros glicose (-37%), triglicerídeos (44%) e ACAP (-48%). Proteína correlacionou-se positivamente lactato e triglicerídeos 53 e 70% respectivamente, e negativamente com o tempo (77%). Triglicerídeos correlacionou-se negativamente com tempo (-76%) e glicose (-31%) e positivamente com lactato (45%). A capacidade da ETS apresentou uma correlação positiva com as concentrações de LA (62%) e lactato (40%) e negativa com glicose (-45%). No caso de ACAP houve correlações negativas com tempo (-62%) e glicose (-38%) e positivas com proteína (57%), TAN (40%), lactato (48%) e triglicerídeos (34%).

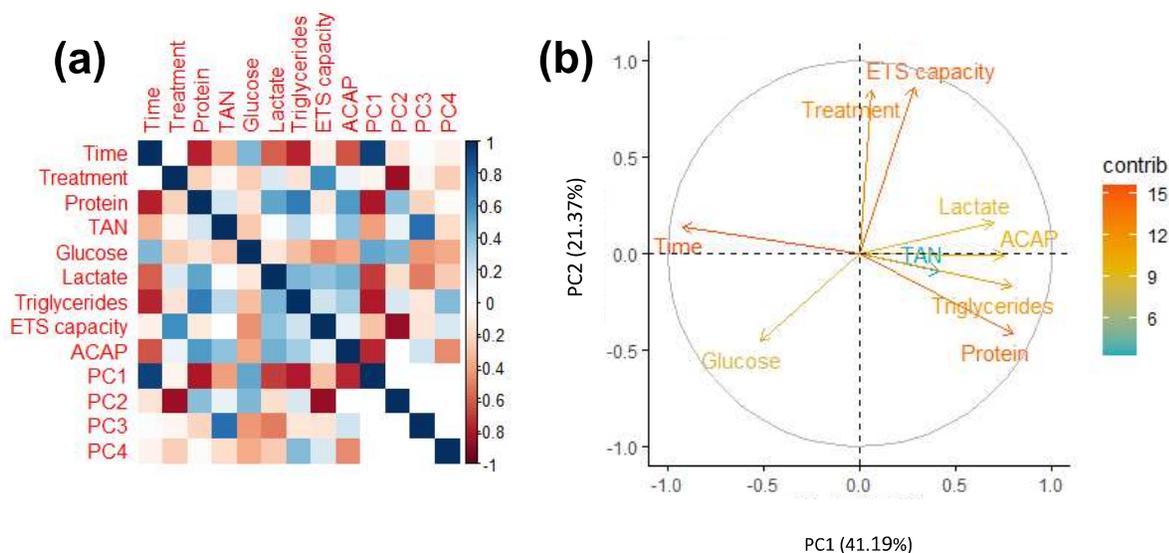


Figura 6. Resultados do PCA. (a) A matriz de correlação foi transformada em uma escala de cores. (b) A contribuição de cada variável para a porcentagem de variância explicada pelos componentes principais PC1 (eixo X) e PC2 (eixo Y).

3.4. Experimento 2

Os fatores concentração de LA e o tempo experimental apresentaram influência sobre os parâmetros de atividade da ETS e produção de ROS, sendo também registrada uma interação significativa ($p < 0,05$) entre a os tratamentos com LA e tempo de exposição para a variável atividade da ETS. No concernente a esta variável para o tempo 18 h não foram detectadas diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos, já para no tempo 24 h todos os tratamentos com LA apresentaram atividade da ETS maiores ($p < 0,05$) ao SCtrl, sem diferenças entre eles. Para a produção de ROS no tempo 18 h não foi possível observar diferenças entre os grupos experimentais, mas após 24 h houve uma diminuição na produção de ROS no tratamento com 10 μM quando comparados com o tratamento de SCtrl ($p < 0,05$) (Figura 7).

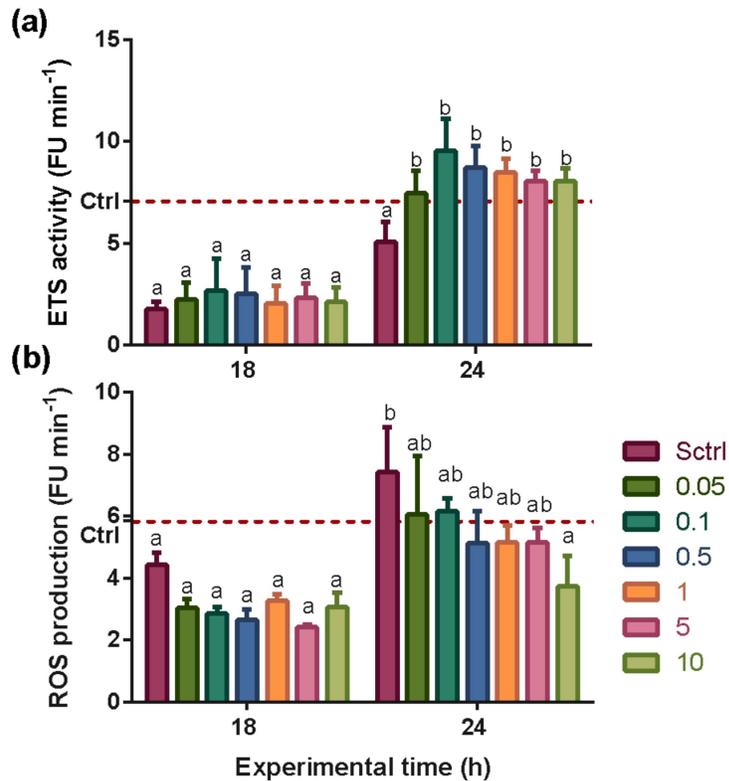


Figura 7. Atividade do sistema de transporte de elétrons in vivo (a) e concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (b) em 18 e 24 h. A linha pontilhada vermelha representa a média geral dos animais de controle. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n = 3$). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. SCtrl: controle de solvente.

4. Discussão

Os resultados de padronização do protocolo de resazurina para uma análise de cinética da atividade do ETS, apontam a que este protocolo pode ser usado para avaliar a função do ETS de náuplios de artêmia. Em animais entre as 24 e 36 h pós-hidratação dos cistos, as leituras de cinética apresentaram coeficientes de determinação abaixo de 40%, devido a isto não se recomenda o uso do protocolo neste período de vida, fato que deveria estar associado à baixa taxa metabólica dos animais nesta fase. Já a partir das 40 h pós-hidratação foram observadas leituras com coeficientes de determinação acima do 90%, que foi o tempo selecionado para efetuar as medições de ETS. A densidade de animais

apresentou, como era de se esperar, um efeito significativo sobre a cinética, apontando a que a aparição da fluorescência é dependente da atividade metabólica dos animais contidos dentro da poça. No entanto as concentrações de resazurina testadas não afetaram significativamente fluorescência gerada, se optando por utilizar uma concentração final de 0,05 mg mL⁻¹ de resazurina, que é 4 vezes inferior daquela utilizada por Reid et al. (2018) para *Danio rerio*, uma concentração que não produziu efeitos tóxicos nesta espécie tanto para fase larval quanto para fase adulta. Desta forma, pode-se supor que a concentração de resazurina utilizada permite uma estimação confiável do metabolismo do organismo, sem introduzir artefatos de técnica. A análise realizada após a isolamento da fraccao mitocondrial da *A. salina* confirmou este ponto, devido à comparação da contribuição porcentual de a cada uma das frações mostrou uma alta participação da mitocôndria na redução neta da resazurina. Este resultado indica a factibilidade do uso do metodo de quantificacao da atividade mitocondrial in vivo em *A. salina*, pelo menos para as primeira hora de vida como já foi descrito para a espécie *D. rerio* (Reid et al., 2018). Em relação à fração mitocondrial, os resultados indicam uma efeito significativo dos substratos na redução da resazurina. Comparando os resultados obtidos com o que geralmente é esperado da atividade respiratoria da mitocôndria, é possível explicar os efeitos de cada substrato na redução da resazurina. Neste caso, o succinato por ser um substrato do ETS o qual ingressa pelo complexo II para ser oxidado como doador de elétrons, causa um incremento na atividateda mitocôndria. Quando isso ocorre em ausência de ADP, o consumo de oxigênio mesmo existente acaba sendo baixo (estado 4 da resiracao mitocondrial), que deveria derivar em um leve aumento da capacidade reductora da mitocôndria como foi observado (Figura 2b). Portanto, os resultados obtidos são consistentes com a mecanica bioenergética da mitocôndria, sugerindo a resazurina como uma ferramenta confiável para a medição *in vivo* da atividade mitocondrial.

No referente aos valores de proteína observados no experimento 1, as maiores mudanças foram observadas ao longo do tempo de exposição, apresentando-se uma diminuição paulatina nos seus valores. O LA influenciou nos valores deste parâmetro embora em menor proporção do que o tempo, isto pode se explicar pelo fato dos animais estarem em jejum, situação onde a proteína disponível é susceptível de ser utilizada como fonte de energia, reduzida a aminoácidos para a ressíntese de proteína ou para produção de osmólitos como a taurina a qual é sintetizada a partir da metionina (Evjemo et al., 2001; Helland et al., 2000; Tanaka, 1993). Tendo em conta que os padrões de concentração de proteína dos grupos tratados com LA mudaram nos diferentes tempos de exposição quando comparados com o SCtrl (Figura 3a), é possível pensar em interações entre a fase de desenvolvimento da artêmia e o LA como modulador metabólico. É sabido que a maior parte da massa contida nas plaquetas vitelinas está em forma de lipoproteína (Warner et al., 1972), esta precisa ser degradada em aminoácidos os quais vão a servir como unidades formadoras de novas proteínas próprias do náuplio (Warner et al., 1972), este processo é catalisado na fase naupliar principalmente por tiol proteases como a cathepsin B-like thiol protease (Warner et al., 1995). Existe evidência sobre a regulação redox que podem sofrer as catepsinas B. Em catepsinas B purificadas de bovino foi observado que moléculas com grupos tiol como a glutatona reduzida (GSH), podem elevar a atividade proteolítica destas (Lockwood, 2002). No caso do LA reduzido (ácido dihidrolipoico ou DHLA) foi observado que concentrações entre 1-10 μM podem elevar a atividade proteolítica em até um 80% da máxima atividade da enzima em solução com 2 mM de GSH (Lockwood, 2002). Por sua vez, o LA apresentou capacidade inibitória sobre atividade da enzima (Lockwood, 2002). Tendo em conta o potencial de redução do LA de -0.29 V comparado com o da cisteína (própria da catepsina B) de -0.22 V, seria termodinamicamente inviável um efeito oxidante do LA sobre este aminoácido. Consequentemente deveria se explorar a

possibilidade do LA atuar como ligando em sítios de regulação desta enzima (Chitranshi et al., 2021). Também é importante ressaltar que o LA agindo como pro-oxidante, normalmente é reduzido a nível celular, isto implicaria uma diminuição momentânea da capacidade antioxidante do organismo prejudicando a atividade da cathepsin B-like protease. Num seguinte período, um possível aumento da capacidade antioxidante da célula pela ativação indireta da expressão dos “antioxidant response elements” (ARE) pelo LA oxidado poderia favorecer posteriormente a degradação da proteína das plaquetas vitelinas para a síntese proteica dos náuplios (Espinosa-Diez et al., 2015). Isto explicaria as ondulações da concentração da proteína dentro dos grupos tratados com LA, ao tempo que explica no tratamento SCtrl a queda constante nos teores de proteína até às 24h.

Enquanto a concentração de TAN na água, a diminuição observada no tratamento com 0,5 μM de LA pode estar indicando uma diminuição na deaminação de aminoácidos para a utilização de estes como fonte de energia, possivelmente permitindo uma maior eficiência na utilização da proteína do vitelo para o desenvolvimento da artêmia. Esta hipótese poderia explicar o fato da concentração de 0,5 μM de LA ter apresentado significativamente as menores concentrações de TAN na água junto com as maiores concentrações de proteína no tempo 18 h. Em experiências com outras espécies tem sido observado que o LA regula negativamente a expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo oxidativo de aminoácidos. Em indivíduos da carpa *Ctenopharyngodon idellus* foi observada uma diminuição da expressão das enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase quando suplementados com inclusões de 600 e 1200 mg de LA Kg^{-1} na dieta (Shi et al., 2018). Ambas proteínas participam ativamente no catabolismo dos aminoácidos e podem ser usadas como marcadores da intensidade deste processo (Jiang et al., 2015; Shi et al., 2018). No contexto da aquicultura, menores taxas de utilização da proteína como substrato energético promovem o ganho de massa

proteica no animal e podem repercutir consideravelmente na diminuição do requerimento de proteína da dieta (Hua et al., 2019). Por outro lado, uma menor produção de amônia influencia na diminuição de efluentes ricos em compostos nitrogenados provenientes da aquicultura promovendo a sustentabilidade da atividade (Herbeck et al., 2021).

No caso dos triglicerídeos não foi possível observar um efeito considerável do LA em comparação no SCtrl no decorrer do tempo experimental. Ao longo do experimento, as concentrações de triglicerídeos parecem ter apresentado um comportamento bifásico com um pico na concentração de triglicerídeos no tratamento com 0,5 μM de LA e valores baixos nas concentrações de LA mais altas (1, 5 e 10 μM). Em artemia, a maior parte da fração lipídica está armazenada em forma de lipídios neutros (80%), sendo que os triglicerídeos representam ao redor do 70% (Navarro et al., 1993). A utilização dos triglicerídeos está dividida entre a síntese de lipídeos estruturais e o fornecimento de ácidos graxos livres para a produção de energia principalmente (Evjemo et al., 2001). Embora estes resultados não apresentem um efeito significativo do LA sobre a concentração de triglicerídeos, a diferença de outros trabalhos existentes (Ruderman et al., 2010; Shi et al., 2018), em outras espécies de animais aquáticos inclusive em crustáceos tem se visto respostas similares às aqui encontradas. No caranguejo *Eriocheirus sinensis*, por exemplo, existem dois trabalhos que apontam que o LA não tem um efeito significativo sobre os teores de lipídio nesta espécie (Xu et al., 2019, 2018).

No caso da glicose, em geral houve um incremento gradativo nos níveis de glicose até o tempo 18 h, e a partir do tempo 24 h foi observada uma queda em geral dos níveis deste substrato energético. Este comportamento pode ser explicado tendo em conta as quantidades de trehalose que se encontram nos cistos de artemia. A trehalose é um dissacarídeo composto de monômeros de glicose e encontra-se armazenada em grandes concentrações dentro do cisto, atuando como protetor celular durante a fase de criptobiose

(Clegg, 1965). No entanto quando o organismo retorna a se desenvolver após reidratação, a trehalose começa a ser hidrolisada pela enzima trehalase e transformada em glicose a qual atuaria como substrato energético para suprir a atividade metabólica acelerada durante o desenvolvimento (Boulton e Huggins, 1977; Vallejo, 1989). É importante ressaltar o fato da glicose apresentar uma correlação negativa com as variáveis proteína e triglicerídeos segundo os resultados obtidos pela PCA (Figura 6), já que enquanto os níveis de proteína e triglicerídeos diminuíram, as concentrações de glicose aumentaram, pelo menos até o tempo 18 h. Isto poderia estar indicando que em condições fisiológicas normais ocorre uma maior participação da proteína e os triglicerídeos como substratos do metabolismo energético, o qual explica a pronunciada diminuição dos teores destes durante o experimento, tendo em conta que para o tempo 24 h os teores de glicose apenas começam a diminuir de maneira significativa, é possível pensar que a partir deste momento a glicose começa a ocupar um lugar de maior importância como substrato energético. A parte disto, é particularmente interessante observar que durante o experimento sempre houve grupos tratados com LA com concentrações de glicose inferiores às apresentadas pelo grupo SCtrl, isto corrobora a importância do LA como promotor do metabolismo de carboidratos (Huang et al., 2020; Sohaib et al., 2018). Estes resultados parecem entrar em concordância com o obtido para espécie *Macrobrachium nipponense* na qual foi visto que a suplementação com LA (700 e 1400 mg Kg⁻¹ de ração) provoca o aumento na expressão de enzimas da glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Ding et al., 2022). Com esta mesma espécie foi encontrado, utilizando níveis de suplementação com LA de 1000 a 5000 mg Kg⁻¹ de ração, um comportamento bifásico das expressões das enzimas hexokinase, fosfofructokinase e a piruvato kinase, com a maior expressão nas concentrações intermediárias de LA e o mesmo foi também observado na

expressão do isocitrato desidrogenase apontando a um efeito de tipo hormético induzido pelo LA (Xiong et al., 2022).

No referente ao lactato chama a atenção a grande correlação deste parâmetro com a capacidade do ETS. É possível pensar que o LA sob determinadas condições e concentrações pode incrementar a atividade do metabolismo energético acima da capacidade respiratória, onde este aumento poderia se compensar com a ativação de vias metabólicas como glicólise anaeróbia (Sokolova et al., 2012). De qualquer maneira, isto deve ser explorado em futuros trabalhos devido à ausência de dados prévios que indiquem que o LA tenha incrementado as concentrações de lactato inclusive considerando trabalhos efetuados em outros crustáceos (Ding et al., 2022; Xiong et al., 2022). Evidências sobre um aumento na atividade metabólica causada pelo LA foram encontradas nos resultados da capacidade do ETS, em geral durante o experimento este parâmetro aumentou em função à concentração do LA, isto se verifica com os resultados obtidos pela PCA (Figura 6b) onde observa-se uma alta correlação positiva entre a capacidade do ETS e a inclusão de LA no meio. Os mecanismos pelos quais isto acontece ainda devem ser esclarecidos, no entanto, existe evidencia da participação dos nucleotídeos reduzidos NADH e NADPH na redução do LA, esta redução pode ser catalisada por diversas proteínas como tioredoxina reductase, lipoamida desidrogenase, e a subunidade E3 da α -cetoglutarato desidrogenase (Ambrus et al., 2009). Este processo poderia implicar uma diminuição na relação citoplasmática e mitocondrial de NAD(P)H/NAD(P)^+ , sobre estas condições as concentrações de ADP e AMP mitocondrial deveriam se incrementar, favorecendo a consequente ativação de proteínas como a AMPK que promove o metabolismo catabólico de macromoléculas orgânicas para a liberação de substratos energéticos como glicose ou ácidos graxos com o intuito de restituir os níveis de ATP (Chen et al., 2012; Ruderman et al., 2010; Srivastava, 2016).

Um efeito observado após a suplementação com LA é o aumento da expressão da SIRT1 (Huang et al., 2020), esta é uma desacetilase dependente de NAD^+ , e que possui também a capacidade de aumentar a atividade de fatores de transcrição como o peroxisome proliferation-activated receptor gamma ($\text{PPAR}\gamma$) que atua como agonista na biogênese mitocondrial, o que poderia ter consequências em termos de aumentar a capacidade do ETS (Corona e Duchon, 2016).

No presente trabalho não foi observado um efeito consistente do LA sobre a capacidade antioxidante, diferente do encontrado em vários modelos animais. No entanto observou-se em função ao LA uma resposta ambivalente de estados de menor e de maior capacidade antioxidante através do tempo experimental. Estados de menor capacidade antioxidante foram evidenciados nos tempos 6 e 18 h e outros de maior capacidade antioxidante para os tempos 12 e 24 h, embora neste último tempo isto tenha acontecido só na concentração 10 μM de LA (Figura 5). Estas respostas diferenciadas estariam refletindo o duplo papel do LA como pro-oxidante e antioxidante que explicaria a gradativa diminuição da capacidade antioxidante observada no tempo 6 h conforme aumentava a concentração de LA, para os tempos posteriores é importante considerar que os incrementos evidenciados no ETS promovidos pela adição do LA ao meio poderiam ter influenciado os resultados apresentados na capacidade antioxidante dos animais. Assim, a interpretação destes resultados pode estar fortemente ligada aos efeitos do LA como promotor do metabolismo energético, onde um aumento da fosforilação oxidativa pode provocar o incremento da produção de ROS (Hou et al., 2021) que em princípio deveriam ser interceptadas como mecanismo de proteção pelas defesas antioxidantes (Zheng et al., 2016). É claro que a demanda por antioxidantes endógenos em situações de elevada produção de ROS pode derivar em diminuições da capacidade antioxidante (Bolzan et al., 2021). Adicionalmente, isto explica o porquê para um aumento metabólico ocorrer de maneira fisiologicamente

sustentável devem ser ativadas em conjunto vias metabólicas para a produção de antioxidantes ativamente consumidos (Corona e Duchon, 2016; Hinchey et al., 2018; Palmeira et al., 2019), esta ideia se suportada nas evidências sobre a íntima relação entre a ativação da AMPK e a expressão de genes antioxidantes, onde as modificações pós-transcricionais que esta proteína realiza sobre o Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) provoca a migração deste para o núcleo onde age como ligando nos ARE para ativar sua expressão (Joo et al., 2016).

São necessários mais estudos de como o LA pode agir em animais que se encontram em uma fase de desenvolvimento acelerado e com uma disponibilidade de nutrientes limitada como é o vitelo. O LA produz nos animais mudanças metabólicas (resultados de glicose e do ETS) que implicam um uso mais acelerado das reservas energéticas as quais podem interagir (ou antagonizar) com as demandas fisiológicas normais nesta fase de vida. Nesta situação o organismo poderia se ver forçado a priorizar funções fisiológicas de maneira diferente a como aconteceria em organismos de desenvolvimento menos acelerado e/ou com uma ingestão constante de nutrientes.

Sintetizando as respostas obtidas na análise de PCA (Figura 6), segundo a alta correlação do PC1 com tempo é possível determinar que este fator foi o que mais contribuiu com a variabilidade observada dentro dos dados, onde em geral apresentou-se a diminuição das concentrações de nutrientes conforme decorria o experimento. A correlação observada entre o tratamento com LA e o PC2 é evidência do papel que o LA teve sobre a variabilidade dos dados. Julgando pela alta correlação entre as concentrações de LA e a capacidade do ETS é possível inferir que a variabilidade gerada foi através de modulações no metabolismo energético mais do que do sistema antioxidantes o qual correlacionou-se principalmente com o tempo. Por fim é necessário ressaltar que a correlação negativa entre a variável glicose e as concentrações de LA pode ser um indício da influência que o

LA tem como promotor do catabolismo da glicose possivelmente através da regulação positiva da atividade energética mitocondrial.

Em concordância com os dados obtidos *in vitro* da capacidade do ETS, *in vivo* foi possível evidenciar um efeito significativo do LA sobre o metabolismo oxidativo no tempo 24 h. Neste tempo também há uma queda gradativa da produção de ROS com a adição de LA (apesar de existir diferenças só entre os tratamentos SCtrl e 10 μ M). Enquanto o LA, este aparentemente não promoveu a capacidade antioxidante, mas paradoxalmente parece ter tido um efeito considerável sobre a produção de ROS, isto parece contraintuitivo pela alta atividade do ETS, baixa capacidade antioxidante, sem embargo tendo em conta que a produção de ROS não chega a ser superior à do SCtrl, é possível pensar que a causa da diminuição da capacidade antioxidante nos animais tratados com LA seja consequência da diminuição da produção de ROS como efeito do LA como, o qual seria uma resposta adaptativa para o organismo. Adicionalmente, é possível pensar de maneira paralela que o aumento observado na atividade do ETS diretamente tenha influenciado a diminuição da capacidade antioxidante para a contenção do ROS produto da respiração mitocondrial.

Em conclusão o uso do LA como aditivo na água de náuplios de artêmia conseguiu promover o metabolismo energético dos animais a partir do incremento do uso da glicose principalmente e diminuindo a produção de ROS. Integrando os resultados apresentados nos teores de proteína e a produção de TAN é possível pensar em uma diminuição da oxidação de aminoácidos para a produção de energia, aspectos que deveriam ser alvos de pesquisa em futuros trabalhos.

Referências

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of The Total Environment* 407, 2115–2123. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2008.11.038

Ambrus, A., Tretter, L., Adam-Vizi, V., 2009. Inhibition of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase-mediated reactive oxygen species generation by lipoic acid. *Journal of Neurochemistry* 109, 222–229. doi:10.1111/J.1471-4159.2009.05942.X

Bolzan, L.P., Barroso, D.C., Souza, C.F., Oliveira, F.C., Wagner, R., Baldisserotto, B., Val, A.L., Baldissera, M.D., 2021. Dietary supplementation with nerolidol improves the antioxidant capacity and muscle fatty acid profile of *Brycon amazonicus* exposed to acute heat stress. *Journal of Thermal Biology* 99, 103003. doi:https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103003

Boulton, A.P., Huggins, A.K., 1977. Biochemical changes occurring during morphogenesis of the brine shrimp *Artemia salina*. and the effect of alterations in salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 57, 17–22. doi:10.1016/0300-9629(77)90341-3

Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 54, 172–178. doi:10.1016/J.FSI.2016.04.011

Castro, M.C., Massa, M.L., Schinella, G., Gagliardino, J.J., Francini, F., 2013. Lipoic acid prevents liver metabolic changes induced by administration of a fructose-rich diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 2226–2232. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.010

Chen, W.-L., Kang, C.-H., Wang, S.-G., Lee, H.-M., 2012. α -Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of sirtuin 1 (SIRT1) and activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 2012 55:6 55, 1824–1835. doi:10.1007/S00125-012-2530-4

Chitranshi, N., Kumar, A., Sheriff, S., Gupta, Veer, Godinez, A., Saks, D., Sarkar, S., Shen, T., Mirzaei, M., Basavarajappa, D., Abyadeh, M., Singh, S.K., Dua, K., Zhang, K.Y.J., Graham, S.L., Gupta, Vivek, 2021. Identification of Novel Cathepsin B Inhibitors with Implications in Alzheimer's Disease: Computational Refining and Biochemical Evaluation. *Cells* 10. doi:10.3390/cells10081946

Clegg, J.S., 1965. The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 14, 135–143. doi:https://doi.org/10.1016/0010-406X(65)90014-9

Corona, J.C., Duchon, M.R., 2016. PPAR γ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology & Medicine* 100, 153. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.06.023

Cristóbal-Azkarate, J., Maréchal, L., Semple, S., Majolo, B., MacLarnon, A., 2016. Metabolic strategies in wild male Barbary macaques: evidence from faecal measurement of thyroid hormone. *Biology Letters* 12, 20160168. doi:10.1098/rsbl.2016.0168

Ding, Z., Xiong, Y., Zheng, J., Zhou, D., Kong, Y., Qi, C., Liu, Y., Ye, J., Limbu, S.M., 2022. Modulation of growth, antioxidant status, hepatopancreas morphology, and carbohydrate metabolism mediated by alpha-lipoic acid in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium nipponense* under two dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 546, 737314. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737314

- Encarnação, P., 2016. Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation* 217–237. doi:10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*. doi:10.1016/j.redox.2015.07.008
- Evjemo, J.O., Danielsen, T.L., Olsen, Y., 2001. Losses of lipid, protein and n–3 fatty acids in enriched *Artemia franciscana* starved at different temperatures. *Aquaculture* 193, 65–80. doi:10.1016/S0044-8486(00)00470-1
- Fuchs, V.I., Schmidt, J., Slater, M.J., Zentek, J., Buck, B.H., Steinhagen, D., 2015. The effect of supplementation with polysaccharides, nucleotides, acidifiers and *Bacillus* strains in fish meal and soy bean based diets on growth performance in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 437, 243–251. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2014.12.007
- Gopalan, G., Madon, S.P., Culver, D.A., Pappas, P.W., 1996. Measurement of metabolism in free ranging juvenile fishes using electron transport system (ETS) enzyme assays. International Congress on the Biology of Fishes, San Francisco.
- Helder, W., De Vries, R.T.P., 1979. An automatic phenol-hypochlorite method for the determination of ammonia in sea- and brackish waters. *Netherlands Journal of Sea Research* 13, 154–160. doi:https://doi.org/10.1016/0077-7579(79)90038-3
- Helland, S., Triantaphyllidis, G. V., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., Lavens, P., Sorgeloos, P., 2000. Modulation of the free amino acid pool and protein content in populations of the brine shrimp *Artemia* spp. *Marine Biology* 2000 137:5 137, 1005–1016. doi:10.1007/S002270000409

Herbeck, L.S., Krumme, U., Nordhaus, I., Jennerjahn, T.C., 2021. Pond aquaculture effluents feed an anthropogenic nitrogen loop in a SE Asian estuary. *Science of The Total Environment* 756, 144083. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.144083

Hinchey, E.C., Gruszczyk, A. V, Willows, R., Navaratnam, N., Hall, A.R., Bates, G., Bright, T.P., Krieg, T., Carling, D., Murphy, M.P., 2018. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *Journal of Biological Chemistry* 293, 17208–17217. doi:10.1074/jbc.RA118.002579

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A., Zhou, Z., 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 9, 2429. doi:10.3389/FMICB.2018.02429/BIBTEX

Hou, C., Metcalfe, N.B., Salin, K., 2021. Is mitochondrial reactive oxygen species production proportional to oxygen consumption? A theoretical consideration. *BioEssays* 43, 2000165. doi:https://doi.org/10.1002/bies.202000165

Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J.M., 2019. The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth* 1, 316–329. doi:https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018

Huang, C. Cui., Sun, J., Ji, H., Oku, H., Chang, Z.-G., Tian, J.-J., Yu, E.-M., Xie, J., 2019. Influence of dietary alpha-lipoic acid and lipid level on the growth performance, food intake and gene expression of peripheral appetite regulating factors in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 505, 412–422. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.02.054

- Huang, C. Cui, Sun, J., Ji, H., Kaneko, G., Xie, X. da, Chang, Z. guang, Deng, W., 2020. Systemic effect of dietary lipid levels and α -lipoic acid supplementation on nutritional metabolism in zebrafish (*Danio rerio*): focusing on the transcriptional level. *Fish Physiology and Biochemistry* 46, 1631–1644. doi:10.1007/s10695-020-00795-8
- Ince, C., Coremans, J.M.C.C., Bruining, H.A., 1992. In Vivo NADH Fluorescence, in: Erdmann, W., Bruley, D.F. (Eds.), *Oxygen Transport to Tissue XIV*. Springer US, Boston, MA, pp. 277–296. doi:10.1007/978-1-4615-3428-0_30
- Jia, S., Li, X., Zheng, S., Wu, G., 2017. Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish. *Amino Acids* 49, 2053–2063. doi:10.1007/s00726-017-2481-7
- Jiang, J., Feng, L., Tang, L., Liu, Y., Jiang, W., Zhou, X., 2015. Growth rate, body composition, digestive enzymes and transaminase activities, and plasma ammonia concentration of different weight Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Animal Nutrition* 1, 373–377. doi:10.1016/J.ANINU.2015.12.006
- Jocelyn, P.C., 1967. The Standard Redox Potential of Cysteine-Cystine from the Thiol-Disulphide Exchange Reaction with Glutathione and Lipoic Acid. *European Journal of Biochemistry* 2, 327–331. doi:10.1111/J.1432-1033.1967.TB00142.X
- Joo, M.S., Kim, W.D., Lee, K.Y., Kim, J.H., Koo, J.H., Kim, S.G., 2016. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Molecular and Cellular Biology* 36, 1931–1942. doi:10.1128/MCB.00118-16
- Koyama, T., Texada, M.J., Halberg, K.A., Rewitz, K., 2020. Metabolism and growth adaptation to environmental conditions in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77, 4523–4551. doi:10.1007/s00018-020-03547-2

- Kütter, M.T., Monserrat, J.M., Primel, E.G., Caldas, S.S., Tesser, M.B., 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture* 368–369, 29–35. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2012.09.010
- Li, X., Han, T., Zheng, S., Wu, G., 2021. Nutrition and Functions of Amino Acids in Aquatic Crustaceans, in: Wu, G. (Ed.), *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in the Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals*. Springer International Publishing, Cham, pp. 169–198. doi:10.1007/978-3-030-54462-1_9
- Li, X., Shixuan Zheng, Jia, S., Song, F., Zhou, C., Wu, G., 2020. Oxidation of energy substrates in tissues of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Amino Acids* 52, 1017–1032. doi:10.1007/s00726-020-02871-y
- Lockwood, T.D., 2002. Cathepsin B Responsiveness to Glutathione and Lipoic Acid Redox. *Antioxidants & Redox Signaling* 4, 681–691. doi:10.1089/15230860260220193
- Lu, D.L., Limbu, S.M., Lv, H.B., Ma, Q., Chen, L.Q., Zhang, M.L., Du, Z.Y., 2019. The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary α -lipoic acid, β -glucan and l-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 86, 785–793. doi:10.1016/J.FSI.2018.12.023
- Maczurek, A., Hager, K., Kenklies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D.A., Münch, G., 2008. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1463–1470. doi:10.1016/j.addr.2008.04.015
- Mohseni, M., Ozorio, R.O.A., Pourkazemi, M., Bai, S.C., 2008. Effects of dietary l-carnitine supplements on growth and body composition in beluga sturgeon (*Huso huso*)

juveniles. *Journal of Applied Ichthyology* 24, 646–649.
doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01121.x>

Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Chapter 17 Fasting and starvation, in: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Metabolic Biochemistry, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, pp. 393–434. doi:[https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80020-2](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80020-2)

Navarro, J.C., Amat, F., Sargent, J.R., 1993. The lipids of the cysts of freshwater- and marine-type *Artemia*. *Aquaculture* 109, 327–336. doi:10.1016/0044-8486(93)90172-U

Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. *Marine Biology* 30, 27–36. doi:10.1007/BF00393750

Ozório, R.O.A., Van Eekeren, T.H.B., Huisman, E.A., Verreth, J.A.J., 2001. Effects of dietary carnitine and protein energy:nonprotein energy ratios on growth, ammonia excretion and respiratory quotient in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) juveniles. *Aquaculture Research* 32, 406–414.
doi:<https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00031.x>

Palmeira, C.M., Teodoro, J.S., Amorim, J.A., Steegborn, C., Sinclair, D.A., Rolo, A.P., 2019. Mitohormesis and metabolic health: The interplay between ROS, cAMP and sirtuins. *Free Radical Biology and Medicine* 141, 483–491.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.017>

Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chavernac, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Moon, T.W., 2009. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American*

Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 297, R707–R715. doi:10.1152/ajpregu.00120.2009

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. Journal of Comparative Physiology B 182, 1015–1045. doi:10.1007/s00360-012-0658-7

Reid, R.M., D'Aquila, A.L., Biga, P.R., 2018. The validation of a sensitive, non-toxic in vivo metabolic assay applicable across zebrafish life stages. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 208, 29–37. doi:10.1016/J.CBPC.2017.11.004

Rodrigues, R.V., Maltez, L.C., Ferreira, C.C., Oliveira, T.P.A.P., Sampaio, L.A., Monserrat, J.M., 2021. ROS in vivo determination and antioxidant responses in rotifers *Brachionus plicatilis* fed with commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* or microalgae *Nannochloropsis oculata*. Aquaculture International 29, 1657–1667. doi:10.1007/S10499-021-00707-4/TABLES/2

Ruderman, N.B., Xu, X.J., Nelson, L., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Lan, F., Ido, Y., 2010. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00745.2009> 298. doi:10.1152/AJPENDO.00745.2009

Sánchez Rojas, F., Cano Pavón, J.M., 2005. SPECTROPHOTOMETRY | Biochemical Applications, Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition. Elsevier. doi:10.1016/B0-12-369397-7/00722-6

Seibel, B.A., Drazen, J.C., 2007. The rate of metabolism in marine animals: environmental constraints, ecological demands and energetic opportunities. Philosophical

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 362, 2061–2078.
doi:10.1098/rstb.2007.2101

Shi, X.C., Jin, A., Sun, J., Tian, J.J., Ji, H., Chen, L.Q., Du, Z.Y., 2018. The protein-sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*: Effects on lipolysis, fatty acid β -oxidation and protein synthesis. British Journal of Nutrition 120, 977–987. doi:10.1017/S000711451800226X

Sohaib, M., Anjum, F.M., Nasir, M., Saeed, F., Arshad, M.S., Hussain, S., 2018. Alpha-lipoic acid: An inimitable feed supplement for poultry nutrition. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. doi:10.1111/jpn.12693

Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research 79, 1–15.
doi:10.1016/J.MARENRES.2012.04.003

Srivastava, S., 2016. Emerging therapeutic roles for NAD⁺ metabolism in mitochondrial and age-related disorders. Clinical and Translational Medicine 5, e25.
doi:10.1186/S40169-016-0104-7

Tanaka, Y., 1993. Influence of Body Weight and Food Density on Kinetics of Ammonia Excretion by the Brine Shrimp *Artemia franciscana*. Journal of the World Aquaculture Society 24, 499–503. doi:10.1111/J.1749-7345.1993.TB00580.X

Terjesen, B., Park, K., Tesser, M.B., Portella, M.C., Zhang, Y., Dabrowski, K., 2004. Lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free amino acids selectively in the teleost fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Journal of Nutrition 134, 2930–2934.
doi:10.1093/jn/134.11.2930

- Tong, X., Yang, X., Bao, C., Wang, J., Tang, X., Jiang, D., Yang, L., 2017. Changes of biochemical compositions during development of eggs and yolk-sac larvae of turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 473, 317–326. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.024>
- Vallejo, C.G., 1989. *Artemia* Trehalase: Regulation by Factors that Also Control Resumption of Development, in: Warner, A.H., MacRae, T.H., Bagshaw, J.C. (Eds.), *Cell and Molecular Biology of Artemia Development*. Springer US, Boston, MA, pp. 173–189. doi:[10.1007/978-1-4757-0004-6_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0004-6_14)
- Vázquez, R., González, S., Rodríguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119, 273–286. doi:[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90182-1)
- Walsh, M.C., Jacquier, V., Schyngs, G., Claypool, J., Tamburini, I., Blokker, B., Geremia, J.M., 2021. A novel microbiome metabolic modulator improves the growth performance of broiler chickens in multiple trials and modulates targeted energy and amino acid metabolic pathways in the cecal metagenome. *Poultry Science* 100, 100800. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.054>
- Wang, X., Li, E., Chen, L., 2016. A Review of Carbohydrate Nutrition and Metabolism in Crustaceans. *North American Journal of Aquaculture* 78, 178–187. doi:[10.1080/15222055.2016.1141129](https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1141129)
- Warner, A.H., Perz, M.J., Osahan, J.K., Zielinski, B.S., 1995. Potential role in development of the major cysteine protease in larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Cell and Tissue Research* 282:1 282, 21–31. doi:[10.1007/BF00319129](https://doi.org/10.1007/BF00319129)

Warner, A.H., Puodziukas, J.G., Finamore, F.J., 1972. Yolk platelets in brine shrimp embryos: Site of biosynthesis and storage of the diguanosine nucleotides. *Experimental Cell Research* 70, 365–375. doi:10.1016/0014-4827(72)90148-6

Xiong, Y., Li, Q., Ding, Z., Zheng, J., Zhou, D., Wei, S., Han, X., Cheng, X., Li, X., Xue, Y., 2022. Dietary α -lipoic acid requirement and its effects on antioxidant status, carbohydrate metabolism, and intestinal microflora in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture* 547, 737531. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737531

Xu, C., Li, E., Liu, S., Huang, Z., Qin, J.G., Chen, L., 2018. Effects of α -lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant status and lipid catabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed different lipid percentage. *Aquaculture* 484, 286–292. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2017.09.036

Xu, C., Wang, X., Han, F., Qi, C., Li, E., Guo, J., Qin, J.G., Chen, L., 2019. α -lipoic acid regulate growth, antioxidant status and lipid metabolism of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: Optimum supplement level and metabonomics response. *Aquaculture* 506, 94–103. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.03.029

Xu, N., Fu, J., Wang, H., Lu, L., 2021. Quercetin counteracts the pro-viral effect of heat shock response in grass carp cells with its therapeutic potential against aquareovirus. *Aquaculture Research* 52, 3164–3173. doi:10.1111/ARE.15163

Zhang, Y., Lu, R., Qin, C., Nie, G., 2020. Precision nutritional regulation and aquaculture. *Aquaculture Reports* 18, 100496. doi:10.1016/J.AQREP.2020.100496

Zheng, J.-L., Zeng, L., Shen, B., Xu, M.-Y., Zhu, A.-Y., Wu, C.-W., 2016. Antioxidant defenses at transcriptional and enzymatic levels and gene expression of Nrf2-Keap1

signaling molecules in response to acute zinc exposure in the spleen of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* 52, 1–8.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.031>

CAPÍTULO 3

Efeito combinado do ácido lipóico e o acetato de sódio no metabolismo, balanço redox e utilização de reservas vitelinas de nauplios de *Artemia* sp.

Juan Rafael Buitrago Ramírez¹, Robson Matheus Marreiro Gomes¹, Alan Araujo¹, Thiago Obiedo Garcia², José María Monserrat^{1,2}

¹Laboratório de bioquímica e fisiologia de organismos aquáticos, Instituto de Oceanologia, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Brazil.

²Laboratório de espécies ativas de oxigênio, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, Brazil.

Resumo

O ácido lipóico (LA) tem sido um antioxidante de comprovados benefícios em diferentes espécies de interesse produtivo. No entanto, existem evidências sobre o efeito do LA como repressor do crescimento e conseqüentemente do desempenho zootécnico. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da co-administração do LA e o ácido graxo de cadeia curta, acetato de sódio (SA) como fonte adicional de energia sobre a utilização dos nutrientes vitelinos em náuplios de *Artemia* sp. Para isso foi delineado um experimento fatorial com quatro níveis de LA (0,0; 0,05; 0,5; e 5 μ M) e quatro níveis de SA (0,0; 2,0; 4,0; e 8,0 mM). Ao longo de 24 h, com amostragens a cada 6 h, foram avaliados a concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN) na água e na artêmia, a concentração de proteína, triglicerídeos, glicose e a capacidade antioxidante (ACAP) nas artêmias. Também foram registradas a atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) e produção de espécies reativas de oxigênio *in vivo*. Tanto o LA quanto o SA conseguiram diminuir a produção de TAN. O LA provocou diminuições significativas do teor de glicose no tempo 18 h nas concentrações de 0,5 e 5 μ M, por outro lado o SA partir do tempo 12 h preservou os valores de proteína de maneira dose-dependente. Em relação à ACAP o LA apresentou efeitos ambivalentes sobre este parâmetro, tendo promovido no tempo 6 h uma maior

ACAP, mas em 24 h promoveu um estado mais pro-oxidante nos metanúplios. Enquanto à atividade do ETS, observou-se aumentos no tempo de 6 h como efeito do SA e LA administrados de maneira isolada, no entanto a co-administração LA e SA revelou um possível antagonismo que provocou uma diminuição da atividade do ETS por ação do LA. Já para ROS encontrou-se uma diminuição das taxas de produção com a administração do LA a qual foi mais notória nas concentrações de LA dentro dos níveis de 0 e 2 mM de SA a partir do tempo 18 h. Por fim, o conteúdo final de energia mostrou um cenário de preservação das reservas energéticas dos náuplios de artêmia com a adição do SA. Como esperado, o LA teve um efeito negativo sobre os conteúdos de energia dos animais, no entanto o tratamento com o maior conteúdo de energia foi o que recebeu 0,05 μM de LA e 8,0 mM de SA, sugerindo a possibilidade de utilizar estes compostos de forma conjunta.

Palavras-chave: suplementos nutricionais; reservas energéticas; antioxidantes; transporte de elétrons; capacidade antioxidante

1. Introdução

Cada vez é mais comum na aquicultura a utilização de aditivos na dieta que promovam no animal a expressão de vias metabólicas compatíveis com a produção e a sanidade animal (Encarnação, 2016). Substâncias como antioxidantes, prebióticos, probióticos, acidificantes, enzimas exógenas, dentre outras, estão se tornando em alternativas de provada eficácia para o desenvolvimento da aquicultura (Carbone e Faggio, 2016; Fuchs et al., 2015; Hoseinifar et al., 2018; Kütter et al., 2012; León et al., 2018; Xu et al., 2021; Zheng et al., 2020). Dentro das práticas de adição de compostos na dieta deve ser sempre considerado o potencial que estes possuem de modular a bioquímica e fisiologia do animal, assim o conhecimento disto pode repercutir enormemente na elaboração de estratégias de

nutrição de precisão, não só para o fornecimento de compostos de maneira isolada, mas para a sua integração em forma de pacotes tecnológicos “meta-nutricionais” que integrados à dieta potencializem o seu aproveitamento e/ou diminuam os possíveis efeitos anti-nutricionais que esta possua (Fiore et al., 2016; Romano et al., 2015).

Um dos compostos que mais tem chamado a atenção na nutrição animal, pelos seus efeitos como antioxidante e modulador metabólico é o ácido lipóico (LA) o qual pode ser sintetizado pelo organismo e atua como coenzima para o funcionamento de desidrogenases mitocondriais, motivo pelo qual manifesta uma grande ingerência sobre o metabolismo energético da célula (Gorça et al., 2011; Sohaib et al., 2018). O LA age como antioxidante através da ativação de vias de sinalização para produção de compostos antioxidantes endógenos. No contexto da aquicultura o LA tem demonstrado agir de maneira eficaz como antioxidante, no entanto, é comum observar diminuições no ganho de peso dos animais tratados com ele (Kütter et al., 2012; Liu et al., 2018; Shi et al., 2018), devido à capacidade do LA de promover a produção de energia e biogênese mitocondrial em detrimento da estocagem de lipídios (Ide, 2018; Schiller Vestergren et al., 2011; Shi et al., 2018). Devido a isso, tem sido testadas estratégias paliativas mediante a implementação de dietas com alto teor energético através do incremento nas inclusões de carboidratos ou lipídios fornecido na dieta (Huang et al., 2020; Santos et al., 2016). Por outro lado, existem alternativas a estes substratos energéticos que podem agir econômica e produtivamente de maneira satisfatória.

Um exemplo notável dentro deste contexto é o acetato, este é classificado como um ácido graxo de cadeia curta, comumente sintetizado a partir do catabolismo da glicose ou da glutamina em forma de acetil-CoA. Esta por sua vez serve como substrato para a produção de ATP e nucleotídeos reduzidos (NADH e FADH₂) dentro do ciclo de Krebs. O acetato também é um precursor para a síntese de lipídios, no entanto neste processo precisa-se da

sua ativação a partir de acetil-CoA sintetases as quais acoplam o acetato à coenzima A em uma reação dependente de ATP. A importância do acetil-CoA não se limita a servir de substrato para a síntese de lipídio ou produção de energia, em *Artemia* sp. já foi observado mediante a utilização de acetato de sódio (SA) $2\text{-}^{14}\text{C}$ na água, que o carbono próprio do acetato de pode derivar para a síntese de aminoácidos como alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina e prolina (Huggins, 1969). Observações similares tem sido reportadas para outros crustáceos como a *Daphnia magna* e *Cyclops strenus* as quais possuem uma marcada capacidade para o aproveitamento do SA como nutriente dissolvido na água (Farkas et al., 1981). Em concordância com o anterior, resultados benéficos no nível zootécnico têm sido apresentados em espécies como *Litopenaeus vannamei*, *Danio rerio* e *Portunus pelagicus* quando suplementadas com SA, dentre os quais sobressai o aumento da taxa específica de crescimento dos animais (Silva et al., 2016; Sukor et al., 2016; Zhang et al., 2020). Além dos efeitos zootécnicos do SA, têm sido observados efeitos desde composto sobre o catabolismo de lipídios, no que pode atuar em função à concentração como regulador negativo da acil CoA sintetase a qual é inibida em situações de altas concentrações de acetil CoA (Gao et al., 2016; Shi e Tu, 2015; Smith et al., 2013).

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação integrada do LA e SA no metabolismo na utilização das reservas vitelinas de nauplios de *Artemia* sp. como modelo experimental, visando diminuir a utilização do vitelo como fonte de energia, através da administração do SA, em situações nas que o metabolismo catabólico do animal pode se encontrar ativado devido ao tratamento com LA.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

Foi incubada 1 g L⁻¹ de cistos de artemia em 4 cones imhoff a salinidade de 35 e 28 °C durante 24 h em fotoperíodo constante, depois coletaram-se os náuplios em um béquer do qual tomou-se 1 mL para resuspender em 99 mL de água de mar. Desta nova suspensão foi extraído 1 mL mediante uma pipeta de vidro na qual contou-se a quantidade de náuplios extraídos, desta maneira foi determinada a densidade de artemias dentro do béquer de coleta, a seguir os náuplios de artemia foram resuspensos em água filtrada a 0,22 µm e autoclavada, na densidade de 2500 artemias mL⁻¹. A seguir, 200 µl da água com artemias foram distribuídas em placas transparentes de 24 poças, se adicionando na sequência 1,8 mL de água filtrada e autoclavada.

2.2. Exposição ao LA e ao acetato de sódio

Utilizaram-se três concentrações de LA (0,05; 0,5; e 5 µM) (Francis et al, 2012) e três concentrações de SA (2; 4; e 8 mM) (Huggins, 1969) adicionalmente usou-se como grupo controle água destilada filtrada a 0,22 µm, aplicando como delineamento um fatorial completo. A cada 6 h foram coletadas 3 poças de cada tratamento durante 24 h. Os animais foram filtrados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para análises posteriores. Amostras de água de cada poça foram coletadas em microtubos de 1,5 mL para dosagem da concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN).

2.3. Medição de nitrogênio amoniacal total (TAN)

Para a dosagem de TAN aplicou-se o protocolo de Helder e De Vries (1979), a reação foi levada a cabo em microtubos de 1,5 ml os quais incubaram-se durante 3 h a 25 °C, 150 µL por triplicado foram extraídos de cada microtubo e transferidos a placas transparentes de 96 poças para ser lida a absorbância a 640 nm em espectrofluorímetro Synergy™ HT - BioTek, adicionalmente foi feita uma curva de calibração utilizando NH₄Cl com a qual calculou-se a concentração de TAN (mg L⁻¹) nas amostras de água.

2.4. Atividade do sistema transportador de elétrons (ETS) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Cistos de artêmia foram incubados durante 24 h em cone imhoff, como já descrito, depois disto a artêmia já eclodida foi filtrada e resuspendida em água de mar filtrada e autoclavada, estocada em 8 placas brancas de 96 poças numa densidade de 250 animais mL⁻¹, incubadas a 28 °C, e tratadas com as concentrações de LA e SA já mencionadas na secção 2.2., cada tratamento foi replicado 6 vezes em cada placa. Para a medição da atividade do ETS foi utilizado o reagente resazurina (Sigma-Aldrich) que quando reduzido em resorufina pela atividade mitocondrial do ETS pode ser medida por fluorescência (comprimentos de 590 e 530 nm para excitação e emissão, respetivamente) no espectrofluorímetro Synergy™ HT - BioTek. A cada 6 horas durante 24 h adicionou-se em duas placas 0,5 mg mL⁻¹ de resazurina em três réplicas de cada tratamento de cada placa, segundo o protocolo de Reid et al. (2018) para *Danio rerio* e 8,3 µM de 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA; Sigma-Aldrich) nas três réplicas restantes de cada placa (Rodrigues et al., 2021). A adição da resazurina e H₂DCF-DA nas duas placas analisadas para cada tempo de coleta teve um lapso de diferença de 30 min suficiente para fazer a leitura da placa com H₂DCF-DA após 30 min de leitura da placa na que foi adicionada a resazurina. As leituras foram feitas com o auxílio do espectrofluorímetro Synergy™ HT - BioTek (excitation: 485 nm; emission: 520 nm). Para cada poça calculou-se a velocidade linear do crescimento da fluorescência expressa em unidades de fluorescência/min (FU)/min)

2.5. Processamento de amostras

As amostras armazenadas a -80°C foram descongeladas, pesadas e diluídas 10 vezes utilizando em tampão de homogeneização (0,09 M Na₂HPO₄, 0,09 M KHPO₄, 0,45 mg

mL⁻¹ polyvinylpyrrolidone, 22,5 µM de MgSO₄ e 0,16% de Triton X-100), logo foram homogenizadas por sonicação a 40 KHz com tip de 3 mm de diâmetro, aplicando pulsos de 30 s durante 3 min e mantendo permanentemente as amostras em gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi armazenado em microtubos de 500 µL para a aplicação das análises bioquímicas.

2.6. Análises bioquímicas

2.6.1. Proteína

A dosagem de proteína foi realizada aplicando o protocolo de Biureto descrito em Sánchez Rojas e Cano Pavón (2005). Duas alíquotas de cada amostra foram depositadas em microtubos de 1,5 mL às quais adicionou-se o reagente de Biureto, como branco da análise foi utilizado o tampão de homogeneização e como padrão utilizou-se uma solução de albumina sérica bovina de 40 mg de proteína mL⁻¹ aos quais também foi adicionado o reagente de Biureto. Após uma incubação de 10 min as soluções foram distribuídas em microplacas de 96 poças, utilizando duas poças por microtubo e lidas em espectrofluorímetro no comprimento de 550 nm. A concentração de proteína foi calculada em função a absorbância obtida pela solução padrão de proteína (40 mg mL⁻¹), os dados de proteína foram expressos em mg g⁻¹ de amostra.

2.6.2. Triglicerídeos

A análise foi feita usando o kit comercial monorreagente da Bioclin (RS, Brazil). Brevemente, a análise foi feita em placas de 96 poças transparentes com fundo chato, cada amostra, a quantidade equivalente de tampão (branco) ou de padrão de triglicerídeo (1 mg mL⁻¹) foram agregados em duplicata nas poças, após ter sido adicionado o monorreagente

para triglicerídeos nas poças das placas, as placas foram incubadas a 37 °C durante 5 min e a absorbância foi registrada no comprimento de 500 nm. As concentrações de triglicerídeos das amostras foram calculadas em função da absorbância obtida da solução padrão de triglicerídeos, os dados resultantes foram expressos em mg g⁻¹ de amostra.

2.6.3.Glicose

Para quantificar a concentração de glicose foi utilizado o kit monorreagente da Bioclin (RS, Brazil) segundo as indicações do fabricante, utilizaram-se os homogeneizados das amostras de artêmia, o tampão de homogeneização como branco da análise e uma solução padrão de glicose na concentração de 1 mg mL⁻¹. O procedimento foi realizado em placas transparente de 96 poços. Após a adição do monorreagente para glicose as placas foram incubadas a 37 °C por 10 min e lidas a 505 nm, as concentrações de glicose das amostras foram calculadas em função a absorbância obtida da solução padrão de glicose e os dados foram expressos em mg g⁻¹ de amostra.

2.6.4.Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

Foi efetuado segundo o protocolo de Amado et al. (2009), os homogeneizados de artêmia foram ajustados para a concentração de 2 mg de proteína mL⁻¹. Os resultados foram expressos como a área relativa das curvas de fluorescência gerada durante o tempo de análise (1 h) pela oxidação de H₂DCF-DA (Sigma-Aldrich) na presença da amostra diluída, quando era adicionada ou não a solução geradora do radical peroxil, 2,2-azobis-2-metilpropionamidina diidrocloreto (ABAP; Sigma-Aldrich). Nesta análise, quanto maior a área relativa obtida, menor a capacidade antioxidante da amostra.

2.6.5.Relações entre nutrientes avaliados

Para avaliar a forma como artêmia utilizou os nutrientes do vitelo em função dos tratamentos, parâmetros para descrever o comportamento dos teores de nutrientes, produtos da oxidação catabólica e equivalentes energéticos dos nutrientes foram estabelecidos com base nos valores médios das variáveis medidas. As variáveis proteína, triglicerídeos e glicose foram transformadas em seus equivalentes energéticos (Eq. 1-3) (Bureau et al., 2003; Jobling, 1983). O conteúdo energético foi calculado a cada ponto de tempo somando a quantidade de energia proveniente de proteínas, lipídios e glicose presentes nos tecidos (Eq. 4).

Equivalente energético da proteína (EEP) = proteína_{tempo t} mg.g⁻¹* 5,65 cal g⁻¹ (Equação 1)

Equivalente energético de triglicerídeos (EET) = triglicerídeos_{tempo t} mg.g⁻¹*9,45 cal g⁻¹
(Equação 2)

Equivalente energético glicose (EEG) = glicose_{tempo t} mg.g⁻¹*4,1 cal g⁻¹ (Equação 3)

Conteúdo energético = EEP + EET + EEG (Equação 4)

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados por uma ANOVA de duas vias para cada tempo considerando o LA e o SA como fatores de variação, após a comprovação dos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), homoscedasticidade (teste de Levene) e independência (teste de Durbin-Watson). Todos os contrastes entre tratamentos foram feitos utilizando o teste pos-hoc de Tukey.

3.Resultados

3.1.Concentração de nitrogênio amoniacal total (TAN)

Para o tempo 6 h foi observado um aumento na concentração de TAN, onde a maior concentração foi apresentada pelo tratamento com 4,0 mM de SA, seguido do tratamento com 8,0 mM de SA. Nos tratamentos com 0 mM de SA a produção de TAN foi maior quando adicionado o LA (Fig. 1, 6 h). Também nas 6 h de exposição, com a adição de 2,0 mM de SA os valores do TAN diminuíram de maneira significativa nos tratamentos com LA. Entretanto os valores de TAN não mudaram de maneira significativa do tratamento com 0 μ M de LA e 0 mM de SA e para o tratamento com 0 μ M de LA e 2,0 mM de SA. Com a adição de 4,0 mM de SA, a quantidade de TAN produzida aumentou acima da apresentada pelos organismos tratados com a mesma concentração de SA e a adição de LA. Este fenômeno pode ser observado também após 6 h, para os organismos tratados com 8,0 mM de SA, sem embargo neste caso o tratamento com 5 μ M de LA para esta concentração de SA apresentou uma produção equiparável à dos organismos somente tratados com SA (Fig. 1, 6 h). Para o tempo de 12 h foi observada uma diminuição da produção de TAN em função à concentração de SA, adicionalmente o SA em combinação com o LA promoveu ainda mais a diminuição da amônia produzida ($p < 0,05$) (Fig. 1, 12 h). Apesar de que no tempo 18 h o efeito do SA sobre a concentração de TAN é similar ao observado no tempo 12 h (Fig. 1, 18 h), o LA não apresentou um efeito aditivo na diminuição deste parâmetro pelo qual os tratamentos com LA não apresentaram diferenças com o tratado com mesma concentração de SA e sem LA. No tempo de 24 h ainda é percebida a diminuição do TAN em função ao SA, no entanto a combinação de 4,0 mM de SA com 0,5 μ M de LA provocou um incremento na concentração de TAN quando comparada ao tratamento que recebeu a mesma concentração de SA sem a adição de LA no meio (Fig. 1, 24h).

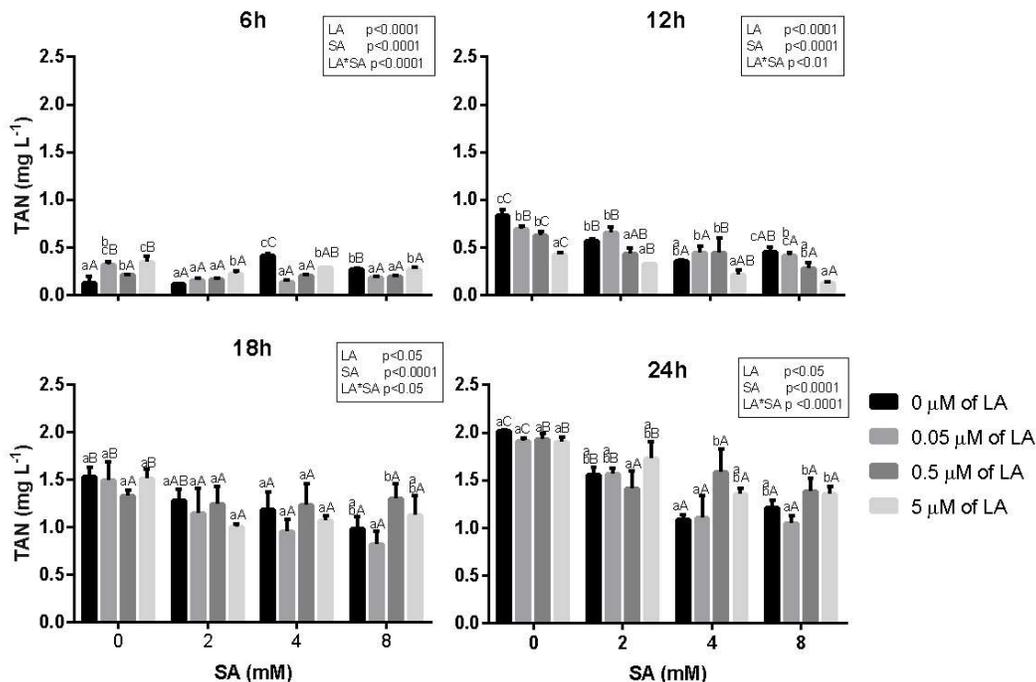


Figura 1. Concentração de total amoniacal nitrogen (TAN) na água para cada hora de coleta. As barras representam a média da concentração de TAN \pm SE (n=3) de cada tratamento. O eixo x apresenta as concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipóico (LA) em μ M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p < 0,05$).

3.2. Conteúdo de proteína total

Após 6 h de exposição foi verificado um aumento da quantidade de proteína nos tratamentos em função da concentração de LA quando o SA não era suplementado. Os tratamentos que só receberam SA não apresentaram diferenças entre eles. Entretanto, a combinação entre LA e SA aumentou ($p < 0.05$) os níveis de proteína em função das concentrações destes dois compostos (Fig. 2, 6 h), embora isto, na concentração de 8,0 mM de SA foi possível observar uma diminuição das concentrações de proteína no tratamento

com 0,05 μM de LA. Já o tratamento com 5,00 μM de LA e 8,0 mM de SA manteve valores similares apresentados pelos grupos com a mesma concentração de LA e as concentrações de 2,0 e 4,0 mM de SA. Para o tratamento com 0,5 μM de LA e 8,0 mM de SA foi observado um incremento nos valores de proteína em relação ao tratamento com 0,5 μM de LA e 4,0 mM de SA. Para o tempo 12 h houve um incremento da proteína tanto pelas concentrações de LA quanto pelas de SA, adicionalmente é possível observar um efeito sinérgico destes dos compostos o qual pode se corroborar com a significância da interação entre o LA e o SA (Fig. 2, 12 h). Já no tempo 18 h na concentração de 8,0 mM de SA foi observado que os tratamentos com 0,50 e 5,00 μM de LA apresentaram valores inferiores aos apresentados pelo tratamento sem LA ($p < 0.05$). Adicionalmente, os valores de proteína dos tratamentos com 0,05 μM de LA aumentaram em função das concentrações de SA até a concentração de 4,0 mM de SA ($p < 0.05$) (Fig 2, 18 h). No tempo 24 h, os valores de proteína se mantiveram crescentes com a concentração de SA, junto com 0,05 μM de LA. No entanto os tratamentos com 5,00 μM de LA e 4,0 mM de SA e com 0,50 e 5,00 μM LA quando combinados com 8 mM de SA foram inferiores a os seus equivalentes de SA sem a adição de LA (Fig 2, 24 h).

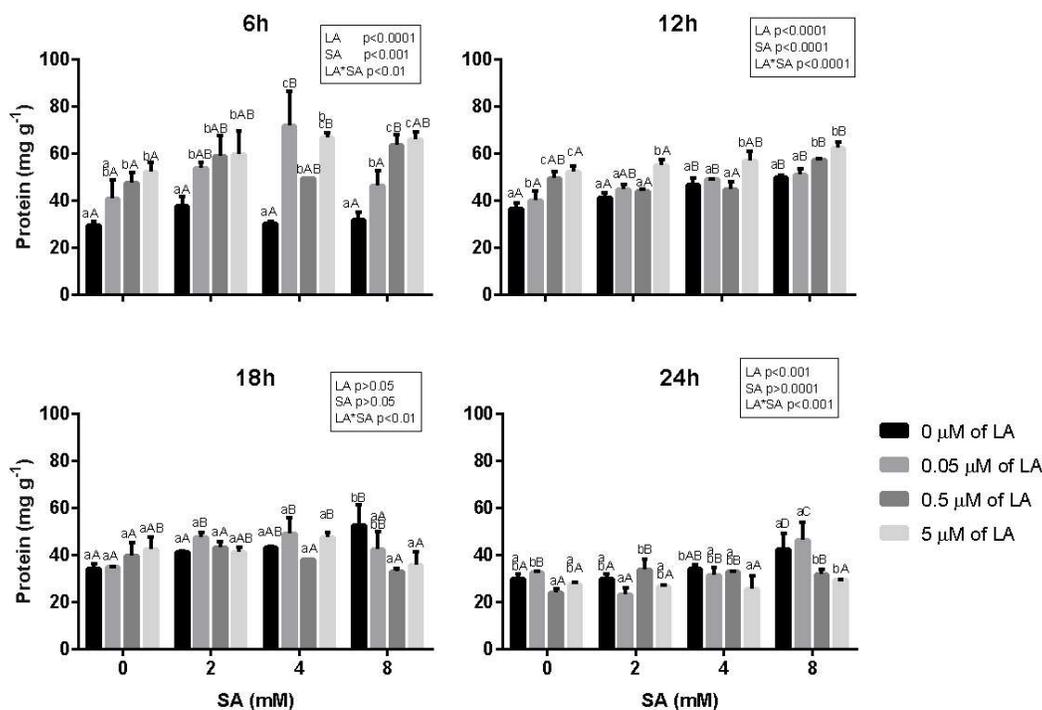


Figura 2. Concentração de proteína em tecidos de *Artemia sp.*. As barras representam os valores médios \pm SE (n=3) de cada tratamento. O eixo x apresenta as concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipóico (LA) em μ M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p<0,05$).

3.3. Conteúdo de triglicerídeos

A concentração de triglicerídeos em função ao SA apresentou no tempo 6 h comportamento crescente similar ao observado para proteína. Na concentração de 4,0 mM de SA foi possível observar diminuição nos teores de triglicerídeos nos tratamentos com 0,05 e 5,00 μ M de LA em relação ao tratamento com 4,0 mM de SA que não recebeu LA. Para a concentração de 8,0 mM de SA foi observada uma diminuição na concentração de triglicerídeos no tratamento com 5,00 μ M de LA, sendo o valor de triglicerídeos baixo encontrado neste tempo (Fig. 3, 6 h). Para o tempo de 12 h, considerando o efeito isolado

do LA, houve aumento na concentração de 0,5 μM , adicionalmente a interação entre LA e SA provocou aumento nas quantidades de triglicerídeos o qual se faz mais expressivo na concentração de 8,0 mM de SA (Fig. 3, 12 h). No tempo 18 h, nenhum dos tratamentos apresentaram um efeito significativo ($p>0.05$; Fig. 3, 18 h). Por fim no tempo 24 h apesar do SA não ter apresentado um efeito significativo ($p>0.05$), é importante salientar que com 0,05 μM de LA os valores de triglicerídeos foram superiores quando adicionado o SA ($p<0.05$; Fig. 3, 24 h).

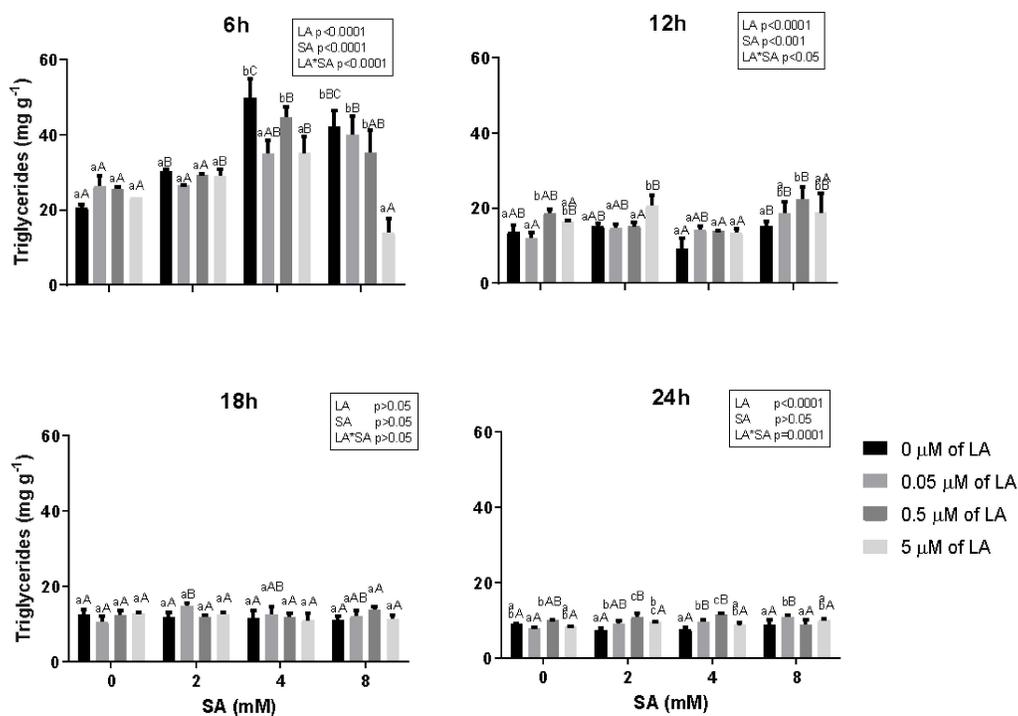


Figura 3. Concentração de triglicerídeos em tecidos de *Artemia* sp. As barras representam os valores médios \pm SE ($n=3$) de cada tratamento. O eixo x apresenta as concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipóico (LA) em μM . Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p<0.05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p<0,05$).

3.4. Conteúdo de glicose

O conteúdo de glicose para o tempo 6 h comportou-se de maneira crescente em função as concentrações de SA e de LA, os quais parecem ter apresentado efeito sinérgico quando administrados em conjunto tendo em conta que nas concentrações com 4,0 e 8,0 μM de SA houve crescimento significativo dos teores de glicose com a adição de 5,00 μM de LA (Fig. 4, 6 h). Para o tempo 12 h não foram encontradas diferenças entre grupos com e sem LA, adicionalmente a o SA não apresentou efeito significativo sobre os valores de glicose (Fig. 4, 12 h). Já no tempo 18 h, enquanto o SA nas concentrações de 2,0 e 4,0 mM pareceu incrementar as concentrações de glicose na ausência de LA, adicionalmente o LA provocou diminuição na concentração deste parâmetro. No entanto, na concentração mais alta de SA foi observado aumento da concentração de glicose no tratamento com 5,00 μM de LA quando comparado com os demais grupos tratados com 5,00 μM de LA e os diferentes níveis de SA (Fig. 4, 18h). No caso do tempo 24 h na concentração com 2,0 mM de SA foi possível observar uma diminuição nas concentrações de glicose nos tratamentos com 0,50 e 5,00 μM de LA, embora este efeito seja revertido no tratamento com 5,00 μM de LA na concentração de com 8 mM de SA (Fig. 4, 24 h).

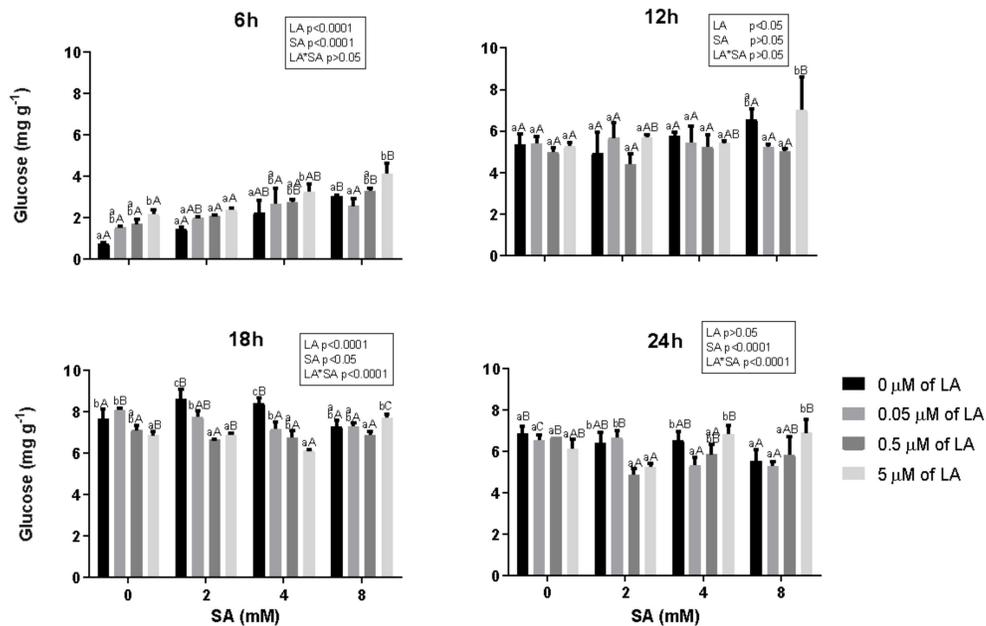


Figura 4. Concentração de glicose em tecidos de *Artemia* sp. As barras representam os valores médios \pm SE (n=3) de cada tratamento. O eixo x apresenta as concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipoico (LA) em μ M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p < 0,05$).

3.5. Capacidade antioxidante (ACAP)

Para o tempo 6 h, o controle e todos os tratamentos com 0 μ M de LA apresentaram os níveis de ACAP mais baixos (alta área relativa) com exceção do tratamento com 2,0 mM de SA e 0,5 μ M de LA que não apresentou diferenças com o tratamento de 2,0 mM de SA, sem a adição de LA (Fig. 5, 6 h). Para o tempo de 12 h, o LA causou diminuição da capacidade antioxidante para diferentes níveis de SA (Figura 5, 12 h) exceto na concentração de 4,0 mM de SA. Em termos gerais a diminuição da ACAP em função ao LA continua para o tempo 18 h com exceção dos tratamentos com 8,0 mM de SA (Fig. 5, 18 h). Finalmente no tempo 24 h é possível observar uma diminuição notória da ACAP

para os organismos tratados com 5,00 μM de LA nas concentrações de 0 e 2 mM de SA. Da mesma forma, na concentração com 8,0 mM de SA foi possível observar uma diminuição do ACAP no tratamento com 0,50 μM de LA (Fig. 5, 24 h).

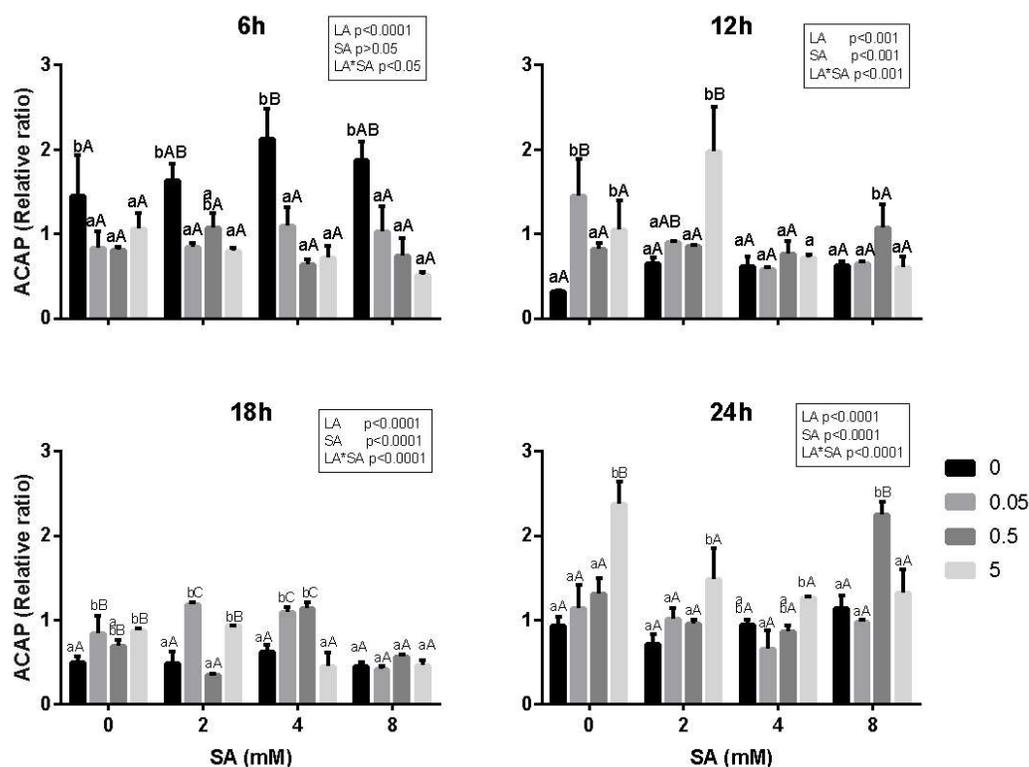


Figura 5. Capacidade antioxidante (ACAP) dos tecidos de *Artemia sp.* As barras representam os valores médios \pm SE (n=3) de cada tratamento. O eixo x apresenta as concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipoico (LA) em μM . Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p < 0,05$).

3.6. Atividade do ETS

No tempo de 6 h, houve aumento da atividade do ETS tanto pelo LA quanto pelo SA de forma dose dependente quando estes compostos foram administrados isoladamente. No entanto quando co-administrados, o LA causou diminuição da atividade do ETS, salvo na

concentração de 0,50 μM de LA que apresentou atividade superior à do tratamento com 0 μM de LA na concentração de 2,0 mM de SA (Fig. 6, 6 h). No tempo de 12 h, o SA sem adição de LA, promoveu a atividade do ETS em concentrações menores que 8,0 mM de SA (Fig. 6, 12 h). A administração isolada de LA também aumentou o ETS. Dentro dos tratamentos com LA e SA, não foram encontradas diferenças quando administrado o SA na concentração de 2,0 mM. No entanto, com 4,0 mM de SA foi possível observar atividades mais baixas do ETS nas concentrações com 0,05 e 0,50 μM de LA quando comparadas com o tratamento sem LA, o qual ao mesmo tempo apresentou valores de ETS inferiores aos do tratamento com 5,00 μM de LA. Finalmente dentro dos tratamentos com 8,0 mM de SA, os valores de atividade do ETS equipararam-se entre os tratamentos com 0 e 0,05 μM de LA sendo estes inferiores aos obtidos pelos tratamentos com 0,5 e 5 μM de LA (Fig. 6, 12h). No tempo 18 h houve diminuição da atividade do ETS em função da concentração de SA, aliás este efeito parece ser parcialmente revertido pelo LA, ao menos até a concentração com 2,0 mM de SA onde não se apresentaram diferenças entre os diferentes níveis de LA com e sem adição do SA (Fig. 6, 18 h). Já no tempo 24 h, a adição de 0,05 μM de LA aumentou a atividade do ETS acima do valor apresentados pelo tratamento com 0 μM de LA e 0 mM de SA (Fig. 6, 24 h). Nos tratamentos com 2,0 e 4,0 mM de SA não houve diferenças entre os níveis de LA, sendo que nos tratamentos com 8,0 mM de SA, a atividade do ETS do tratamento com 0,05 μM de LA voltou apresentar valores superiores aos do tratamento que não recebeu LA (Fig. 6, 24 h).

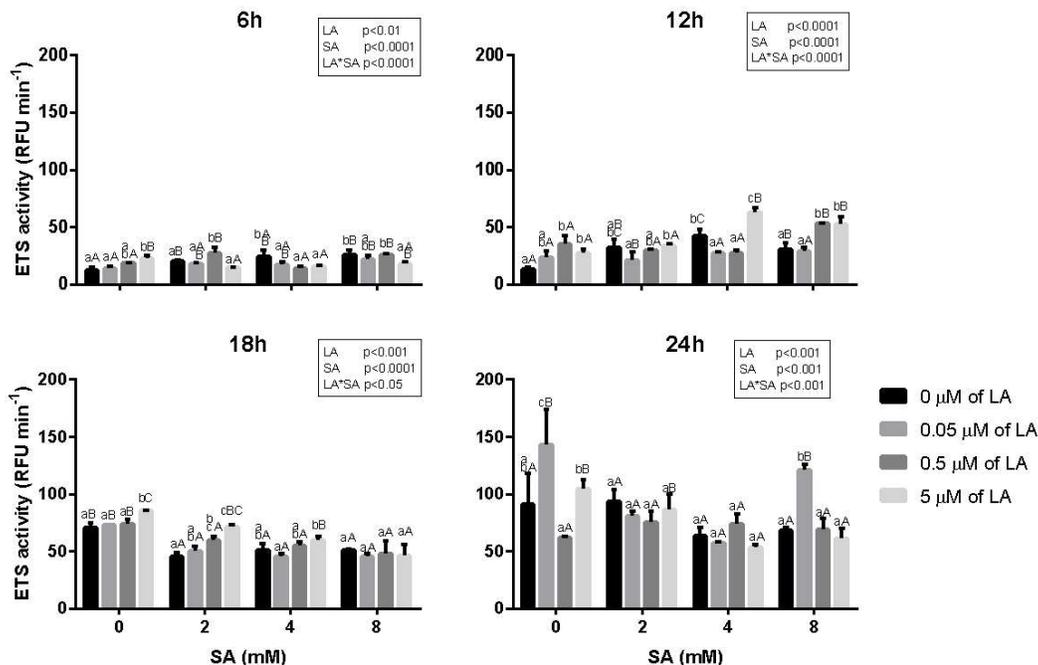


Figura 6. Atividade do electron transport system (ETS) *in vivo* em *Artemia* sp. As barras representam os valores médios \pm SE (n=3) de cada tratamento. O eixo x apresenta as concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipóico (LA) em μ M. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p < 0,05$).

3.7. Produção de ROS

Para o tempo 6 h foi possível observar diminuição na produção de ROS nas concentrações de 0,05 na ausência de SA ($p < 0.05$; Fig. 7, 6 h). O tratamento com 0,5 μ M de LA induziu menores valores de ROS dos que receberam SA nas concentrações de 2 e 4 mM (Fig. 7, 6 h). Para o tempo 12 h a produção de ROS diminuiu em função ao LA e SA em determinadas concentrações, sendo os tratamentos com 0 mM de SA e com 0,5 e 5 μ M de LA os que apresentaram valores de ROS significativamente menores ($p < 0,05$; Fig. 7, 12 h). O mesmo foi observado no tratamento com 2 mM de SA e com 5 μ M de LA (Fig. 7, 12 h). Para o tempo 18 h o LA diminuiu os valores de ROS na ausência de SA ($p < 0.05$; Fig. 7,

18 h). Com 2 mM de SA foi registrado menor valor de ROS quando co-administrado com LA nas três concentrações ($p < 0.05$; Fig. 7, 18 h). Com 4 mM de SA foi registrado menor valor de ROS quando co-administrado com 0,05 μM de LA e com 8 mM de SA a queda de ROS foi observada quando co-administrado com 0,5 μM de LA (Fig. 7, 18 h). Finalmente no tempo 24 h houve efeitos significativos do LA na ausência de SA, apresentando queda na concentração de ROS (Fig. 7, 24 h). Com 2 mM de SA, foi também registrada queda ROS nas concentrações de 0,50 e 5,00 μM de LA. Com 4 mM de SA a queda foi observada quando co-administrado com 0,50 μM de LA e com 8 mM de SA não foram registradas diferenças significativas ($p > 0.05$) na ausência ou na presença de LA (Fig. 7, 24 h).

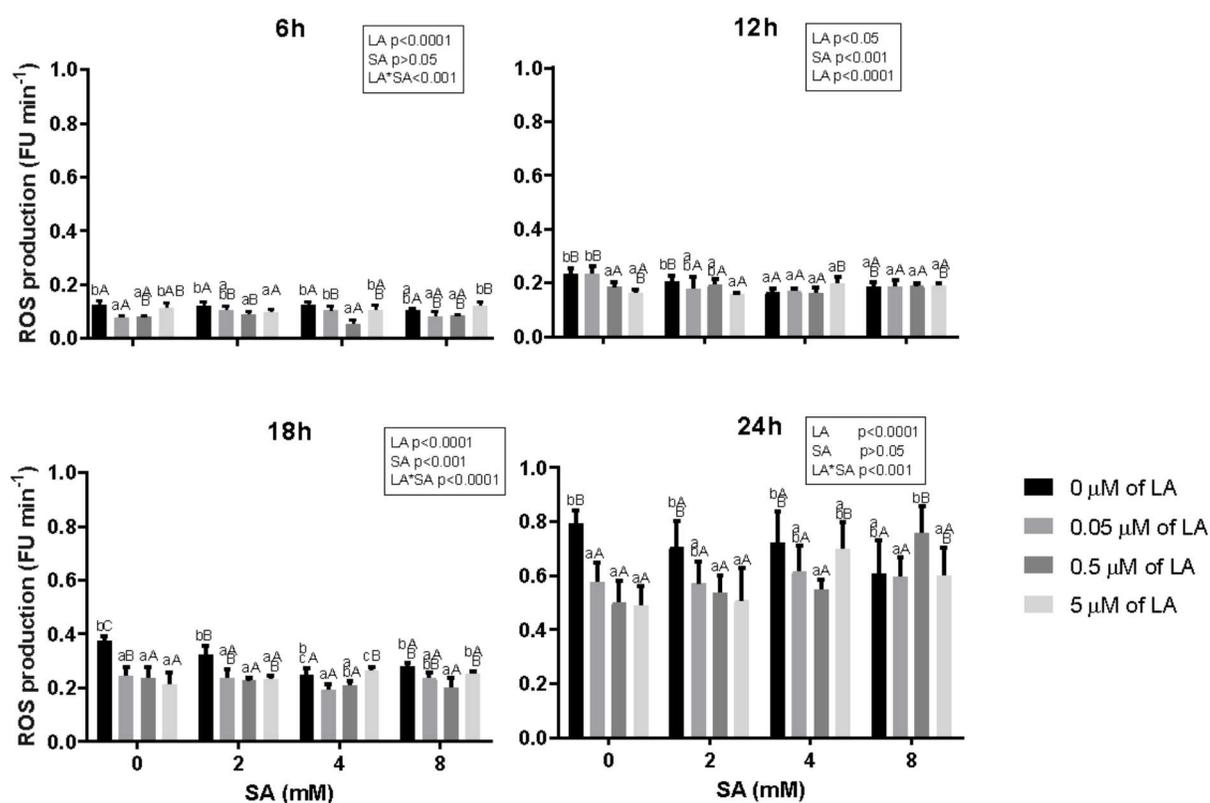


Figura 7. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vivo* em *Artemia* sp. As barras representam os valores médios \pm SE ($n=3$) de cada tratamento. O eixo x apresenta as

concentrações utilizadas de acetato de sódio (SA) em mM e barras de diferente cor representam as concentrações usadas de ácido lipoico (LA) em μM . Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos com LA dentro da mesma concentração de SA e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos com SA dentro da mesma concentração de LA ($p < 0,05$).

3.8. Conteúdo de energia

Em relação ao conteúdo energético, nas amostras de artêmias foi observado que, nas 6 h, os valores de energia foram preservados nos tratamentos administrados com LA e SA de maneira independente ou sob co-administração, contrastando com o tratamento controle, o qual apresentou os menores conteúdos de energia. Os tratamentos suplementados só com LA em geral apresentaram valores de energia inferiores comparado aos tratamentos suplementados só com SA (exceto o tratamento com a concentração de 2 mM de SA) ou com a combinação LA e SA, sendo o tratamento com 0,05 μM de LA e 4 mM de SA o que apresentou os maiores valores de energia estimada. Para o tempo 12 h todos os tratamentos demonstraram valores de energia acima do controle e do tratamento com 0,05 μM de LA, os maiores conteúdos de energia foram observados nos tratamentos com 0,5 μM de LA e 8 mM de SA e com 5 μM de LA e 8 mM de SA. No tempo 18 h o tratamento com o menor conteúdo energético estimado, foi o suplementado com 0,05 μM de LA, seguido dos tratamentos com 5 μM de LA e 8 mM de SA, 0,5 de LA e 8 mM de SA e o controle. Para o tempo 24 h os tratamentos com o menor conteúdo de energia foram os tratados com 0,05 μM de LA e 2 mM de SA, junto com os tratamentos que receberam só LA nas concentrações de 0,5 e 5 μM , todas estas foram inferiores ao tratamento controle. Neste tempo o tratamento com maior conteúdo energético foi a combinação entre 0,05 μM de LA e 8 mM de SA seguido do tratamento com só 8 mM de SA e dos tratamentos com 0,5 μM de LA e 4 mM de SA e 0,5 μM de LA e 2 mM de SA (Fig. 8).

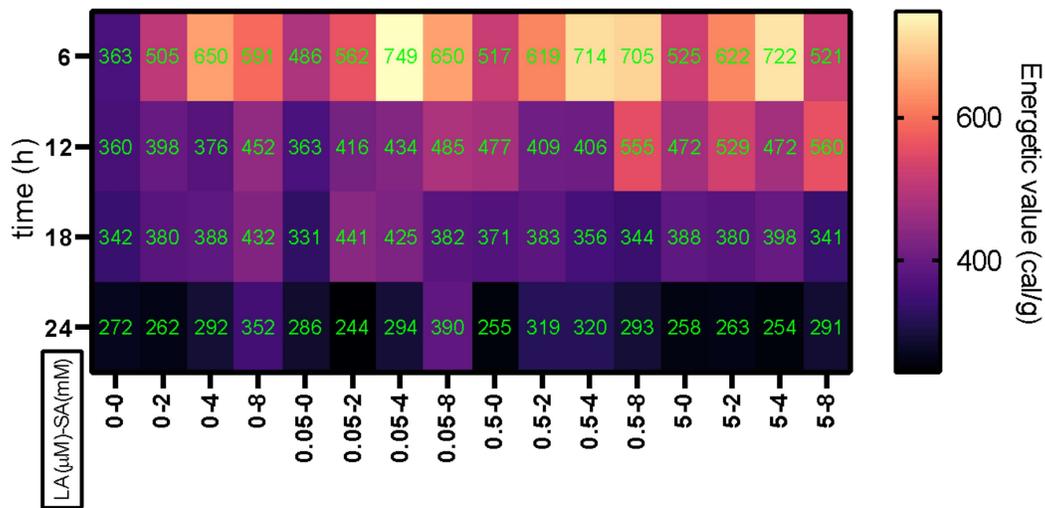


Figura 8. Heatmap do conteúdo calórico estimado a partir das concentrações de proteína, triglicerídeos e glicose. A quantidade calórica para cada tratamento, em cada tempo, foi calculada a partir da soma dos teores médios de proteína, triglicerídeos e glicose em mg g^{-1} de amostra e transformados para calorias, segundo os valores teóricos de $5,65 \text{ cal g}^{-1}$, $9,45 \text{ cal g}^{-1}$ e $4,10 \text{ cal g}^{-1}$ respectivamente.

4. Discussão

As respostas bioquímicas medidas variaram ao longo do tempo experimental e pode-se hipotetizar que fatores como a ontogenia do animal e a disponibilidade de nutrientes vitelinos possam ter sido determinantes neste comportamento. O LA e o SA preservaram os teores de proteína através da regulação negativa da oxidação proteica como sugerem os resultados observados em TAN, pois a amônia é um indicador do catabolismo proteico para a produção de energia. Nas primeiras 6 h, a produção de amônia parece se incrementar com a adição de SA na ausência de LA (Fig 1, 6 h). Tendo em conta que o SA é uma fonte de energia metabolicamente disponível para a artemia (Huggins, 1969), chama a atenção que pelo menos para este tempo o SA não tenha provocado uma diminuição do TAN dissolvido, mas isto pode estar relacionado à maneira como o SA é metabolizado após seu

ingresso no organismo. Para o SA ser utilizado como substrato este primeiro deve passar por um processo de ativação onde adiciona-se neste uma coenzima A, dando como resultado a síntese de uma molécula de acetil-CoA, este processo é catalisado por enzimas acil-CoA sintetases em uma reação ATP dependente (Jaworski et al., 2016). Desta forma é possível assumir a ideia de que o SA pode causar um incremento na demanda energética do organismo induzindo um aumento da oxidação da proteína para gerar o ATP necessário para a produção de acetil-CoA (Smith et al., 2007). Uma evidência que apoia esta ideia, é o incremento da atividade do ETS em função da concentração do SA observada nas 6 h com 2,0 e 8,0 mM de SA na ausência de LA (Fig. 6, 6 h). Ao mesmo tempo foi observado uma regulação negativa pelo LA não só com a diminuição da atividade do ETS (veja nas 6 h a resposta nas concentrações de 4,0 e 8,0 mM de SA na presença de 5 μ M de LA) mas com diminuição na produção de TAN (significativo na concentração de 4,0 mM de SA para todas as concentrações de LA). Uma alternativa para este efeito antagônico seria um desvio metabólico no animal para a utilização de substratos energéticos alternativos à proteína, sobre o que existe evidência que aponta à capacidade do LA em processos mediados pela indução da quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) de promover a utilização de ácidos graxos (Woo et al., 2005) ou da glicose disponível para a síntese de energia (Ding et al., 2022; Packer e Cadenas, 2011; Xiong et al., 2022).

Também deve ser considerado que o LA pode agir nos primeiros momentos à sua administração como depressor metabólico devido à ativa redução que este sofre quando ingressa no animal, isto devido a que a redução deste para ácido diidrolipoico (DLA), depende da oxidação de nucleotídeos reduzidos como NADH e NADPH (Haramaki et al., 1997; Jones et al., 2002). Como o metabolismo energético aeróbio depende destes como carregadores de elétrons e prótons para a formação do gradiente eletroquímico pelo qual é sintetizado o ATP na fosforilação oxidativa (Nolfi-Donagan et al., 2020) é possível assumir

que a diminuição na concentração destes nucleotídeos deveria limitar a atividade de síntese de ATP nos primeiros momentos após administração do LA. Isto também explicaria o fato do SA e LA atuarem de maneira antagônica, um como estimulador da atividade do ETS com o aumento da demanda energética e o outro como repressor desta, reduzindo a atividade do ETS e, em consequência, a oxidação da proteína.

No tempo 12 h é possível observar uma queda na produção de TAN como efeito tanto do LA quanto do SA além de uma sinergia entre estes (Fig. 1, 12 h), indicando claramente uma modificação no perfil metabólico dos animais (Yang et al., 2002). Um possível efeito sinérgico entre estes compostos pode estar apontando à utilização do SA em forma de acetil-CoA como fonte de energia potenciado pelo LA como promotor do metabolismo energético. Esta ideia pode se sustentar tendo em conta a atividade do ETS onde os incrementos deste parâmetro seguem a concentração de SA, sendo principalmente elevado para a combinação de 4 mM de SA e 0,50 μ M de LA nas 12 h de experimento (Fig. 6, 12 h). Um dos principais indícios do uso do acetato como fonte de energia é o incremento do metabolismo aeróbio já que o acetato apresenta um quociente respiratório ($RQ = \text{CO}_2 \text{ eliminado} / \text{O}_2 \text{ consumido}$) bastante baixo (0,4) segundo o trabalho de Romero-Kutzner et al. (2015), e comparado com outros substratos energéticos como a glicose com um RQ de 1, a proteína com um RQ de 0,95 e o lipídio de 0,71 (Wang et al., 2021). Isto implica que o SA pode incrementar consideravelmente o consumo de O_2 e conseqüentemente a atividade do ETS (Romero-Kutzner et al., 2015).

Se bem para os tempos 18 e 24 h não existem grandes mudanças sobre as relações entre SA e LA com TAN, chama a atenção que o comportamento do ETS em função ao SA tenha praticamente se invertido até o ponto do ETS diminuir em função das concentrações de SA. Isto é particularmente visível nas 18 h tanto os organismos apenas expostos ao SA e também naqueles expostos nas diferentes concentrações de SA na presença de 5,00 μ M de

LA (Fig. 6, 18 h). *A priori* poderia estar relacionado ao incremento do acetil-CoA como substrato energético, cujo RQ é superior ao do acetato (Patel et al., 2022). Caso estes resultados indiquem a utilização do SA/Acetil CoA como fonte de energia, não seria inusual os teores dos substratos energéticos avaliados se manterem iguais ou acima dos observados no tratamento com 0 mM de SA e 0 μ M de LA. Uma das implicações deste efeito pode ser observada na produção de ROS dos tratamentos com SA, a qual mostrou taxas inferiores às apresentadas pelo controle. No tempo de 18 h a produção de ROS de todas as concentrações de SA, na ausência de LA, foi inferior à apresentada pelo controle (Fig 7, 18 h). Nas 24 h, na concentração de 8,0 mM de SA, na ausência de LA, também apresentou valores inferiores e significativamente diferentes do controle. No caso do LA, foi possível observar um efeito em geral antioxidante como modulador da produção de ROS, no entanto este ocorreu em dependência do tempo, da concentração de LA e da interação com o SA, assim pode se observar que a partir do tempo 6 h, houve uma diminuição significativa e dose dependente do ROS em função ao LA. Importante ressaltar que para este tempo também apresentou-se um aumento da ACAP dos organismos tratados com o LA, isto poderia estar indicando uma intervenção direta das defesas antioxidantes endógenas na contenção de um possível desafio pró-oxidante, fenômeno que aporta evidência respeito do papel do LA como promotor das defesas antioxidantes nos organismos. Por conseguinte, também é importante mencionar que a ativação e produção de defesas antioxidantes endógenas a partir da suplementação com LA pode estar apontando ao seu papel como pró-oxidante e/ou sinalizador redox (Çakatay, 2006). Em relação com o anterior, é importante ter em conta que se o LA diminuiu significativamente a produção de ROS, também foi possível observar que pelo menos para o tempo 6 h ocorre um incremento dos valores de ROS na concentração de 5 μ M até se equiparar com o tratamento controle, o que de novo coincidiria com a hipótese do efeito pró-oxidante e

estimulador da a síntese de defesas antioxidantes como confirmam os resultados obtidos da ACAP (Fig. 5 6 h). Para as 12 h, a diminuição observada da produção de ROS de maneira dose-dependente ao LA nas concentrações de 0 e 2 mM de SA parece se reverter com o aumento da concentração de SA, sugerindo de novo uma interação antagônica entre estes compostos o qual se bem parcialmente poderia ser atribuído a um aumento da atividade do ETS, isto só é válido para as concentrações com 5 μ M de LA na concentração de 4mM do SA e nas concentrações de 0,5 e 5 μ M de LA junto à concentração de 8 mM de SA. Devido que os outros tratamentos dentro das concentrações de 4 e 8 mM apresentaram atividades do ETS iguais ou menores às do controle (Fig.6 12 h) existe a possibilidade de que a produção de ROS esteja exercendo uma regulação negativa sobre o metabolismo energético (Zhao et al., 2019). Como se de uma transição se tratasse, chama a atenção como os organismos segundo o ACAP passam de um estado mais reduzido no tempo de 6 h para um estado mais pró-oxidante, nos tempos 18 e 24 h, apesar disso enquanto ao ROS continuou-se observando um marcado efeito do LA sobre a produção de ROS, onde no tempo 24 h, embora os organismos apresentem uma diminuição do ACAP em função ao LA, a produção de ROS continua sendo regulada negativamente pelo LA nas concentrações de 0, 2 e 4 mas no caso desta última só até o tratamento com 0,5 μ M de LA. Isto vinculado à diminuição da ACAP poderia apontar o LA estar atuando como promotor das defesas antioxidantes controlando a produção de ROS de maneira indireta e em função à concentração (Petersen Shay et al., 2008).

No que diz respeito dos teores de proteína, foi observado em 6 h que, com a adição de LA, os níveis de proteína tinham se incrementado o que estaria indicando a capacidade do LA de desviar o metabolismo energético para a oxidação substratos alternativos à proteína como a glicose (Moini et al., 2002; Yang et al., 2014). Esta hipótese poderia estar sendo apoiada pelo comportamento da atividade do ETS (Fig. 6, 6 h), onde a adição do LA (5 μ M

de LA) co-administrado com SA (4,0 ou 8,0 mM) provocou uma diminuição deste parâmetro, possivelmente em uma relação antagônica entre o efeito do LA e o efeito gerado pelo SA. Integrando estes resultados com os resultados obtidos para a atividade do ETS é possível pensar que a diminuição da atividade quando integrados o SA e o LA obedece a um desvio do tipo de substrato energético utilizado, onde supondo uma estimulação à utilização da glicose como fonte de energia diante a administração do LA e ao RQ que está possui em comparação ao RQ da proteína, é compreensível uma diminuição da atividade do ETS sendo o catabolismo da glicose menos dependente da atividade da fosforilação oxidativa do que a proteína como observa-se no trabalho de Patel et al. (2022). Já no tempo de 12 h os valores de proteína dos organismos tratados com LA e com SA foram maiores aos observados no tratamento sem a adição destes compostos (Fig. 6 12 h), o que explica novamente os resultados observados para TAN que sugerem uma diminuição nas taxas de oxidação da proteína (Fig 1, 12 h) (Ip e Chew, 2010).

Nos tempos 18 e 24 h, os valores de proteína com LA, na ausência de SA, foram marcadamente semelhantes em relação ao controle (Fig. 2, 18 h e 24 h). No entanto, nas 18 h, os organismos tratados apenas com 8,0 mM de SA apresentaram valores de proteína significativamente superiores ao grupo controle, apontando à possibilidade de o SA estar sendo utilizado como substrato energético gerando um sparing-effect na proteína. No caso da atividade do ETS, apesar desta ter sido regulada negativamente pelo SA nas 18 h, o LA atuou de forma antagônica, deixando em evidência a sua importância como promotor da atividade do ETS e da biogênese mitocondrial como reportado em diferentes estudos (Fernández-Galilea et al., 2015; Packer e Cadenas, 2011; Woo et al., 2005).

É interessante observar a capacidade do LA para preservar os níveis de proteína, mas dentro dos resultados deste trabalho fica o questionamento do porquê nos tempos 18 e 24 h houve diminuição dos teores de proteína em algumas combinações de LA e SA, sendo as

combinações de LA com 8 mM de SA as que apresentaram uma queda na concentração da proteína dependente da dose do LA. Uma explicação seria que a intensa atividade do ETS nos tempos de 6 e 12 h tenha provocado esta situação, já que algumas evidências contemplam em determinados casos a possibilidade de um aumento da oxidação da proteína por efeito do LA. Terjesen et al. (2004) encontrou em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), após 8 semanas de suplementação com LA, uma clara diminuição da relação arginina/ornitina assim como da relação aminoácidos livres/ornitina o que sugere um aumento do catabolismo da proteína. Esta evidência poderia ser considerada para explicar o observado por Park et al. (2006), onde animais suplementados na dieta com LA apresentaram uma baixa eficiência proteica. Nestes dois trabalhos citados acima é importante mencionar que as dietas fornecidas foram as mesmas onde os teores de proteína (aprox. 50%) foram maiores ao que atualmente é recomendado para a espécie pacu (aprox. 26% de proteína bruta) (Abimorad e Carneiro, 2007; De Almeida Bicudo et al., 2009), fazendo que a proteína fosse o substrato energético mais abundante dentro da dieta. Nos baseando nestes resultados e no fato do teor de triglicerídeos ter diminuído em mais de um 50% ao apresentado para o tempo 6 h, é possível pensar que a proteína possa ter sido o substrato energético mais abundante nesse tempo acabou sendo oxidada.

Considerando as respostas dos triglicerídeos, é possível observar que para o tempo de 6 h existem diferenças entre o conteúdo de triglicerídeos dos tratamentos apenas com SA dos que foram co-administrados com LA, os quais apresentam valores inferiores (Fig. 3, 6 h). Este efeito pode se interpretar como uma possível ativação das vias relacionadas com a geração de energia a partir da indução da β -oxidação pelo LA, o que tem sido reportado para várias espécies animais incluindo organismos aquáticos (Chen et al., 2019; Huang et al., 2020; Shi et al., 2018). Adicionalmente existem evidências que apontam à possível capacidade do SA de limitar a hidrólise de lipídios e promover a síntese de ácidos graxos

(Gao et al., 2016; Moffett et al., 2020; Shi e Tu, 2015). Em adipócitos maduros de camundongo da linhagem 3T3-L1 usando um agonista da fosforilação da lipase hormônio-sensível (isoproterenol) foi possível observar um aumento significativo dos níveis de ácidos graxos livres não esterificados (NEFA), mas quando adicionava-se SA no meio de cultura ocorria uma diminuição significativa dos níveis dos NEFAs e de glicerol livre (Aberdein et al., 2014). Este efeito também foi observado em zebrafish (*Danio rerio*), onde a suplementação com 0,15% de SA na dieta aumentou o ganho de energia e de lipídios, acarretando um aumento da eficiência de conversão de energia (Zhang et al., 2020). Da mesma forma também tem sido comprovada a incorporação do acetato em lipídios e fosfolipídios em carpas adaptadas a diferentes temperaturas (5 e 22 °C), sendo verificado que na temperatura mais baixa permitiu uma intensa incorporação do acetato (¹⁴C) em ácidos graxos de cadeia longa em lipídios e fosfolipídios de maneira indistinta (Farkas e Csenger, 1976). As situações anteriores estariam apontando à capacidade tempo-dependente do SA de inibir a utilização dos lipídios como fonte de energia e, ainda, de ingressar como substrato dentro das vias de síntese. O trabalho de Smith et al. (2007), que aparte de ter demonstrado em humanos, em concordância com este trabalho, que o SA aumenta o gasto energético, confirma que este gasto pode ser rapidamente suprido pela oxidação do SA (possivelmente já transformado em acetil CoA) como fonte de energia. Desta maneira o trabalho de Akanji et al. (1989) calcula que esta substituição pode chegar até 40% do gasto energético após o tratamento com SA em humanos, o qual ocorre como já foi mencionado em paralelo à diminuição dos teores plasmáticos de glicerol e de NEFA.

A partir do tempo 12 h os valores de triglicerídeos dos tratamentos com SA e LA incrementam-se em comparação aos tratados só com SA, este fenômeno se faz especialmente notável no tempo de 24 h (Fig. 3 24 h) onde os valores de triglicerídeos nos tratamentos com SA e LA nas concentrações de 0,05 e 0,5 µM de LA possuem valores

acima dos encontrados nos tratamentos sem LA nas concentrações de 2 e 4 mM de SA. Aliás, os tratamentos com LA e sem a adição de SA não apresentam diferenças com o tratamento controle (Fig. 3 24 h). Supondo a utilização do SA como fonte de energia e a derivação metabólica para o catabolismo da glicose, é possível pensar que a integração destes compostos levou a uma preservação dos níveis de triglicérides o qual poderia apresentar de manifesto uma justificativa para a utilização integrada destes compostos na artêmia como estratégia para a preservação da sua qualidade nutricional, mas também em outras espécies caso os efeitos observados aqui sejam extrapoláveis. O LA por si só já apresenta a capacidade de aumentar a eficiência energética do animal como foi observado no trabalho de Zhang et al. (2020), ao tempo que trabalhos como o de Ding et al. (2022) demonstram como o LA promove a atividade de proteínas relacionadas com o catabolismo da glicose no camarão *Macrobrachium nipponense*. Desta maneira os resultados observados seriam só um reflexo da substituição do lipídio como fonte de energia a partir do SA e a glicose juntas.

No referente aos conteúdos de glicose, foi possível observar um crescimento nos teores desta durante o experimento ou pelo menos até o tempo 18 h, o que provavelmente possa se dever à geração de glicose a partir da trehalose (Crowe, 2008; Huggins e Boulton, 1970; Smith et al., 2013), a qual é estocada durante a criptobiose da artêmia para a proteção das proteínas de possíveis danos gerados pela dessecação (Viner e Clegg, 2001). No entanto com o início do metabolismo em função a reidratação dos cistos (entre outras condições ambientais), a trehalose começa a ser intensamente hidrolisada para a glicose a qual acaba derivando ao metabolismo energéticos como substrato (Crowe, 2008; Hand e Gnaiger, 1988).

Foi possível observar mudanças importantes nos teores de glicose em função ao LA, onde no tempo 18 h houve clara diminuição que se deu de maneira dose-dependente ao LA, este

efeito é ainda mais notável quando se considera que as concentrações de glicose nos tratamentos de 2 e 4 mM de SA sem a adição de LA apresentam concentrações de glicose acima das apresentadas pelo tratamento sem adição de SA e LA (Fig. 4, 18 h). O efeito do LA sobre a diminuição dos teores de glicose também foi observado no tempo 24 h; onde simultaneamente também foi observada uma diminuição dos teores de glicose em função ao SA (Fig. 4 24 h), no entanto, dentro da interação entre o LA e o SA ocorreu que embora na menor concentração de SA tenha-se apresentado uma diminuição dos teores de glicose em função à concentração de LA, conforme a concentração de SA aumenta os tratamentos com LA começam a apresentar incrementos da concentração de glicose, que descrevem um comportamento bifásico em função ao SA. Neste caso o catabolismo do SA poderia estar-se sobrepondo à utilização da glicose e função à concentração de LA. Isto poderia ser catalogado como um efeito sinérgico da co-administração LA e SA, no intuito de preservar o conteúdo energético do animal. Apesar das observações feitas sobre a diminuição do conteúdo de glicose nos grupos tratados com LA e SA nos tempos 18 e 24 h, os níveis de atividade do ETS foram inferiores aos observados nos tratamentos que não receberam SA (Fig. 6, 18 h e 24 h). Uma explicação plausível para a diminuição do ETS junto com a diminuição das concentrações de glicose pode ser o alto RQ da glicose. Em função a isto, a produção de CO₂ por unidade de oxigênio consumido faz da glicose um substrato mais eficiente do que a proteína, a qual precisaria de maior quantidade de oxigênio para sua descarboxilação, o qual condiz com os dados apresentados sobre os teores de proteína e a produção de TAN nos grupos não tratados com SA. Assim, a atividade do ETS pode ser um reflexo de uma maior utilização de proteína como fonte de energia em ausência do aporte energético do SA (acetil-CoA). Se bem o RQ é principalmente aplicado para animais terrestres, é possível encontrar experiências dentro da literatura científica enfocada na aquicultura (Wang et al., 2021) que demonstram a possibilidade de utilizar este

argumento no contexto da nutrição de precisão. Em juvenis *Clarias gariepinus* suplementados com carnitina foi possível observar o aumento do catabolismo de lipídios de maneira dose-dependente, estes dados que foram corroborados a partir da diminuição dos teores de lipídio na carcaça e no aumento plasmático das concentrações de NEFAs, em consequência estes efeitos tiveram uma alta correlação com a diminuição do RQ e de TAN em função às concentrações de carnitina (Ozório et al., 2001).

Observando o conteúdo energético total estimado da artêmia, os grupos tratados exclusivamente com SA achou-se conteúdos finais de energia maiores aos do controle e em função à concentração de SA. Este comportamento se mantém quando adicionado o LA, no entanto os valores energéticos tendem a diminuir com o aumento das concentrações de LA, sendo as concentrações com 5 μM de LA as que apresentaram os conteúdos mais baixos de energia, sendo isto possivelmente um reflexo da regulação positiva do LA sobre o catabolismo e gasto energético (Fernández-Galilea et al., 2015) (Figura 8). Apesar disso, o tratamento que obteve o maior conteúdo de energia foi precisamente a combinação entre a menor concentração de LA testada, 0,05 μM quando co-administrada com a maior concentração de SA, 8 mM (Fig. 8). Este possível efeito sinérgico pode estar se relacionando a um efeito protetivo do LA como antioxidante contra uma excessiva produção de ROS derivado do metabolismo no catabólico (Mailloux et al., 2013), que por sua vez permitiu um uso mais eficiente dos aportes energéticos provenientes do SA (Smith et al., 2016). Estes resultados são comparáveis aos encontrados em frangos de corte (Arshad et al., 2013) nos que o LA suplementado na dieta dos animais prejudicou significativamente o crescimento em comparação com o resto de tratamentos, no entanto quando o LA foi suplementado junto com óleo de germe de trigo houve um incremento significativo no crescimento dos frangos, acima tanto dos animais tratados tanto com LA quanto dos animais do grupo controle não suplementado. Neste caso é possível pensar que

a suplementação de uma fonte adicional de energia pode compensar o gasto energético adicional que representa a administração de LA na dieta (Wang et al., 2010).

Respeito à capacidade antioxidante contra peroxi-radicaís (ACAP), para o tempo de 6 h houve uma promoção do sistema antioxidante nos animais tratados com LA tanto nos tratamentos com e sem SA. Paradoxalmente dentro dos tempos posteriores foi observada uma diminuição progressiva do ACAP, onde a partir do tempo 12 h os organismos tratados com 0,05 e 5 μM de LA sem a adição de SA apresentam uma ACAP inferior à encontrada no controle. Quando adicionado o SA na concentração de 2 mM o ACAP dos animais tratados com LA aumenta, no entanto a maior concentração de LA provocou um estado mais pró-oxidante em relação ao observado nos organismos tratados com esta mesma concentração, mas sem a adição de SA. Nas concentrações posteriores de SA os possíveis efeitos pró-oxidantes do LA foram revertidos até o ponto de não apresentar diferenças com o tratamento que recebeu a mesma concentração de SA sem a adição de LA ao meio, isto com a exceção do tratamento com 0,5 μM de LA e 8 mM de SA que apresentou valores de ACAP inferiores aos de seu equivalente de SA não tratado com LA (Fig. 5 12 h). No tempo 18 h salvo o tratamento com 2 mM de SA e 0,5 μM de LA, as diferenças estatísticas encontradas apontam a um efeito pró-oxidante do LA, o qual acaba se acentuando no tempo 24 h onde pelo menos para os tratamentos com 0 e 2 de SA o ACAP diminui em função à concentração de LA, esse efeito parece se reverter nas concentrações de 4 e 8 mM com a exceção do tratamento com 0,5 μM de LA e 8 mM de SA. Essa reversão pode estar indicando uma possível capacidade do SA em promover o sistema antioxidante dos animais, porém, dada a ausência de diferenças entre os tratamentos que receberam apenas SA e o controle, esse efeito parece ser resultado da interação entre LA e SA . Contrastando esses resultados com os obtidos na produção de ROS, curiosamente, a resposta dose-dependente de LA e a diminuição de ACAP no tempo de 24 h nos tratamentos com 0

e 2 mM de SA foi acompanhada por uma diminuição na produção de ROS nos tratamentos com LA o que pode ser reflexo da contenção de ROS em detrimento do sistema antioxidante ou da diminuição da síntese de defesas antioxidantes devido à diminuição do feedback positivo gerado pelas concentrações de ROS. Da mesma forma, vale ressaltar que no tempo de 24 h, o tratamento com 0,5 μ M de LA e 8 mM de SA, tendo apresentado valores de ACAP inferiores aos apresentados pelos demais grupos tratados com LA, também apresentou os maiores níveis de ROS, fornecendo evidências da interligação desses parâmetros.

Alguns trabalhos apontam à ação das ROS como sinalizadores para a síntese de defesas antioxidantes e existem vários possíveis mecanismos pelos que isto pode acontecer. É o caso do efeito da sinalização do hormônio de crescimento (GH) que quando ligado a seu respectivo receptor de membrana promove a produção de ROS (H_2O_2) ao tempo que indiretamente é capaz de ativar vias para a síntese de defesas antioxidantes (Cho et al., 2009; Kwon et al., 2004; Ray et al., 2012). Tendo em vista a queda dos teores de ROS como efeito à exposição ao LA, é possível pensar na diminuição ponderada da ACAP como mecanismo de compensação, algo que por sua vez acaba sendo energeticamente desejável.

Segundo a literatura disponível, em aquicultura a suplementação com altas concentrações de LA pode ir em detrimento da estocagem de lipídio e do peso final dos animais (Chen et al., 2019; Huang et al., 2020; Kütter et al., 2012; Terjesen et al., 2004). Isto foi corroborado por este trabalho, no entanto o SA demonstrou a capacidade para preservar os níveis de substratos energéticos, atuando provavelmente como um substrato energético mesmo, o qual que em determinadas concentrações pode agir sinergicamente com o LA para a preservação de nutrientes envolvendo possivelmente a regulação do metabolismo energético e sistema antioxidante.

Referências

Aberdein, N., Schweizer, M., Ball, D., 2014. Sodium acetate decreases phosphorylation of hormone sensitive lipase in isoproterenol-stimulated 3T3-L1 mature adipocytes. <https://doi.org/10.4161/adip.27936> 3, 121–125. doi:10.4161/ADIP.27936

Abimorad, E.G., Carneiro, D.J., 2007. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles — fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Nutrition* 13, 1–9. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00438.x>

Akanji, A.O., Bruce, M.A., Frayn, K.N., 1989. Effect of acetate infusion on energy expenditure and substrate oxidation rates in non-diabetic and diabetic subjects. *European journal of clinical nutrition* 43, 107–115.

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of The Total Environment* 407, 2115–2123. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2008.11.038

Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 54, 172–178. doi:10.1016/J.FSI.2016.04.011

Chen, L., Qin, J.G., Du, Z., Wang, X., Limbu, S.M., Lu, M., Xiao, S., Xu, C., Xu, F., 2019. Effects of α lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant profile and lipid metabolism of the GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed high-fat diets.

Aquaculture Nutrition. doi:10.1111/anu.12881

Çakatay, U., 2006. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. Medical Hypotheses 66, 110–117. doi: 10.1016/j.mehy.2005.07.020

Cho, D., Mier, J.W., Atkins, M.B., 2009. PI3K/Akt/mTOR Pathway: A growth and proliferation pathway, in: Bukowski, R.M., Figlin, R.A., Motzer, R.J. (Eds.), Renal Cell Carcinoma: Molecular Targets and Clinical Applications. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 267–285. doi:10.1007/978-1-59745-332-5_15

Crowe, J.H., 2008. Trehalose and anhydrobiosis: the early work of J. S. Clegg. Journal of Experimental Biology 211, 2899–2900. doi:10.1242/jeb.012476

De Almeida Bicudo, Á.J., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P., 2009. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. Aquaculture Research 40, 486–495. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02120.x

Ding, Z., Xiong, Y., Zheng, J., Zhou, D., Kong, Y., Qi, C., Liu, Y., Ye, J., Limbu, S.M., 2022. Modulation of growth, antioxidant status, hepatopancreas morphology, and carbohydrate metabolism mediated by alpha-lipoic acid in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium nipponense* under two dietary carbohydrate levels. Aquaculture 546, 737314. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737314

Encarnação, P., 2016. Functional feed additives in aquaculture feeds. Aquafeed Formulation 217–237. doi:10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1

Farkas, T., Csenger, I., 1976. Biosynthesis of fatty acids by the carp, *Cyprinus carpio* L., in relation to environmental temperature. Lipids 11, 401–407. doi:https://doi.org/10.1007/BF02532847

Farkas, T., Kariko, K., Csengeri, I., 1981. Incorporation of [1-14C] acetate into fatty acids

of the crustaceans *Daphnia magna* and *Cyclops strenus* in relation to temperature. *Lipids* 16, 418–422. doi:10.1007/BF02535008

Fernández-Galilea, M., Pérez-Matute, P., Prieto-Hontoria, P.L., Houssier, M., Burrell, M.A., Langin, D., Martínez, J.A., Moreno-Aliaga, M.J., 2015. α -Lipoic acid treatment increases mitochondrial biogenesis and promotes beige adipose features in subcutaneous adipocytes from overweight/obese subjects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1851, 273–281. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.013

Fiore, E., Perillo, L., Piccione, G., Giancesella, M., Bedin, S., Armato, L., Giudice, E., Morgante, M., 2016. Effect of combined acetylmethionine, cyanocobalamin and α -lipoic acid on hepatic metabolism in high-yielding dairy cow. *Journal of Dairy Research* 83, 438–441. doi:10.1017/S0022029916000509

Francis, S., Delgoda, R., Young, R., 2012. Effects of embryonic exposure to α -lipoic acid or ascorbic acid on hatching rate and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Research* 43, 777-788. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02889.x

Fuchs, V.I., Schmidt, J., Slater, M.J., Zentek, J., Buck, B.H., Steinhagen, D., 2015. The effect of supplementation with polysaccharides, nucleotides, acidifiers and *Bacillus* strains in fish meal and soy bean based diets on growth performance in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 437, 243–251. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2014.12.007

Gao, X., Lin, S.-H., Ren, F., Li, J.-T., Chen, J.-J., Yao, C.-B., Yang, H.-B., Jiang, S.-X., Yan, G.-Q., Wang, D., Wang, Y., Liu, Y., Cai, Z., Xu, Y.-Y., Chen, J., Yu, W., Yang, P.-Y., Lei, Q.-Y., 2016. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nature Communications* 7, 11960. doi:10.1038/ncomms11960

Gorąca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B., 2011. Lipoic acid - Biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. doi:10.1016/S1734-1140(11)70600-4

Hand, S.C., Gnaiger, E., 1988. Anaerobic dormancy quantified in artemia embryos: a calorimetric test of the control mechanism. *Science* 239, 1425–1427. doi:10.1126/science.239.4846.1425

Haramaki, N., Han, D., Handelman, G.J., Tritschler, H.J., Packer, L., 1997. Cytosolic and mitochondrial systems for nadh- and nadph-dependent reduction of α -lipoic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 535–542. doi:10.1016/S0891-5849(96)00400-5

Helder, W., De Vries, R.T.P., 1979. An automatic phenol-hypochlorite method for the determination of ammonia in sea- and brackish waters. *Netherlands Journal of Sea Research* 13, 154–160. doi:https://doi.org/10.1016/0077-7579(79)90038-3

Hiltunen, J.K., Autio, K.J., Schonauer, M.S., Kursu, V.A.S., Dieckmann, C.L., Kastaniotis, A.J., 2010. Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. doi:10.1016/j.bbabi.2010.03.006

Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A., Zhou, Z., 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 9, 2429. doi:10.3389/FMICB.2018.02429/BIBTEX

Huang, C. cui, Sun, J., Ji, H., Kaneko, G., Xie, X. da, Chang, Z. guang, Deng, W., 2020. Systemic effect of dietary lipid levels and α -lipoic acid supplementation on nutritional metabolism in zebrafish (*Danio rerio*): focusing on the transcriptional level. *Fish Physiology and Biochemistry* 46, 1631–1644. doi:10.1007/S10695-020-00795-8/FIGURES/5

- Huang, C., Sun, J., Ji, H., Kaneko, G., Xie, X., Chang, Z., Deng, W., 2020. Systemic effect of dietary lipid levels and α -lipoic acid supplementation on nutritional metabolism in zebrafish (*Danio rerio*): focusing on the transcriptional level. *Fish Physiology and Biochemistry* 2020 46:5 46, 1631–1644. doi:10.1007/S10695-020-00795-8
- Huggins, A.K., Boulton, A.P., 1970. The metabolism of trehalose during morphogenesis of the brine shrimp *Artemia salina*. *Biochemical Journal* 117, 42P-42P. doi:10.1042/BJ1170042PA
- Ide, T., 2018. Physiological activities of the combination of fish oil and α -lipoic acid affecting hepatic lipogenesis and parameters related to oxidative stress in rats. *European Journal of Nutrition* 57, 1545–1561. doi:10.1007/s00394-017-1440-0
- Jaworski, D.M., Namboodiri, A.M.A., Moffett, J.R., 2016. Acetate as a metabolic and epigenetic modifier of cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 117, 574–588. doi:10.1002/JCB.25305
- Jocelyn, P.C., 1967. The standard redox potential of cysteine-cystine from the thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid. *European Journal of Biochemistry* 2, 327–331. doi:10.1111/J.1432-1033.1967.TB00142.X
- Jones, W., Li, X., Qu, Z. chao, Perriott, L., Whitesell, R.R., May, J.M., 2002. Uptake, recycling, and antioxidant actions of α -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 83–93. doi:10.1016/S0891-5849(02)00862-6
- Kütter, M. T., Monserrat, J.M., Primel, E.G., Caldas, S.S., Tesser, M.B., 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture* 368–369, 29–35. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2012.09.010

- Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., Rhee, S.G., 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 16419–16424. doi:10.1073/pnas.0407396101
- León, C. M., Wasiliesky Junior, W., Monserrat, J.M., 2018. Quercetin influence in water quality and biochemical responses of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in Biofloc Technology System. *Aquaculture Research* 49, 3569–3576. doi:10.1111/ARE.13823
- Liu, H.X., Zhou, X.Q., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Zeng, Y.Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Feng, L., 2018. Optimal α -lipoic acid strengthen immunity of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by enhancing immune function of head kidney, spleen and skin. *Fish & Shellfish Immunology* 80, 600–617. doi:10.1016/J.FSI.2018.06.057
- Malloy, C.R., Jones, J.G., Jeffrey, F.M., Jessen, M.E., Sherry, A.D., 1996. Contribution of various substrates to total citric acid cycle flux and Janaplerosis as determined by ¹³C isotopomer analysis and O₂ consumption in the heart. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 4, 35–46. doi:10.1007/BF01759778
- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., Shiva, S., 2020. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox biology* 37, 101674. doi:10.1016/j.redox.2020.101674
- Ozório, R.O.A., Van Eekeren, T.H.B., Huisman, E.A., Verreth, J.A.J., 2001. Effects of dietary carnitine and protein energy:nonprotein energy ratios on growth, ammonia excretion and respiratory quotient in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) juveniles. *Aquaculture Research* 32, 406–414. doi:https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00031.x

Packer, L., Cadenas, E., 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr* 48, 26–32. doi:10.3164/jcbn.111005FR

Park, K.H., Terjesen, B.F., Tesser, M.B., Portella, M.C., Dabrowski, K., 2006. α -Lipoic acid-enrichment partially reverses tissue ascorbic acid depletion in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed vitamin C-devoid diets. *Fish Physiology and Biochemistry* 329–338. doi:10.1007/s10695-006-9110-9

Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24, 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008

Reid, R.M., D'Aquila, A.L., Biga, P.R., 2018. The validation of a sensitive, non-toxic in vivo metabolic assay applicable across zebrafish life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 208, 29–37. doi:10.1016/J.CBPC.2017.11.004

Rodrigues, R.V., Maltez, L.C., Ferreira, C.C., Oliveira, T.P.A.P., Sampaio, L.A., Monserrat, J.M., 2021. ROS in vivo determination and antioxidant responses in rotifers *Brachionus plicatilis* fed with commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* or microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture International* 29, 1657–1667. doi:10.1007/S10499-021-00707-4/TABLES/2

Romano, N., Koh, C.B., Ng, W.K., 2015. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 435, 228–236. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2014.09.037

Romero-Kutzner, V., Packard, T.T., Berdalet, E., Roy, S.O., Gagné, J.-P., Gómez, M., 2015. Respiration quotient variability: bacterial evidence. *Marine Ecology Progress Series* 519, 47–59.

Sánchez Rojas, F., Cano Pavón, J.M., 2005. Spectrophotometry | Biochemical applications, *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition*. Elsevier. doi:10.1016/B0-12-369397-7/00722-6

Santos, R.A., Caldas, S., Primel, E.G., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2016. Effects of lipoic acid on growth and biochemical responses of common carp fed with carbohydrate diets. *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 1699–1707. doi:10.1007/S10695-016-0250-2/FIGURES/1

Schiller Vestergren, A.L., Trattner, S., Mráz, J., Ruyter, B., Pickova, J., 2011. Fatty acids and gene expression responses to bioactive compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes. *Neuroendocrinology Letters* 32, 41–50.

Shi, X., Jin, A., Sun, J., Tian, J., Ji, H., Chen, L., Du, Z., 2018. The protein-sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*: effects on lipolysis, fatty acid β -oxidation and protein synthesis. *British Journal of Nutrition* 120, 977–987. doi:10.1017/S000711451800226X

Silva, B.C., Nolasco-Soria, H., Magallón-Barajas, F., Civera-Cerecedo, R., Casillas-Hernández, R., Seiffert, W., 2016. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. *Aquaculture Nutrition* 22, 997–1005. doi:https://doi.org/10.1111/anu.12315

Smith, G.I., Jeukendrup, A.E., Ball, D., 2013. The effect of sodium acetate ingestion on the metabolic response to prolonged moderate-intensity exercise in humans. *International*

Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism 23, 357–368.
doi:10.1123/ijsnem.23.4.357

Smith, G.I., Jeukendrup, A.E., Ball, D., 2007. Sodium Acetate Induces a Metabolic Alkalosis but Not the Increase in Fatty Acid Oxidation Observed Following Bicarbonate Ingestion in Humans. *The Journal of Nutrition* 137, 1750–1756. doi:10.1093/jn/137.7.1750

Sohaib, M., Anjum, F.M., Nasir, M., Saeed, F., Arshad, M.S., Hussain, S., 2018. Alpha-lipoic acid: An inimitable feed supplement for poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. doi:10.1111/jpn.12693

Sukor, S.A., Taher, S., Ehteshami, F., Arshad, A., Ng, W.-K., Romano, N., 2016. Effects of different dietary organic acids on the survival, growth, and hepatopancreatic histopathology of the blue swimmer crab *portunus pelagicus*. *Journal of Shellfish Research* 35, 555–561. doi:10.2983/035.035.0228

Terjesen, B.F., Park, K., Tesser, M.B., Portella, M.C., Zhang, Y., Dabrowski, K., 2004. Biochemical and molecular actions of nutrients lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free amino acids selectively in the teleost fish pacu (*piaractus mesopotamicus*). 1 2930–2934.

Viner, R.I., Clegg, J.S., 2001. Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/-crystallin protein, *Cell Stress & Chaperones*. Cell Stress Society International.

Wang, S., Carter, C.G., Fitzgibbon, Q.P., Smith, G.G., 2021. Respiratory quotient and the stoichiometric approach to investigating metabolic energy substrate use in aquatic ectotherms. *Reviews in Aquaculture* 13, 1255–1284. doi:10.1111/RAQ.12522

Woo, J.L., Song, K.H., Eun, H.K., Jong, C.W., Hyoun, S.K., Park, H.S., Kim, M.S., Kim,

S.W., Lee, K.U., Park, J.Y., 2005. α -Lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332, 885–891. doi:10.1016/J.BBRC.2005.05.035

Xiong, Y., Li, Q., Ding, Z., Zheng, J., Zhou, D., Wei, S., Han, X., Cheng, X., Li, X., Xue, Y., 2022. Dietary α -lipoic acid requirement and its effects on antioxidant status, carbohydrate metabolism, and intestinal microflora in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture* 547, 737531. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737531

Xu, N., Fu, J., Wang, H., Lu, L., 2021. Quercetin counteracts the pro-viral effect of heat shock response in grass carp cells with its therapeutic potential against aquareovirus. *Aquaculture Research* 52, 3164–3173. doi:10.1111/ARE.15163

Yang, S.-D., Liou, C.-H., Liu, F.-G., 2002. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 213, 363–372. doi:https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00120-5

Zhang, H., Ding, Q., Wang, A., Liu, Y., Teame, T., Ran, C., Yang, Y., He, S., Zhou, W., Olsen, R.E., Zhang, Z., Zhou, Z., 2020. Effects of dietary sodium acetate on food intake, weight gain, intestinal digestive enzyme activities, energy metabolism and gut microbiota in cultured fish: Zebrafish as a model. *Aquaculture* 523, 735188. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735188

Zheng, C. cai, Wu, J. wei, Jin, Z. hong, Ye, Z. feng, Yang, S., Sun, Y. qiang, Fei, H., 2020. Exogenous enzymes as functional additives in finfish aquaculture. *Aquaculture Nutrition* 26, 213–224. doi:10.1111/ANU.12995

CAPÍTULO 4

Efeito da suplementação com o ácido lipóico em espécies da aquicultura: Revisão sistemática e análise quantitativa de meta-dados a partir de modelos lineares generalizados (GLM)

Juan Rafael Buitrago Ramírez¹; Thiago F. Alves França²; Pablo Emilio Verde³; José María Monserrat^{1,4}

¹Laboratório Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos; Universidade Federal de Rio Grande - FURG, RS, Brasil

²Psychosomatics Research Group; Universidade Ibirapuera, SP, Brasil

³Coordination Center for Clinical Trials, University of Duesseldorf, Germany

⁴Instituto de Ciências Biológicas ICB; Universidade Federal de Rio Grande - FURG, RS, Brasil

Resumo

Foi efetuada uma revisão para compilar os efeitos zootécnicos e fisiológicos da administração do antioxidante ácido lipóico (LA), focada em variáveis relevantes para a produção aquícola de diversas espécies (crustáceos, peixes e moluscos) através de uma revisão sistemática da literatura disponível até o momento, selecionando os artigos que atenderam a critérios previamente definidos. Para a análise quantitativa dos dados estabeleceram-se modelos lineares generalizados (GLM) para determinar variáveis significativamente influenciadas pela suplementação ou administração de LA. Adicionalmente, foram utilizadas ferramentas de bioinformática para definir padrões comportamentais das variáveis moleculares encontradas na revisão. Nas respostas zootécnicas, o LA afetou o comportamento produtivo dos animais, tanto em variáveis relacionadas ao crescimento, quanto em variáveis inerentes ao aproveitamento do alimento. Da mesma maneira comprovou-se influência do LA em vias metabólicas relacionadas à produção de energia, onde a via de sinalização da AMPK parece ser uma peça fundamental nessas respostas que, por sua vez, estão associadas às respostas antioxidantes dos animais.

Palavras-chave: Antioxidants, bioenergetics, animal nutrition, functional annotation clustering, functional enrichment analysis

1. Introdução

A aquicultura tem sido ao longo dos anos uma das atividades pecuárias de maior crescimento, ao tempo que a pesca como competência direta perde importância no mercado de produtos cárneos de origem aquática. Grande parte desse desenvolvimento tem sido atribuído à redução progressiva dos estoques globais de peixes que força à indústria a criar estratégias mais sustentáveis, enquanto que aquicultura propõe soluções eficientes para problemas como abastecimento irregular de produto, no caso da pesca, e uso extensivo da terra, comumente observado em atividades dedicadas à oferta produtos proteicos substitutos (Luo et al., 2018).

Por isso, o desenho de pacotes tecnológicos para a produção de espécies aquáticas é um desafio constante que requer a aplicação de conhecimentos interdisciplinares variados, buscando em diferentes flancos explorar e aumentar o potencial genético das espécies cultivadas ou com prospecção para ser. Desta forma, o uso de compostos bioativos vem surgindo como alternativa para melhorar o desempenho produtivo, ao mesmo tempo que garante o bem-estar do animal como fator intrínseco à qualidade do produto. Dentro do grupo de compostos bioativos utilizados na aquicultura destacam-se polifenóis, terpenos, β glucanos, carotenoides, etc., os quais têm mostrado benefícios no sistema imunológico, equilíbrio de redox, microbiota intestinal e mudanças na modulação metabólica (Leyva-López et al., 2020; Patil et al., 2009).

Dentro dos compostos bioativos, o ácido lipóico (LA) tem sido avaliado há muito tempo como um suplemento alimentar na produção pecuária. É uma molécula composta de 8

carbonos, portadora de dois grupos de tiol em seu estado reduzido (ácido dihidrolipóico) ou um anel ditionálico quando é oxidado (Figura 1). Este é sintetizado em baixas concentrações nas células como um metabólito derivado da síntese do ácido graxo octanoico.

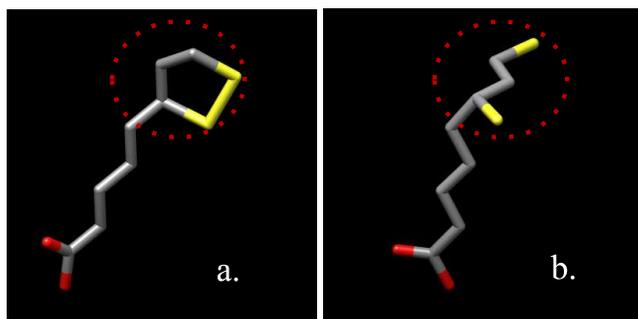


Figura 1. Estrutura do ácido lipóico (a.) e dihidrolipóico (b.). Ligações de carbono em cinza, enxofre em amarelo e vermelho para átomos de oxigênio no terminal de ácido carboxílico. Área delimitada por linha pontilhada indicada, anel ditionálico (a.) e dois grupos tiol (b.). Fonte da imagem DRUGBANK (go.drugbank.com).

Fisiologicamente age como uma coenzima ligada à subunidade E2 de piruvato e α -cetoglutarato desidrogenase, participando ativamente da descarboxilação oxidativa de substratos energéticos nas mitocôndrias (Gorça et al., 2011). O LA tem sido utilizado como um suplemento em função de suas excelentes capacidades como antioxidante, que são frequentemente associadas a propriedades antimutagênicas, anticâncer, anti-inflamatórias (como inibidor de sinalização de citocinas como TNF- α) e promotores da função mitocondrial (Liu et al., 2018). Adicionalmente possui a capacidade de quelar metais livres como ferro, cobre, manganês e zinco, facilitando assim sua excreção (Biewenga et al., 1997; Gorça et al., 2011).

O LA também tem sido capaz de diminuir a tolerância à insulina em modelos animais de diabetes mellitus, bem como em humanos diabéticos, aumentando mediante mecanismos

não muito bem definidos a utilização da glicose circulante. Quanto a problemas de obesidade, devido à capacidade de LA de promover a atividade β -oxidativa, tanto em modelos animais quanto em humanos, tem se observado efeitos anorexígenos e de emagrecimento, com a diminuição das concentrações sanguíneas de lipoproteínas de baixa densidade e colesterol (Gorça et al., 2011; Mahmoudinezhad and Farhangi, 2021). Esta evidência sugere a possibilidade de usar LA como um poderoso modulador do metabolismo energético, em princípio como ativador da via de sinalização AMP-cinase (AMPK), envolvida na regulação positiva de vias catabólicas e inibidor da sinalização hipotalâmica da AMPK (Golbidi et al., 2011; Kim et al., 2004; Koh et al., 2011; López, 2018).

A capacidade antioxidante e seu efeito na produção de energia dos organismos são motivos para o LA ser usado como suplemento dietético na produção animal. Em aves foram observados efeitos como melhor conversão de ração, aumento da eficiência proteica, melhoria na qualidade da carne promovendo a estabilidade da fração lipídica da carcassa, principalmente quando suplementado com α -tocopherol, provavelmente devido a sua ação conjunta na contenção da peroxidação lipídica (Mahmoudinezhad e Farhangi, 2021; Parveen et al., 2013; Shahid, 2013). No entanto, sua suplementação pode causar reduções consideráveis no ganho de peso. Não obstante, tem sido visto que a associação de LA com fontes adicionais de energia, como o óleo de germe de trigo, que também possui um alto teor de α -tocopherol, pode reverter a possível perda de peso gerada pelo LA, promovendo o desempenho zootécnico em frangos de corte, juntamente com os efeitos benéficos já mencionados sobre o sistema antioxidante e a qualidade da carne (Arshad et al., 2013; Sohaib et al., 2018).

Em organismos aquáticos há algumas evidências experimentais da implementação de LA como suplemento produtivo, benefícios claramente associados como a melhoria da

capacidade antioxidante do animal e com consequentes melhoras na qualidade da carne. Este efeitos podem ser uma justificativa suficiente para a utilizar o LA, levando em conta o grande número de variáveis ambientais que podem influenciar no estado oxidativo dos animais (como temperatura, pH, concentração de compostos nitrogenados na água, entre outros), que afetam o investimento energético que os organismos fazem para sua manutenção (metabolismo padrão) em detrimento do crescimento ou pelo menos da quantidade de energia investida neste (Kim et al., 2017; Robles-Romo et al., 2016). O fato de LA ter as características de um modulador antioxidante e metabólico para a produção de energia, promoveu as pesquisas sobre os efeitos deste em escala experimental, focada na melhoria de fatores inerentes à atividade produtiva, como comportamento zootécnico, saúde e defesa imunológica, estimulação das defesas antioxidantes e contenção das espécies reativas de oxigênio, preservação do material reprodutivo durante o tempo de conservação e melhoria da qualidade nutricional dos produtos de aquicultura destinados ao consumo humano (Bou et al., 2017; Huang et al., 2019; Inanan e Kanyılmaz, 2020; Liu et al., 2018; Lu et al., 2019). No entanto, apesar da literatura científica existente sobre a suplementação com LA, ainda não há consenso ou pelo menos robustez nas informações sobre como este modifica, se for assim, o comportamento zootécnico dos animais (taxa específica de crescimento, conversão alimentar, rendimento da carcassa). Esta revisão tem como objetivo compilar informações sobre LA na aquicultura e ajudar a esclarecer seus efeitos como promotor zootécnico.

Para isso, coletaram-se artigos de revisão por pares sobre a aplicação de LA em espécies aquáticas. Analisaram-se quantitativamente os dados através do uso de modelos lineares generalizados (GLM) como ferramenta estatística e por fim, as respostas geradas pelos GLM foram integradas com o auxílio de métodos bioinformáticos.

2. Materiais e Métodos

O banco de dados Scopus foi utilizado para aplicação da cadeia de busca: "lipoic acid" OR "Alpha-lipoic acid" OR "thioic acid" OR " α -lipoic acid" OR "dihydrolipoic acid" AND aquaculture OR aquatic OR fish OR crustacea OR mollusk OR bivalve OR mariculture OR shrimp OR haliotidae OR salmon OR tilapia OR carp OR echinodermata OR aquarium OR tank OR "Recirculating aquaculture system" OR aquafeed OR marine OR haliotis OR oyster. O projeto de revisão foi publicado na plataforma ResearchGate (<https://www.researchgate.net/project/Supplementation-effect-of-the-perfect-antioxidant-alpha-lipoic-acid-in-oxidative-stress-and-zootechnical-behavior-of-livestock-animals-Protocol-for-a-systematic-review-and-meta-analysis/update/5c901466cfe4a7299496d30d>).

Obtiveram-se 101 artigos que contém algumas dessas palavras, dentro do título, resumo ou palavras-chave. Os artigos encontrados foram compilados em um arquivo ".bib" e o software JabRef® foi utilizado como gerenciador de referências para efetuar o descarte de artigos duplicados (Figura 2).

Os critérios de exclusão utilizados para esta revisão foram: trabalho aplicado em espécies não aquáticas, administração de ácido lipóico a células, linhas celulares ou órgãos, independentemente da espécie de origem, uso de ácido lipóico em combinação com outra substância tanto em concentrações fisiologicamente benéficas ou quanto potencialmente tóxicas e artigos cujos indivíduos experimentais que foram expostos a fatores bióticos e/ou abióticos patogênicos (Figura 2).

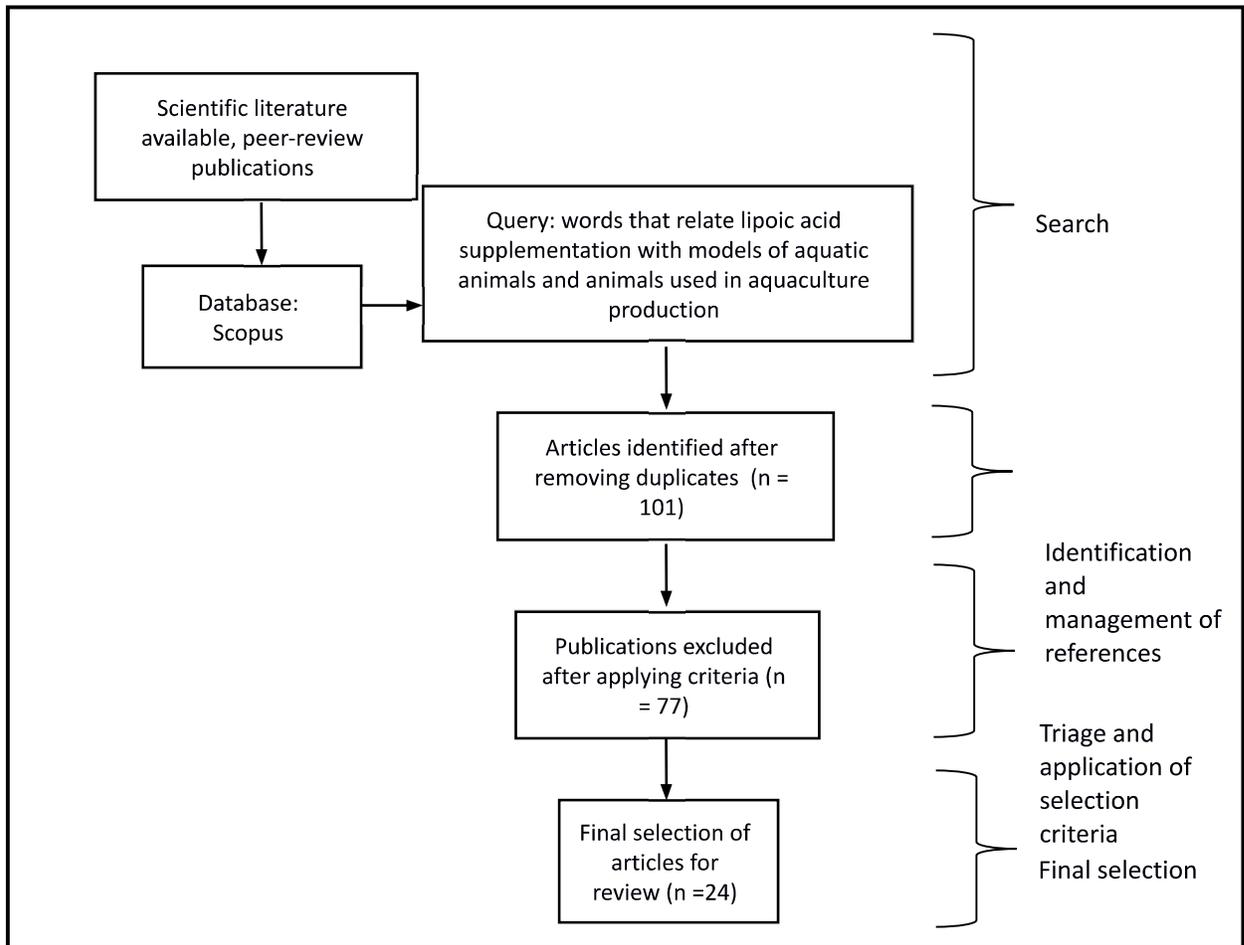


Figura 2. Processo de busca de artigos para a a revisão sistemática e meta-análise

Para a realização da análise quantitativa dos artigos selecionados, foi realizada uma compilação sistemática de umas variáveis avaliadas, número de sujeitos experimentais (Material suplementar 1). Enquanto as medias de cada variável, estas foram normalizadas utilizando a relação entre a média de grupos experimentais tratados com ácido lipóico e os controles não tratados, assim mesmo desvios padrão de cada grupo foram normalizados pela sua respetiva media. A extração dos dados foi realizada a partir dos dados disponíveis no texto, tabela e gráficos. Para estes últimos, o software WebPlotDigitizer foi usado como uma ferramenta de extração.

Após a normalização das médias, foi efetuada uma inspeção exploratória dos dados disponíveis para cada variável, a heterogeneidade foi verificada pelos testes de Cochran (Q) e Higgins (I^2) (Han et al., 2012; Liu et al., 2020). Foram realizadas análises de meta-regressão nas variáveis resposta avaliadas em 3 artigos ou mais dentro da base de artigos selecionados, isto com o intuito de explicar estatisticamente a heterogeneidade dos dados. Utilizaram-se as covariáveis: a duração do experimento, a dose aplicada, o nível trófico da espécie (variável contínua, quantitativa do hábito alimentar da espécie) de acordo com a plataforma FishBase (<https://fishbase.in>), e a literatura científica disponível. Da mesma forma, o peso final dos animais foi normalizado pelo peso assintótico da espécie, disponível na plataforma FishBase (ou na literatura científica publicada) este valor foi utilizado como indicador do desenvolvimento dos indivíduos experimentais respeito ao crescimento máximo da espécie. Para trabalhos em que o peso final não foi relatado ou nenhum dado foi encontrado sobre o peso assintótico da espécie, foram construídas curvas de crescimento usando o modelo de Von Bertalaffy modificado para o peso (Springborn et al., 1994) a partir de dados publicados (Tabela 1). Alguns modelos geraram pesos assintóticos muito acima do valor reportado para a espécie, nestes casos o modelo de crescimento só foi utilizado para estimar os pesos finais experimentais quando não haviam sido reportados, e o valor máximo de peso relatado na literatura foi utilizado para relativizar o peso experimental final dos animais estudados. Também utilizaram-se os preditores categóricos: hábito alimentar do animal (carnívoro, onívoro e herbívoro), o órgão analisado (para variáveis resposta pertencentes ao grupo de biomarcadores moleculares como proteínas e metabólitos), o tipo de espécie (infraclasse Teleostei, subfilo Crustacea ou filo Mollusca) e o ambiente natural do animal (limnico ou marinho).

Tabela 1. Modelo de Von Bertalanffy utilizado nas espécies consideradas no estudo. Parâmetros do modelo de crescimento onde W_{∞} é o peso assintótico da espécie, k é a relação de índice entre peso W e o tempo t , e b é a relação alométrica entre peso e comprimento. R^2 é o coeficiente de determinação dos modelos.

^a = valor assintótico calculado no modelo/peso máximo encontrado para a espécie.

Taxonomic classification		W_{∞}	K	b	R^2
Teleostei	<i>Corydoras paleatus</i>	5.39	0.001720	3.27	0.98
Teleostei	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	21058.97	0.200000	2.95	0.99
Teleostei	<i>Cyprinus carpio</i>	27452.74	0.200001	2.89	0.99
Teleostei	<i>Danio rerio</i>	1.54	0.016059	2.92	0.99
Crustacea	<i>Eriocheir sinensis</i> ^a	388.633 / 180.00	0.001955	20.59	0.96
Mollusca	<i>Haliotis discus hannai</i>	47.32	0.000334	2.99	0.98
Teleostei	<i>Jenynsia multidentata</i>	33.69/14	0.000583	3.18	0.99
Crustacea	<i>Litopenaeus vannamei</i> ^a	88.88 / 33.00	0.001812	2.03	0.99
Teleostei	<i>Oreochromis niloticus</i>	8464.07	0.457041	2.63	0.99
Teleostei	<i>Piaractus mesopotamicus</i> ^a	15908.40/20000	0.004792	2.54	0.99
Teleostei	<i>Trachinotus marginatus</i>	15	0.000705	2.81	0.99

Uma vez definidas as covariáveis e preditores categóricos, procedeu-se com a meta-regressão para cada um das variáveis resposta (Figure 3; Material suplementar 2).

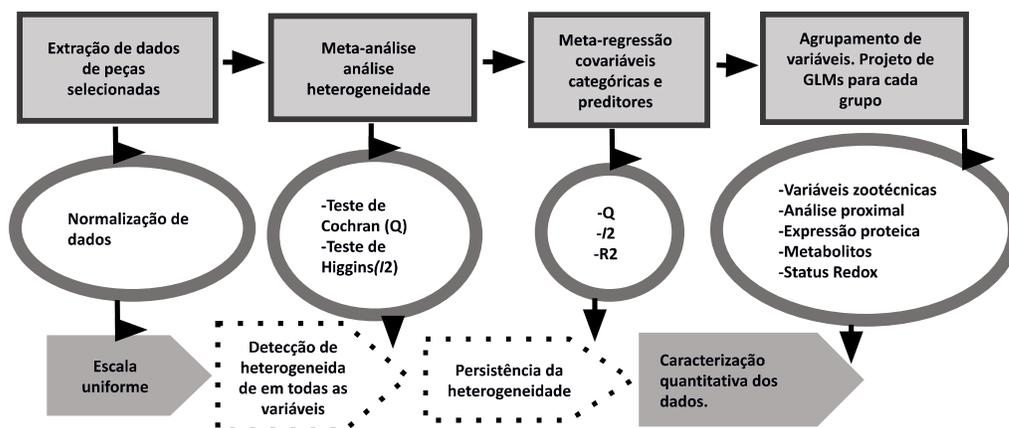


Figura 3. Fluxograma de processamento de dados. Workflow do pré-processamento e processamento de dados a partir de ferramentas de meta-análise até a formulação do GLM. Os retângulos indicam as etapas de análise de dados, as formas ovais mostram o processamento dos dados em cada etapa de análise e as setas representam os resultados das etapas. Onde as setas escuras são as saídas reais e a fonte de resultados para este trabalho.

Com a finalidade de estabelecer relações quantitativas sobre os possíveis efeitos do LA no nível fisiológico e bioquímicos, foram estabelecidos GLM, agrupando as variáveis obtidas em: parâmetros zootécnicos, expressão genética e proteica, concentração de metabólitos, estado antioxidante, análise proximal de animais e índices fisiológicos e viscero-somáticos.

Para cada grupo de variáveis, foram formulados dois tipos de modelos de regressão gama escalar assumindo diferentes distribuições com skewness positivo e função de ligação logarítmica para a detecção de respostas não lineares à dose de LA (Modelo 1 e Modelo 2).

Modelo 1. Três níveis hierárquicos (GLM1).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i X_{ijkl} + \beta_{j(i)} + \varepsilon_{(ij)k}$$

Onde o Y_{ijk} representa os valores relativizados gerados a partir das médias dos tratamentos com LA e controles, i -th variável resposta (variáveis zootécnicas; α) pela covariável X que representa a dose de ácido lipóico é aninhado na j -th dieta (β) dos animais e com uma distribuição estatística do termo de erro $\varepsilon_{(ij)k}$ (Tabela 2).

Modelo 2. Quatro níveis hierárquicos (GLM2).

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i X_{ijkl} + \beta_{j(i)} + \gamma_{k(ij)} + \varepsilon_{(ijk)l}$$

Onde o Y_{ijkl} representa os valores relativizados gerados a partir das médias dos tratamentos com LA e controles, i -th variável resposta (proteína ou metabólito; α) pela covariável X (dose de ácido lipóico, aninhado no j -th órgão (β) avaliado, aninhado na k -th dieta (γ) dos animais e com uma distribuição estatística do termo de erro $\varepsilon_{(ijk)l}$ (Tabela 2).

Tabela 2 Estrutura de modelos hierárquicos para os diferentes grupos de resultados Níveis superiores aninham níveis inferiores de cima para o abaixo do diagrama, para três níveis: Dose (dieta (variável resposta)) referente ao GLM1 e para quatro níveis ou GLM2: Dose (dieta (órgão (variável resposta))) referente ao modelo 2.

Hierarchical Model 3 levels	Lipoic acid dose (numerical predictor)	Hierarchical Model 4 levels	Lipoic acid dose (numerical predictor)
	Diet		Diet
	Carnivore		Carnivore
	Omnivore		Omnivore
	Herbivore		Herbivore
	Outcome or dependent factor		Organ
	Body gain		Liver or Hepatopancreas
	Specific growth ratio		Muscle, and others
	Food intake, and others		
			Outcome or dependent factor
			GSH
			GPx
			MDA
			CPT1A, and others

Com a modelagem dos dados, foram gerados coeficientes (parâmetros do modelo) para cada variável resposta (Tabela 2). As proteínas cujos coeficientes apresentaram significância estatística foram selecionadas e catalogadas como proteínas expressas diferencialmente e anotadas de acordo com o processo biológico, componente celular e função molecular dentro da plataforma Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) com a qual realizou-se análise Functional Annotation Clustering (Lian et al., 2014). Também determinou-se usando DAVID as vias metabólicas significativamente expressas para cada órgão ou tecido (músculo, fígado ou hepatopâncreas, brânquia, rim anterior, pele e baço). Foram calculados os p valores por Bonferroni, Benjamini e false discovery ratio (FDR) (Lian et al., 2014; Sabetian e Shamsir, 2016), no entanto neste trabalho só foram consideradas as vias metabólicas que apresentaram p valor < 0.05 para Bonferroni . Por fim, proteínas com coeficientes significativos determinados pelo GLM2 foram utilizadas para a análise de interação proteína-proteína (PPI) com a ferramenta do Functional Enrichment Analysis da STRING

integrada ao software Cytoscape 3.8.2. Assim estudaram-se as interações metabólicas entre o grupo selecionado de proteínas para o fígado e músculo (Lian et al., 2014; Sabetian e Shamsir, 2016).

3.Resultados e discussão

3.1.Ácido lipóico na aquicultura

Até o dia 16 de agosto de 2020, foram encontrados 101 artigos. Os trabalhos selecionados levando em conta os critérios de exclusão (Figura 2) contêm dados de 11 espécies diferentes, incluindo teleósteos (8 espécies), crustáceos (2 espécies) e moluscos (1 espécie), conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 Compilado de referências. Espécies aquáticas em artigos selecionados para esta revisão, com autores, DOI e ano de publicação.

Espécie	Autor	DOI	Ano
<i>Corydoras paleatus</i>	Monserrat et al	10.1016/j.cbpc.2008.06.011	2008
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Liu et al	10.1016/j.fsi.2018.06.057	2018
	Shi et al	10.1017/S000711451800226X	2018
<i>Ciprinus carpio</i>	Amado et al	10.1016/j.cbpc.2011.04.007	2011
	Enamorado et al	10.1016/j.cbpa.2015.05.023	2015
	Longaray et al	10.1016/j.cbpa.2013.02.004	2013
<i>Danio Rerio</i>	Francis et al	10.1111/j.1365-2109.2011.02889.x	2011
	Huang et al	10.1007/s10695-020-00795-8	2019
	Lu et al	10.1016/j.cbpa.2019.06.009	2019
<i>Eriocheir sinensis</i>	Xu	10.1016/j.aquaculture.2017.09.036	2017
<i>Haliotis discus hannai</i>	Zhang	10.1111/j.1365-2109.2010.02592.x	2010
<i>Jenynsia multidentata</i>	Monserrat et al	10.1016/j.pestbp.2013.10.009	2014
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Da Silva Martins	10.1080/10236244.2014.940702	2014
	Da Silva Martins	10.1111/anu.12663	2018
	Lobato et al	10.1016/j.cbpa.2013.03.015	2013
	Lobato et al	10.1016/j.aquaculture.2018.08.020	2018
	Lobato et al	10.1111/are.13838	2018
<i>Oreochromis niloticus</i>	Lu et al	10.1016/j.fsi.2018.12.023	2019
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	de Medeiros et al	10.20950/1678-2305.2017.74.84	2017
	Park et al	10.1007/s10695-006-9110-9	2006
	Terjesen et al	10.1093/jn/134.11.2930	2004
	Trattner	10.1016/j.aquaculture.2007.09.025	2007
<i>Trachinotus marginatus</i>	Kutter et al	10.1016/j.aquaculture.2012.09.010	2012
	Kutter et al	10.1111/jai.12137	2013

As variáveis resposta mais avaliadas dentro dos artigos selecionados foram GST (n= 14), MDA (n= 13), body weight (n=10), total antioxidante capacity (n= 9). Todas as variáveis resposta encontradas apresentaram altos valores de heterogeneidade após a realização das meta-regressões (Material suplementar). Devido a isso a análise quantitativa dos dados foi feita através de GLMs. É importante ressaltar que os resultados gerados pelos GLMs são apresentados como apenas presuntivos, as respostas que estes apontam devem ser contrastadas em futuros trabalhos.

As doses utilizadas de ácido lipóico variaram de 10 a 60 mg.kg⁻¹ utilizando a via de administração intraperitoneal. Quando LA foi suplementado na dieta, foram encontradas doses entre 68 a 3600 mg.kg⁻¹ e apenas em um caso foi adicionada LA diretamente na água com concentrações que variavam de 1238 a 2475 mg. L⁻¹. A variável dose de LA apresentou efeito significativo dentro dos modelos estabelecidos para as variáveis resposta zootécnicas (Tabela 4; Figura 4) e para aqueles agrupados dentro da expressão de genes e proteínas (Tabela 5-6). Para o estado antioxidante não houve efeito perceptível de LA dentro dos dados disponíveis, exceto nos parâmetros de pontes de proteína-tiol e dissulfeto, mas esses dados vêm de apenas um trabalho (Enamorado et al., 2015), as variáveis: capacidade antioxidante total e produção de ROS não foram significativamente alteradas por LA. No modelo gerado a partir de dados metabólicos foram encontrados efeitos significativos atribuíveis ao LA (Tabela 6).

3.2.GLM1 variáveis zootécnicas

Foi possível detectar possíveis efeitos do LA em função da dose, embora com certas divergências aparentemente determinadas pelo hábito alimentar dos animais (Tabela 4). Para animais carnívoros e herbívoros a LA teve um efeito negativo (determinado no GLM1

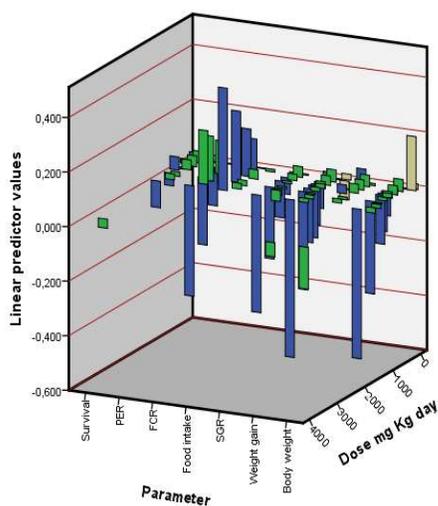
pela apresentação de coeficientes negativos; $-\beta$) para os parâmetros peso corporal e ganho de peso (Tabela 3; Figura 4). Quanto às espécies de hábitos onívoros, só se tem dados do crustáceo *Litopenaeus vanamei*, o qual apresentou um β positivo, embora sem significância estatística. Concluindo segundo os resultados gerais existe um possível efeito negativo de LA para os parâmetros de peso corporal e o ganho de peso, pelo menos para as 7 espécies entre carnívoros e herbívoros, (Teleostei: *Ctenopharyngodon idellus*. *Piaractus mesopotamicus*. *Ciprinus carpio*. *Piaractus mesopotamicus*. *Trachinotus marginatus* e mollusca *Haliotis discus hannai*) que foram analisadas. Em concordância com os resultados de peso corporal, a SGR apresentou $-\beta$ em carnívoros, herbívoros e onívoros, no entanto, apenas para carnívoros foi estatisticamente significativa. Além disso, este parâmetro incluiu dados do carnívoro crustáceo *Eriocheir sinensis* (Tabela 4; Figura 4). Os resultados observados sugerem possíveis efeitos negativos da LA no desempenho zootécnico. Mais na frente algumas hipóteses serão levantadas para explicar como possíveis modificações na atividade de vias catabólicas podem causar a diminuição dos teores de lipídio no corpo do animal prejudicando os parâmetros relacionados ao crescimento e conversão alimentar.

Tabela 4 Resultados GLM1 parâmetros Zootécnicos . Os resultados do modelo para cada comportamento alimentar aninhado pelo parâmetro avaliado, β são o modelo de coeficientes com seu erro padrão SE. χ^2 são valores chi², calculados com o teste de Wald. Sig. são valores p dos coeficientes.

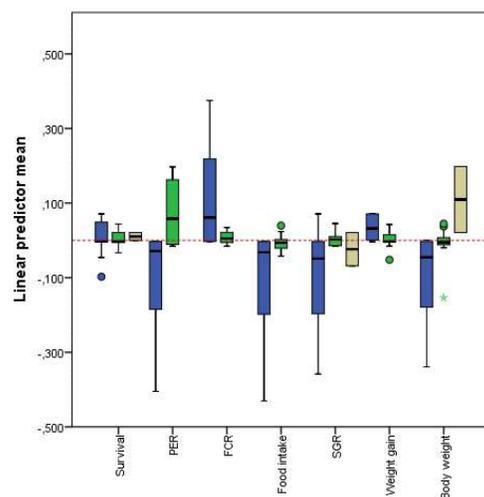
* Coeficientes significativos (p<0,05)

Parâmetro	Dieta	β	SE	χ^2	Sig.
Peso corporal	Carnívoro	-4.E-04	4.E-05	100.10	0.000*
Peso corporal	Herbívoro	-6.E-05	2.E-05	10.66	0.001*
Peso corporal	Onívoro	2.E-03	1.E-03	2.27	0.132
FCR	Carnívoro	2.E-04	4.E-05	30.58	0.000*
FCR	Herbívoro	-2.E-05	3.E-05	0.50	0.482
FER	Herbívoro	-9.E-05	5.E-05	2.94	0.087
Ingestão de alimentos	Carnívoro	-4.E-04	4.E-05	63.48	0.000*
Ingestão de alimentos	Herbívoro	-8.E-05	3.E-05	5.68	0.017*
PER	Carnívoro	-3.E-04	4.E-05	56.11	0.000*
PER	Herbívoro	1.E-04	3.E-05	14.11	0.000*
SGR	Carnívoro	-5.E-04	4.E-05	121.98	0.000*
SGR	Herbívoro	-5.E-05	3.E-05	2.68	0.102
SGR	Onívoro	-2.E-03	1.E-03	3.05	0.081
Sobrevivência	Carnívoro	-1.E-04	4.E-05	7.56	0.006*
Sobrevivência	Herbívoro	-2.E-05	2.E-05	1.58	0.208
Sobrevivência	Onívoro	-1.E-03	1.E-03	0.83	0.362
Ganho de peso	Carnívoro	-1.E-04	7.E-05	3.16	0.075
Ganho de peso	Herbívoro	-3.E-05	2.E-05	2.22	0.137

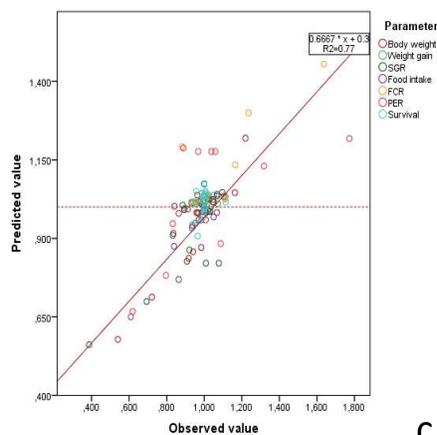
A Ingestão de alimentos (Tabela 4; Figura 4) apresentou tendência decrescente com a adição de LA para carnívoros e herbívoros. A razão de conversão alimentar (FCR) apresentou divergências dependendo da dieta. Para os carnívoros foi encontrada uma declividade positiva com a adição de LA, já em herbívoros o coeficiente obtido foi negativo. As diferenças na razão de eficiência proteica (PER) também são perceptíveis, tendo um aumento no uso de proteína no grupo de espécies herbívoras ao contrário dos carnívoros que apresentaram uma diminuição em sua eficiência (Figura 4). Em relação à sobrevivência, os carnívoros apresentaram um coeficiente significativamente negativo.



a.



b.



c.

Figura 4. Representações gráficas para o GLM1 zootécnico. **a** Resposta dos parâmetros avaliados (peso corporal, ganho de peso, taxa específica de crescimento, consumo de alimento, fator de conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, sobrevivência) de forma dependente da dose para as variáveis zootécnicas e de hábito. **b** médias dos coeficientes gerados para cada parâmetro avaliado, a linha vermelha pontilhada representa o controle sobre a origem cartesiana. **c** Valores relativizados pela médias dos controles versus valores prognosticados pelo modelo para cada parâmetro. O retângulo na zona de gráfico superior contém o modelo de equação linear e seu coeficiente de determinação.

3.3.GLM2 Proteínas

Dieta e o órgão foram encontrados como variáveis moduladoras da resposta à administração de LA em função da dose. Para o modelo proteico, também foi levado em conta como preditor categórico a maneira como foi quantificada a proteína (se as respostas vieram de análises de expressão genética, de expressão proteica ou de atividade enzimática). No entanto, na ausência de efeitos significativos desse fator, foi descartado do modelo. Assim, o modelo foi definido levando em conta o efeito da dose de LA, em animais com dietas diferentes, em cada órgão que aninharam as proteínas avaliadas como já descrito (GLM2; Tabela 2). Das 49 proteínas levadas em consideração, 30 apresentaram coeficientes significativos (Tabela 5). Apesar da diversidade de proteínas, grande parte delas está relacionada à produção de energia e síntese de ácidos graxos e outras ao estado antioxidante. A Tabela 5 apresenta as proteínas que obtiveram coeficientes significativos para GLM2. Além disso, as vias metabólicas obtidas pelo Functional Annotation Clustering em fígado e músculo pertencentes a proteínas que apresentaram coeficientes significativos de acordo com os resultados do GLM2 são apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 5 Coeficientes significativos do GLM2 de proteínas. O resultado do modelo 2 em cada órgão aninhado pelo comportamento alimentar e ao mesmo tempo, aninhado pelo parâmetro avaliado, β são os coeficientes do modelo com o respectivo erro padrão SE. χ^2 são valores χ^2 calculados com o teste de Wald. Sig. são valores p dos coeficientes.

Órgão	ID de Genes	Nome	Dieta	B	SEM	χ^2	Sig
Músculo	ACACA	Acetyl CoA carboxylase	Carnívoro	-1,E-0 3	2,E-0 4	15,8 7	0,00 0
	ANPEP	aminopeptidase n	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	13,3 3	0,00 0
	CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	13,3 8	0,00 0
	CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1	Herbívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	9,24	0,00 2
	DGAT2	Diacylglycerol acyltransferase 2	Carnívoro	-1,E-0 3	2,E-0 4	5,23	0,02 2
	GCK	Glucokinase	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	16,7 6	0,00 0
	LIPE	Hormone-sensitive lipase	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	22,2 1	0,00 0
	LPL	Lipoprotein lipase	Herbívoro	4,E-0 4	2,E-0 4	4,95	0,02 6
	MTOR	Mechanistic target of rapamycin	Herbívoro	7.E-0 4	2,E-0 4	17,2 4	0,00 0
	PNPLA2	Adipose triglyceride lipase	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	10,8 8	0,00 1
	PNPLA2	Adipose triglyceride lipase	Herbívoro	0.E+0 0	1,E-0 4	8,61	0,00 3
	SGLT1	Sodium-dependent glucose co-transporter 1	Carnívoro	4,E-0 4	2,E-0 4	3,97	0,04 6
	SLC15A1	peptide transporter 1	Carnívoro	9.E-0 4	2,E-0 4	14,9 1	0,00 0
	Fígado	ANPEP	aminopeptidase n	Carnívoro	2,E-0 3	2,E-0 4	51,6 2
ATP5H		ATP synthase mitochondrial F1 complex alpha subunit	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	5,13	0,02 3
COX5A		cytochrome c oxidase subunit Vab hepatocyte	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	7,52	0,00 6
CPT1A		Carnitine palmitoyltransferase 1	Herbívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	11,1 9	0,00 1
CPT1A		Carnitine palmitoyltransferase 1	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	4,98	0,02 6
G6PC		Glucose-6-phosphatase	Carnívoro	2,E-0 3	2,E-0 4	60,7 0	0,00 0
GCLC		Glutamate Cysteine Ligase	Carnívoro	1,E-0 2	3,E-0 3	10,6 8	0,00 1
GLUD1		Glutamate dehydrogenase	Herbívoro	-1,E-0 3	2,E-0 4	14,5 2	0,00 0
GPX3		Glutathione peroxidase 1	Carnívoro	-1,E-0 3	4,E-0 4	5,33	0,02 1
GSTA1		Glutathione S-transferase A1	Onívoro	-2,E-0 3	6,E-0 4	15,7 9	0,00 0
GSTA1		Glutathione S-transferase A1	Carnívoro	2,E-0 4	7.E-0 5	6,25	0,01 2
LIPE		Hormone-sensitive lipase	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	28,3 2	0,00 0
LPL		Lipoprotein lipase	Herbívoro	6.E-0 4	2,E-0 4	12,7 5	0,00 0
LPL		Lipoprotein lipase	Carnívoro	8,E-0 4	2,E-0 4	13,2 4	0,00 0
MT1M	Metallothionein 1M	Onívoro	8,E-0 3	3,E-0 3	5,53	0,01 9	

	MTOR	Mechanistic target of rapamycin	Carnívoro	6.E-0 4	2,E-0 4	6,79	0,00 9
	PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Carnívoro	2,E-0 3	2,E-0 4	76,8 1	0,00 0
	PFKL	Phosphofructokinase	Carnívoro	5,E-0 4	2,E-0 4	4,19	0,04 1
	PNPLA2	Adipose triglyceride lipase	Herbívoro	0.E+0 0	1,E-0 4	6,45	0,01 1
	PNPLA2	Adipose triglyceride lipase	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	9,02	0,00 3
	UQCR2	Ubiquinol–cytochrome c reductase core protein II	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	19,0 1	0,00 0
	SLC5A1	Sodium-dependent glucose co-transporter 1	Carnívoro	2,E-0 3	2,E-0 4	72,7 9	0,00 0
	SIRT1	SIRT1 hepatocyte	Carnívoro	6.E-0 4	2,E-0 4	7,82	0,00 5
	SLC15A 1	peptide transporter 1	Carnívoro	1,E-0 3	2,E-0 4	27,9 4	0,00 0
	SOD1	SODCuZn	Carnívoro	1,E-0 3	4,E-0 4	12,9 3	0,00 0
	TFAM	Mitochondrial transcription factor A	Carnívoro	7.E-0 4	2,E-0 4	9,70	0,00 2
Cérebro	GCLC	Glutamate Cysteine Ligase	Carnívoro	9.E-0 3	3,E-0 3	9,59	0,00 2
Brânquia	GSTA1	Glutathione S-transferase A1	Carnívoro	-7,E-0 4	9,E-0 5	57,6 6	0,00 0
Visceral	PNPLA2	Adipose triglyceride lipase	Herbívoro	1,E-0 3	1,E-0 4	54,7 6	0,00 0
Todo	SOD2	Superoxide dismutase Mn	Carnívoro	3,E-0 4	9,E-0 5	10,2 0	0,00 1

3.4.AMPK principal intermediário no efeito de LA?

As vias expressas significativamente estão intimamente relacionadas com a regulação do estado energético e da produção energética da célula ou tecido, onde a via de sinalização da AMPK (Tabela 6 e 7) parece ocupar um papel preponderante dentro da resposta fisiológica e bioquímica ao LA. A via de sinalização AMPK é responsável pela homeostase energética da célula, sua função é priorizar o metabolismo catabólico, para restaurar o equilíbrio energético dos compostos de adenilato. Devido a isto os principais efetores da AMPK são o AMP ou o aumento da relação ADP:ATP, isto leva à ativação de vias metabólicas relacionadas com a oxidação de estruturas carbonadas para a produção de energia. Espera-se que após a ativação da AMPK, está fosforile (ative) proteínas promotoras do catabolismo de ácidos graxos, hexoses ou aminoácidos (Hardie et al., 2012). No entanto, o mecanismo pelo qual LA promove a atividade AMPK ainda é incerto.

Tabela 6 Clusters de anotações funcionais no músculo. Cluster de vias metabólicas integradas pelas proteínas que apresentaram coeficientes significativos segundo o GLM (Tabela 4). Cada cluster representa vias metabólicas funcionalmente relacionadas segundo a plataforma DAVID, o enrichment score de cada cluster representa a relevância do cluster dentro do listado de genes aportado. Bonferroni, Benjamini e FDR são p valores ajustados, para este trabalho foi usado só Bonferroni como critério de significância. Not Clustered são as vias significativamente expressas não relacionadas com outras vias.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 3.7819		
Category	Term	Bonferro ni	Benjami ni	FDR
GOTERM_MF_DIRE CT	GO:0004806~triglyceride lipase activity	0.0023	0.0023	0.0023
GOTERM_BP_DIREC T	GO:0019433~triglyceride catabolic process	0.0182	0.0182	0.0181
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 1.3132		
Category	Term	Bonferro ni	Benjami ni	FDR
KEGG_PATHWAY	hsa04910:Insulin signaling pathway	0.0275	0.0139	0.0136
Not Clustered				
Category	Term	Bonferro	Benjami	FDR

		ni	ni	
KEGG_PATHWAY	hsa04152:AMPK signaling pathway	0.0197	0.0139	0.0137
GOTERM_CC_DIRE CT	GO:0005811~lipid particle	0.0242	0.0245	0.0245

Tabela 7 Agrupamento de anotações funcionais do fígado. Cluster de vias metabólicas integradas pelas proteínas que apresentaram coeficientes significativos segundo o GLM (Tabela 4). Cada cluster representa vias metabólicas funcionalmente relacionadas segundo a plataforma DAVID, o enrichment score de cada cluster representa a relevância do cluster dentro do listado de genes aportado. Bonferroni, Benjamini e FDR são p valores ajustados, para este trabalho foi usado só Bonferroni como critério de significância. Not Clustered são as vias significativamente expressas não relacionadas com outras vias.

Annotation Cluster 1	Enrichment Score: 3.1262			
Category	Term	Bonferroni	Benjamini	FDR
KEGG_PATHWAY	hsa04152:AMPK signaling pathway	0.0015	0.0015	0.0013
Annotation Cluster 2	Enrichment Score: 3.1205			
Category	Term	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_MF_DIRE CT	GO:0004806~triglyceride lipase activity	0.0222	0.0224	0.0224
Not Clustered				
Category	Term	Bonferroni	Benjamini	FDR
KEGG_PATHWAY	hsa00480:Glutathione metabolism	0.0273	0.0138	0.0122

Um possível mecanismo de ativação da AMPK pelo LA pode ser através do aumento da concentração de NAD^+ e da relação $NAD^+/NADH$ na redução do LA para DLA dentro da célula, esta redução pode ser conduzida por enzimas como a lipoamida desidrogenase ou pelo sistema tioredoxina/ tioredoxina redutase (Chen et al., 2012). O aumento da relação $NAD^+/NADH$ ou da concentração intracelular de NAD^+ são potentes sinais para a ativação de vias relacionadas com a produção de energia como a glicólise, o ciclo de Krebs e a

oxidação de ácidos graxos (Srivastava, 2016). Este fenômeno pode estar mediado pela SIRT1 (Sirtuin 1; proteína desacetilase de histonas dependente de NAD^+) proteína significativamente up-regulated segundo GLM2, a qual usa o NAD^+ como co-substrato. Assim um aumento na concentração de NAD^+ levaria um aumento da atividade desta desacetilase, que além de funcionar de maneira similar a AMPK como sensor energético também possui a capacidade de desacetilar a proteína liver kinase B1 (LKB1) ativando-a, está ao mesmo tempo é capaz de fosforilar e ativar a AMPK dentro da célula (Figura 5) (Chen et al., 2012; Shackelford e Shaw, 2009). Interessantemente, isto representaria um processo de acople entre o balanço redox e a bioenergética celular, ao mesmo tempo que estabelece uma estreita relação entre a atividade da SIRT1 e a AMPK. O que na aquicultura, ampliaria as opções sobre o desenvolvimento de possíveis estratégias nutricionais para promoção da energia disponível para a produção, a partir de modulações do balanço redox.

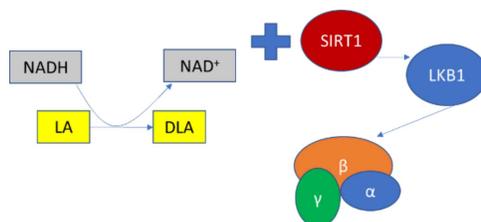


Figura 5 Ativação de SIRT1/LKB1/AMPK por LA. A ativação da AMPK pela redução do LA altera o equilíbrio redox do NADH que promove a atividade de desacetilação da SIRT1 em alvos moleculares como LKB1 que pode fosforilar/ativar a AMPK. Tanto a SIRT1 quanto a AMPK são vias de sinalização de produção de energia (Chen et al., 2012; Ruderman et al., 2010; Shackelford e Shaw, 2009).

3.5. Produção de energia e suplementação de LA

No presente trabalho observou-se que o LA pode ativar vias catabólicas para a produção de energia, especialmente a oxidação de ácidos graxos. No caso do músculo (Figura 6a;

Tabela 6) vemos que pode haver um aumento na expressão de proteínas pertencentes a vias que promovem β -oxidação, é possível observar também uma considerável up-regulation de proteínas envolvidas na oxidação de carboidratos (Figura 6), no entanto estas proteínas não se vincularam com nenhuma das vias metabólicas significativamente expressas no Functional Annotation Clustering em músculo e fígado (Tabela 6-7). Dentre as proteínas up-regulated do metabolismo de lipídios, estão a Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2 (PNPLA2), que catalisa o passo inicial na hidrólise de triglicerídeos desta reação resultam moléculas de diacilglicerol que a sua vez são hidrolisados pela enzima A lipase E, Hormone Sensitive Type (LIPE) que também foi up-regulated segundo os resultados do GLM2. Igualmente a Carnitine Palmitoyltransferase 1A (CPT1A) liga a carnitina aos ácidos graxos de cadeia longa (provenientes em parte da hidrólise de triglicerídeos) para que possam atravessar a membrana interna da mitocôndria onde aconteceria o processo da β -oxidação (Atlas de Proteína Humana disponível a partir de <http://www.proteinatlas.org>; Uhlén *et al.*, 2015). Das vias significativamente expressas em tecidos hepáticos (Tabela 7), a expressão da via triglyceride lipase activity, representada entre outras proteínas pela Lipoprotein lipase (LPL) pode ser observada dentro do cluster 2, em concordância com a atividade metabólica observada no músculo. Esta enzima participa da hidrólise de triglicerídeos para a formação de glicerol e ácidos graxos livres. Consequente à up-regulation das proteínas de lipólises, as proteínas Diacylglycerol O-Acyltransferase 2 (DGAT2) e Acetyl-CoA Carboxylase Alpha (ACACA) relacionadas com à síntese de ácidos graxos parecem ser down-regulated segundo o GLM2 (Tabela 5).

Destaca-se que as proteínas diretamente relacionadas com o metabolismo da glicose não foram reguladas em músculo a exceção da Glucokinase (GCK) a qual estaria indicando uma um aumento do ingresso e retenção da glicose dentro das células musculares (Atlas de Proteína Humana disponível a partir de <http://www.proteinatlas.org>; Uhlén *et al.*, 2015), no

entanto este fenômeno não implica necessariamente a utilização da glicose como fonte de energia. No fígado, houve uma up-regulation da Glucose 6 phosphatase que hidrolisa a glucose 6 fosfato para produzir um grupo fosfato e uma glucose que desligada do grupo fosfato consegue viajar fora da célula hepática para outros tecidos, assim a Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 (PCK1) que participa de processos de gliconeogênese foi de igual maneira up-regulated, mas isto não é estritamente evidência de um aumento na utilização de glicose para a produção de energia (Atlas de Proteína Humana disponível a partir de <http://www.proteinatlas.org>; Uhlén et al., 2015). Já a Phosphofruktokinase (PFKL) também regulada positivamente pelo LA (Figura 6), cuja função é a transformação da β -D-frutose 6-fosfato em β -D-frutose 1.6-bisfosfato pode ser catalogada como uma enzima ligada à utilização da glicose como fonte de energia, mas usar este resultado para argumentar que o LA promove vias metabólicas para a oxidação da glicose em organismos aquáticos se faz especialmente difícil tendo em conta que dentro dessa revisão não foram observadas modificações na expressão da Piruvato Kinase L/R (PKLR), responsável pela transfosforilação do fosfoenolpiruvato em piruvato (Atlas de Proteína Humana disponível a partir de <http://www.proteinatlas.org>; Uhlén et al., 2015). Os dados referentes ao metabolismo de glicose em animais aquáticos suplementados com LA são bastante limitados em comparação à informação disponível acerca do efeito do LA no metabolismo de lipídios, no entanto explorar os efeitos do LA sobre o metabolismo da glicose e em geral de carboidratos pode derivar no desenvolvimento de estratégias nutricionais que integrem sinergicamente o LA com outros compostos ou nutrientes veiculados através a dieta com o intuito de melhorar o comportamento produtivo da espécie trabalhada (Santos et al., 2016). Se há evidência sobre o aumento da utilização de substratos energéticos para a produção de energia, dentre desta revisão não foram obtidos dados que vinculem a utilização de substratos energéticos com o aumento da carga

energética do adenilato (aumento de ATP), apesar disso, foi encontrado em fígado uma up-regulation (Figura 6) de Ubiquinol–cytochrome c reductase core protein II (UQCRC2) proteína do complexo III da cadeia transportadora de elétrons, a Cytochrome c oxidase subunit Vab hepatocyte (COX5A) proteína do complexo IV e a proteína ATP synthase mitochondrial F1 complex alpha subunit (ATP5H) parte da F1F0 ATPase também chamada de complexo V (Atlas de Proteína Humana disponível a partir de <http://www.proteinatlas.org>; Uhlén et al., 2015). As três são proteínas que participam na fosforilação de ADP para a produção de ATP a partir da oxidação de nucleotídeos reduzidos doadores de prótons. A up-regulation destas proteínas sugere um aumento na produção de ATP como efeito do LA, no entanto, as evidências em organismos aquáticos são escassas.

O mecanismo pelo qual o LA promove a expressão de vias metabólicas vinculadas a produção de energia pode estar relacionado com a via de sinalização SIRT1/LBK1/AMPK, já descrita anteriormente, adicionalmente o aumento nas concentrações de NAD⁺ que deveria em um primer momento produzir uma diminuição na atividade da cadeia transportadora de elétrons acompanhada do aumento das relações AMP:ATP e ADP:ATP, isto como já foi mencionado são estados que promovem a ativação da AMPK junto com fatores para a biogênese mitocondrial ou up-regulation de proteínas mitocondriais (Hardie et al., 2012).

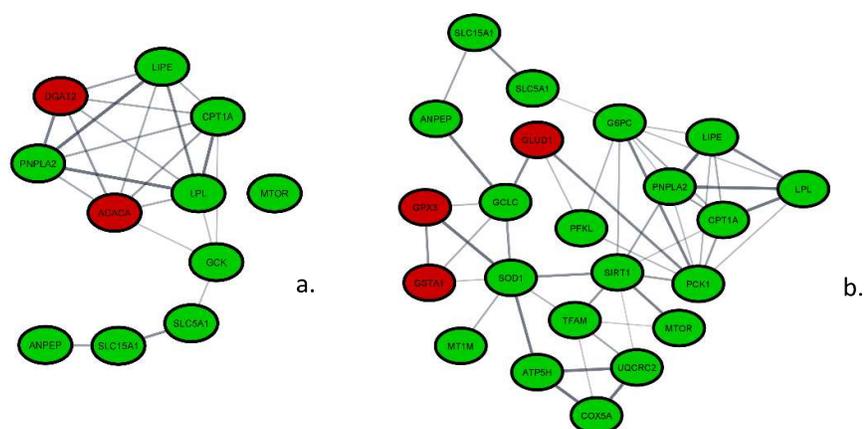


Figura 6 Análise de interação proteína-proteína em músculo e fígado. Os mapas representam o protein-protein interaction (PPI) das proteínas de expressão diferencial determinadas pelos coeficientes GLM. **a.** representar a expressão de diferentes proteínas musculares. **b.** representa a expressão de diferentes proteínas hepáticas. Proteínas down-regulated são indicadas em vermelho e as up-regulated em verde. Siglas Tabela 5.

3.6. Dieta e a interação com LA

Quanto à capacidade do LA de modular o uso de substratos para a produção de energia, as evidências apresentadas parecem ser contraditórias para modelos animais. No trabalho realizado com a espécie *Piaractus mesopotamicus* foi encontrada uma diminuição na concentração de aminoácidos livres no plasma, juntamente com um aumento nas concentrações de ornitina com suplementação de LA. A baixa proporção de arginina:ornitina indica, em princípio, um aumento na atividade do ciclo de ornitina e possivelmente um aumento da oxidação de aminoácidos como substrato energético (Terjesen et al., 2004). Apesar disso os resultados obtidos dentro o GLM2 e o Functional Annotation Clustering (Tabela 5, 6 e 7) sugerem que o LA promove o uso de ácidos graxos como principal fonte de energia, em contraposição aos resultados de Terjesen et al. (2004). Em concordância como os resultados obtidos nesta revisão, na espécie *Ctenopharyngodon idellus* (Shi et al., 2018), foi observada a diminuição na quantidade de lipídeo intraperitoneal junto com o aumento na eficiência proteica em animais suplementados com LA. Parece importante ressaltar que tanto *P. mesopotamicus* quanto *C. idellus* são espécies com hábitos alimentares semelhantes (herbívoros) e consideradas no FishBase dentro do nível trófico 2.0. No entanto, os níveis de proteína e lipídios nas dietas oferecidas para estas espécies foram consideravelmente diferentes. Para *P. mesopotamicus* foi de

aproximadamente 50 e 8%, enquanto para *C. idellus* foi de 33% e 5%. Adicionalmente, Park et al. (2006) utilizando a mesma dieta e espécie (*P. mesopotamicus*) de Terjesen et al. (2004), obtiveram diferenças numéricas no PER sem detectar diferenças estatísticas. Nesta revisão, os dados foram reanalisados por um teste t utilizando: a média, desvio padrão e n experimental dos grupos com e sem LA. Dessa forma, detectaram-se diferenças significativas com um $p < 0,0001$, sendo os animais suplementados com LA os que obtiveram a pior eficiência proteica. As evidências existentes sobre o requerimento proteico desta espécie mostram que a inclusão de 38% (já considerado nível supra ótimo) apresenta reduções significativas na eficiência e produtividade da proteína (Bicudo et al., 2010). Os autores sugerem como causa o aumento do uso da proteína como fonte de energia (Bicudo et al., 2010). Isso significaria que para os níveis de proteína na dieta usados nos trabalhos de Terjesen et al. (2004) e Park et al. (2006), já era de se esperar uma baixa eficiência protéica para síntese de tecido ou crescimento. Ainda assim o fato do LA ter acentuado esta situação é bastante interessante e contrasta com muitas das evidências existentes sobre o efeito deste composto (Kütter et al., 2012; Shi et al., 2018; Xu et al., 2018).

Portanto, é possível pensar que o "sparing effect" gerado pelo LA relatados para proteínas é um fenômeno dependente dos tipos de substratos energéticos disponíveis na dieta. A favor dessa ideia, Xu et al. (2019), em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas ricas em lipídios (12%) mostraram que o LA de maneira dose dependente aumenta a concentração de proteína corporal, um efeito que foi acompanhado pela diminuição do lipídio corporal. A tilápia GIFT, bem como as espécies *P. mesopotamicus* e *C. Idellus*. é um animal herbívoro e com o mesmo nível trófico (2.0) de acordo com FishBase, razão pela qual, igual a *C. idellus*, a quantidade de proteína oferecida na dieta está dentro de 30% de inclusão. No entanto, a tilápia GIFT zootecnicamente, foi superior ao controle não

suplementado com LA, enquanto para *C. idellus* (Shi et al., 2018), não foram encontradas diferenças significativas, talvez implicando que a resposta à tilápia GIFT é um produto sinérgico da suplementação com LA e alto teor lipídico (ou energético) para a espécie, na dieta. Isso pode ter permitido ao animal investir mais energia para o crescimento, proveniente do aumento da atividade catabólica devido ao efeito de LA (Hagen et al., 1999; Huang et al., 2020). No entanto o trabalho de Santos et al. (2016) usando a espécie *Cyprinus carpio* alimentada com dietas com altos conteúdos de energia mostra que apesar de existir a possibilidade de um “sparing effect” da proteína por sinergismos entre a quantidade de energia fornecida e a suplementação com LA isto não promove necessariamente um melhor desempenho, já que apesar dos altos conteúdos de energia na dieta, zootecnicamente estes animais se comportam pior do que o controle não suplementado com LA. Contudo a espécie *C. carpio* a diferencia da *P. mesopotamicus*, da *C. idellus* e da tilápia GIFT é um animal onívoro com um nível trófico de 3.1. No referente ao sparing effect da proteína, o GLM2 de proteínas fornece informações adicionais onde observou-se uma down-regulation significativa da proteína Glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1), que catalisa a transformação do glutamato em α -cetoglutarato um importante intermediário do ciclo de Krebs. O glutamato por sua parte é um aminoácido intermediário em processos de deaminação de diversos aminoácidos dentro do processo para a oxidação destes (Ip e Chew, 2010). Uma down-regulation da GLUT1 apontaria a uma diminuição na oxidação de aminoácidos o qual poderia derivar em uma maior eficiência da utilização da proteína para a síntese de tecido e crescimento (Ip and Chew, 2010; Latimer et al., 2019).

Como explicado acima, parece necessário aprofundar-se em como a composição da dieta pode modificar a resposta dos animais à suplementação com LA. Possivelmente o estudo dessas dinâmicas revele alguns potenciais usos de LA dentro da produção e no processo resolva as discrepâncias sobre seu efeito do LA a nível fisiológico e zootécnico. No

entanto, dentro da aquicultura qualquer composto que induza um sparing effect de proteínas, envolve aplicações em áreas inerentes à sustentabilidade da atividade, em relação à redução de efluentes ricos em compostos nitrogenados e à pressão de pesca para a obtenção da proteína utilizada em alimentos balanceados (Hua et al., 2019; Luo et al., 2018).

3.7.Efeito de LA no GSH

GSH é um tripeptídeo (γ -glutamyl-cysteinyl-glicina) e thiol não-proteico predominante em células e fluidos. Funcionalmente tem uma grande ingerência no equilíbrio celular redox, sua baixa capacidade de oxido-redução lhe confere uma alta atividade como uma molécula de doador de hidrogênio e protetor antioxidante da função enzimática e integridade proteica do citoesqueleto (Jones, 2002; Wu et al., 2004). Quando a GSH doa seus prótons é transformada em GSSG, fazendo da relação entre as concentrações dessas moléculas um indicador consideravelmente informativo do estado redox da célula ou organismo (Wu et al., 2004).

Dentro dos resultados do GLM2 de proteínas foi detectado um aumento da regulação do GCLC, isso explicaria consistentemente o aumento do GSH (Tabela 8; Figura 7), indicando que grande parte do efeito de LA como antioxidante poderia estar em sua capacidade de ativar caminhos de sinalização para a síntese de moléculas antioxidantes endógenas. A expressão GCLC é promovida por fatores de transcrição, como o Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) que promove a expressão dos antioxidants response elements (ARE) (Zhang et al., 2017). Nrf2 está ligado à proteína Kelch Like ECH Associated Protein 1 (Keap1), no entanto sua função depende da dissociação deste complexo, isso normalmente acontece na presença de substâncias eletrofílicas ou pró-oxidantes que modificam os resíduos de cisteína de Keap1 inativando-a e causando a

liberação de Nrf2 (Lehman-McKeeman, 2013). A liberação do Nrf2 também pode ser promovida por fosforilação de seu resíduo de serina-40 (Joo et al., 2016). Paradigmaticamente, a AMPK entre outras quinases tem a capacidade de fosforilar a Nrf2 esperando-se então, que uma maior atividade de AMPK deva favorecer o acúmulo de Nrf2 no núcleo com uma conseqüente transcrição de genes como o que codifica a GCLC (Joo et al., 2016).

Existem vários fatores que podem modular as concentrações de GSH e sua relação com a concentração de GSSG. NADPH e a Glutathione reductase (GR), são moléculas que, juntas, têm a capacidade de retornar o GSSG ao seu estado reduzido (Espinosa-Diez et al., 2015). O estado oxidado do GSH deve-se, em parte, à ação de enzimas antioxidantes que a utilizam como substrato doador de hidrogênio. Enzimas da família GPx são exemplos disso (Ming et al., 2019; Shao et al., 2014). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que proteínas da família GPx (GPX3) foram reguladas negativamente, apontando à capacidade do LA de favorecer um estado mais reduzido ao nível tecidual, pelo menos para músculo e fígado (Tabela 5; Figura 6). O GSH também desempenha um papel importante nos processos de desintoxicação, ajudando a enzima GST a excretar compostos xenobióticos. Neste caso, o GSH liga-se de maneira não reversível a xenobióticos ou toxinas endógenas (Gonçalves-Soares et al., 2012; Wu et al., 2004).

Tabela 8. Resultados GLM2 metabólitos. O modelo resulta em cada órgão aninhado pelo comportamento alimentar e, ao mesmo tempo, aninhado pelo parâmetro avaliado, β são o modelo de coeficientes com seu erro padrão SE. χ^2 são valores χ^2 calculados com o teste de Wald. Sig, contém os valores p dos coeficientes < 0.05.

Parameter	Diet	Organ	β	SE	χ^2	Sig.
As	Omnivore	Gill	-8.E-03	4.E-03	5.E+00	0.027
Carbonyl	Carnivore	Liver	-7.E-03	4.E-03	4.E+00	0.049
Free iron	Carnivore	Liver	2.E-02	4.E-03	3.E+01	0.000
GSH	Carnivore	Brain	7.E-03	3.E-03	5.E+00	0.025
GSH	Carnivore	Liver	1.E-03	6.E-04	5.E+00	0.025
GSH	Herbivore	Liver	3.E-04	7.E-05	2.E+01	0.000
GSH	Omnivore	Liver	8.E-03	3.E-03	9.E+00	0.003
GSH	Carnivore	Muscle	2.E-03	6.E-04	8.E+00	0.005
Lactate	Omnivore	Muscle	1.E-02	4.E-03	9.E+00	0.003
MDA	Carnivore	Gill	-2.E-04	1.E-04	5.E+00	0.032
MDA	Omnivore	Gill	-1.E-03	6.E-04	5.E+00	0.022
MDA	Carnivore	Muscle	-1.E-03	2.E-04	1.E+01	0.000
MDA	Omnivore	Muscle	-6.E-03	2.E-03	7.E+00	0.010

Considerando que a expressão e a atividade da proteína GST foi down-regulated no fígado de onívoros e brânquia de carnívoros de acordo com o modelo GLM2 (Tabela 5) é possível pensar que a diminuição na produção de toxinas como MDA (Tabela 8; Figura 7), atenua a necessidade da expressão e atividade da GST (Jones, 2002; Koç et al., 2002).

3.8.Promoção da atividade SOD

Quanto ao comportamento de outras proteínas com função antioxidante, está a Superoxide dismutase 2 (SOD2) ou MnSOD (Tabela 5). proteína mitocondrial está envolvida principalmente na desmutação de $O_2 \cdot^-$ produzido pela atividade da fosforilação oxidativa, a up-regulation evidenciada neste trabalho pode indicar um aumento no potencial

metabólico das mitocôndrias com a adição de LA. Existem evidências que a expressão da SIRT3, também pode aumentar a atividade de MnSOD devido à desacetilação do gene *sod2*, diante a evidência da ativação SIRT3 segundo o GLM2, expressão da MnSOD é como mínimo um efeito já esperado para esta revisão (Valdecantos et al., 2019; Xu et al., 2020).

Sobre a up-regulation da (Tabela 5; Figura 6) Superoxide dismutase 1 (SOD1) ou Cu/ZnSOD, há evidências de que a sua expressão pode ser promovida pela expressão de peroxisome proliferator responsive elements (PPRE) que codificam para a síntese do fator de transcrição ELK1 capaz de se vincular à upstream region do gene *sod1*, promovendo sua expressão. PPRE, por sua vez, é ativado pela sinalização de peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) intimamente relacionados à atividade da AMPK e a β -oxidação de ácidos graxos. Devido à regulação do metabolismo lipídico identificado no fígado, é possível pensar que a expressão de Cu/ZnSOD neste caso é apenas um reflexo da atividade catalítica dos lipídios, conforme indicado pelos clusters 1 e 2 do Functional Annotation Clustering (Tabela 6-7) (Latruffe e Vamecq, 1997; Miao e St. Clair, 2009; Wang et al., 2010).

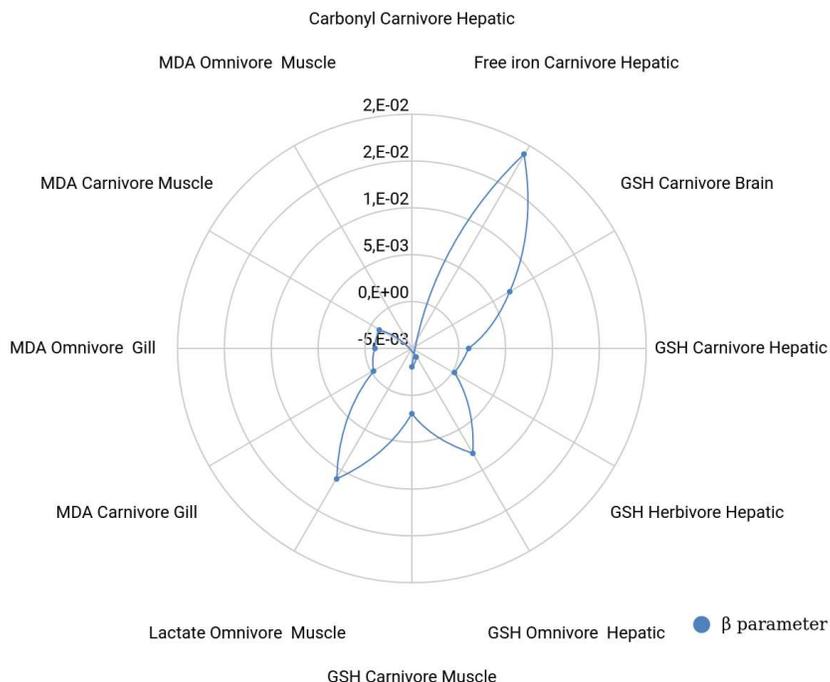


Figura 7 Metabólitos do modelo GLM. Este gráfico representa a resposta da concentração de metabólitos teciduais ao tratamento de LA. Coeficientes GLM, coloridos em vermelho. Os números negros representam a escala do gráfico.

3.9. Peroxidação lipídica o potencial de LA

O malondialdeído (MDA) avaliado em muitos dos artigos selecionados (Material Suplementar 1). É um aldeído gerado a partir de radicais lipídicos, o qual liga-se ao ácido tiobarbitúrico resultando em um pigmento rosa que pode ser quantificado colorimetricamente (Halliwell et al., 1993). Este marcador de dano oxidativo lipídico teve uma aparente queda em função da suplementação com LA em brânquias e músculo, tanto para espécies carnívoras quanto onívoras (Tabela 8; Figura 7). Para espécies herbívoras, embora existam dados disponíveis do hepatopâncreas do molusco *Haliotis discus hannai* as diferenças obtidas não foram significativas.

Dentro do contexto produtivo, a peroxidação lipídica no músculo representa uma diminuição na qualidade da nutrição do filé pela desnaturação dos PUFAs, que geralmente é acompanhada por uma degradação das características organolépticas do filé, causando mau gosto, mau cheiro, alterações na textura, entre outras, levando a uma diminuição do tempo máximo de prateleira, em detrimento da econômica do setor (Ali et al., 2019), por conseguinte a utilização do LA como suplemento na dieta deveria se apresentar como uma alternativa para a preservação da qualidade de produtos cárneos provenientes da aquicultura.

3.10. Antioxidantes na produção de carne

Diante os possíveis efeitos dos processos oxidativos, tem sido testadas estratégias alimentares a nível experimental para evitar danos oxidativos teciduais especificamente em músculos ou na oxidação que ocorre em qualquer das fases transitórias para a formação de carne (post-mortem ou apoptose, rigor mortis e tenderização) nas que ocorre uma alta formação ROS (Kjærsgård et al., 2006). Na indústria avícola e principalmente no laboratório, tem sido testada a inclusão de antioxidantes sintéticos e naturais na dieta dos animais, visando reduzir os efeitos negativos dos ROS e metabólitos derivados, sobre o bem-estar animal e a qualidade da carne. Antioxidantes como α -tocoferol, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene e selênio oferecidos na dieta têm se mostrado capazes de conter ou pelo menos retardar a peroxidação lipídica interceptando radicais livres acumulados ou gerados em vários tecidos corporais *in vivo* e *post-mortem* (Concarr et al., 2021; Salami et al., 2015; Surai, 2019; Surak et al., 1977). Igualmente o LA tem sido usado de maneira recorrente isolado ou em combinação com outros antioxidantes. El-Senousey et al. (2013) relata que a inclusão de LA na dieta em frangos de corte, aumentou o pH post-mortem da carne, bem como diminuiu a perda de umidade. Isso

apontando fortemente a uma melhora na estabilidade da proteína e suas características hidrofílicas. No entanto, apesar de não ter apresentado melhoras na maciez da carne, foi evidenciado uma diminuição na concentração de colágeno tecidual o qual se relaciona diretamente com este parâmetro, fornecendo à matriz extracelular de rigidez e estabilidade (Weston et al., 2002).

LA em combinação com outros antioxidantes, por exemplo, associado com α -tocopherol além de realizar sua função antioxidante também é capaz de restaurar α -tocopherol oxidado, permitindo-lhes agir em conjunto, principalmente para a proteção do PUFA presente em membranas celulares e subcelulares (Khan et al., 2015; Parveen et al., 2013; Salami et al., 2015).

3.11. Antioxidantes na produção de aquicultura

O uso de antioxidantes como método de degradação oxidativa preventiva de produtos à carne não se limita apenas à indústria avícola. Na aquicultura essa prática tem especial importância devido ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) que estão presentes na carne de peixe. Por causa disso, o uso de uma grande variedade de antioxidantes de várias fontes tem sido uma prática cada vez mais difundida, muitas vezes recorrendo a fontes naturais, como ervas ricas em polifenóis, como antocianinas (Jomeh et al., 2021). É comum o uso de aditivos antioxidantes na dieta principalmente α -tocopherol, devido à sua eficácia comprovada na estabilização e manutenção da qualidade do peixe por mais tempo (Suárez-Jiménez et al., 2016). O ácido ascórbico também é um composto amplamente utilizado (Francis et al., 2012; Park et al., 2006; B. F. Terjesen et al., 2004), embora sua eficácia pareça ser menor à do α -tocopherol, provavelmente, por ser este último mais efetivo na diminuição da peroxidação lipídica e produção de MDA.

Além disso, assim como em aves também na aquicultura há experiências com o uso de LA em conjunto com outros antioxidantes. O LA em conjunto com o ácido ascórbico parece uma opção viável, onde o LA em seu estado reduzido (ácido dihidrolipoico) cria as condições necessárias para a ciclagem do ácido ascórbico, quando este encontra-se no seu estado radicado por ação de compostos pro-oxidantes. Experiências com LA e ácido ascórbico corroboram que esse fenômeno pode preservar parcialmente os níveis de ácido ascórbico ao nível do tecido na espécie *P. mesopotamicus*, quando uma dieta desprovida deste composto é fornecida (Park et al., 2006; Terjesen et al., 2004). Assim é possível concluir que o uso de compostos bioativos, no caso antioxidantes como o LA apresentam resultados positivos na conservação da saúde animal e na qualidade dos produtos cárneos.

4. Conclusões e considerações finais

Os efeitos fisiológicos do LA aparentam transcender às potenciais melhorias na qualidade do produto e preservação deste por mais tempo, apesar disso, a parcialização da aquicultura e da pecuária em geral, para a prevalência de resultados zootécnicos sobre outros tipos de resultados pode ser uma barreira difícil de superar para o uso de LA como aditivo. Como já evidenciado neste trabalho, LA pode ter um impacto indesejado no desenvolvimento e crescimento dos animais, aspecto que para um produtor se traduz em prejuízo à viabilidade econômica de seu empreendimento. No entanto, as desvantagens apresentadas por LA, parecem ser mais devido a uma perturbação da homeostase energética, onde uma excessiva regulação dos processos catabólicos apresenta-se em detrimento da estocagem de reservas lipídicas. Essas reservas energéticas, que constituem também o peso vivo dos animais, diminuem significativamente em detrimento dos parâmetros relacionados ao crescimento e ganho de massa corporal. Em síntese, o problema de LA não está diretamente ligado à diminuição do crescimento dos animais, mas à diminuição do teor lipídico no corpo. Xu et

al. (2019), como já mencionado, mostrou como dietas com alto teor lipídico podem compensar os efeitos anoréxigênicos de LA com efeitos positivos sobre o crescimento (peso corporal e SGR) em tilápia GIFT. Mais evidências precisam ser geradas sobre como LA interage com a genética e o ambiente produtivo dos animais. De acordo com os dados disponíveis, não é possível fazer uma generalização realista sobre o efeito zootécnico de LA em animais aquáticos, uma vez que sob certos fatores inerentes à espécie, linhagem e dieta, LA se comporta de forma diferente. O trabalho de Xu et al. (2018) é um bom exemplo de como LA pode produzir respostas discrepantes em função a vários fatores que atuam como covariáveis dentro das respostas fisiológicas e zootécnicas procuradas. Utilizando duas inclusões lipídicas, uma do 7% (normal para a espécie) e outra de 13% (alta inclusão) e utilizando duas concentrações de LA (700 e 1400 mg Kg⁻¹) na dieta, constataram que o caranguejo *Eriocheir sinensis* apresentou maiores valores de SGR em função da concentração de LA e independente do teor de inclusão lipídica na dieta. Devido a que nenhuma das variáveis levadas em conta para esta revisão conseguiu explicar esse fenômeno estatisticamente, é possível que os resultados deste trabalho sejam o reflexo de algumas particularidades da espécie, que interagem positivamente com a adição de LA. Da mesma forma no peixe *Osphronemus goramy* foi encontrado um aumento da SGR em todas as concentrações utilizadas de LA na dieta (300, 600, e 900 mg Kg⁻¹), estimando-se uma suplementação ótima para promover a SGR de 550 mg Kg⁻¹ (Samuki et al., 2021). Este é um fenômeno que deve ser explorado para futuras pesquisas tendo em conta o fato que dentro dessa revisão a proteína mechanistic target of rapamycin (mTOR) foi up-regulated em musculo e fígado (Tabela 5). A expressão desta proteína, vincula-se estritamente com o anabolismo e crescimento, sendo um indício não sutil de possíveis benefícios do LA no crescimento, provavelmente, em determinados contextos ambientais ou genéticos (Huang et al., 2020; Shi et al., 2018).

Considerando a ideia de que a resposta à suplementação com LA pode ser melhorada com o aumento do aporte energético na dieta, é importante explorar o efeito de outros substratos energéticos além de ácidos graxos. Fontes de energia comparativamente mais baratas do que o lipídeo, como corpos cetônicos (acetoacetato e β -hidroxibutirato) ou acetato podem ser uma alternativa viável suplementados junto com o LA, estes são produtos derivados da β -oxidação de lipídios, são principalmente produzidos em fígado e rim, de onde saem transportados pelo sangue para serem oxidados em outros tecidos, contudo, quando o balanço energético da célula o tecido é favorável estes compostos podem participar ativamente como substratos em processos lipogênicos (Holtenius e Holtenius, 1996; Moffett et al., 2020). Em síntese os corpos cetônicos e o acetato podem suprir a demanda por substratos energéticos para a síntese de ATP ao tempo que amortizam a perda de reservas lipídicas seja por um potencial sparing effect do lipídeo ou pela síntese de novo deste. Dentro da informação consultada não se encontraram referências sobre o uso de corpos cetônicos em organismos aquáticos ou em outros animais, no entanto, em indivíduos da espécie *Danio rerio* alimentados com dietas suplementadas com 0,15% de acetato de sódio observou-se melhoras no ganho de peso, consumo de alimento, deposição de gordura e eficiência energética, assim como a atividade da enzima amilase (Zhang et al., 2020). Adicionalmente o aumento no consumo de alimento viu-se explicado pela ativação de genes orexígenos em cérebro, sugerindo um controle do apetite através do sistema nervoso parassintético (Zhang et al., 2020). Diante da possibilidade de usar o LA como antioxidante e promotor da qualidade do produto cárneo ofertado, é recomendável testar a possibilidade de adicionar fontes de energia a baixo custo (ou que apresentem um custo/benefício baixo) para melhorar a resposta zootécnica dos animais em sinergismo com os benefícios provados do LA.

Referências

Ajewole, V.B., Cox, J.E., Swan, J.T., Chikermane, S.G., Lamoth, B., Iso, T., Okolo, L.O., Ford, C.L., Schneider, A.M., Hobaugh, E.C., Baker, K.R., 2020. Incidence of chemotherapy-induced peripheral neuropathy within 12 weeks of starting neurotoxic chemotherapy for multiple myeloma or lymphoma: a prospective, single-center, observational study. *Supportive Care in Cancer* 28, 1901–1912. doi:10.1007/s00520-019-05006-6

Ali, M., Imran, M., Nadeem, M., Khan, M.K., Sohaib, M., Suleria, H.A.R., Bashir, R., 2019. Oxidative stability and Sensoric acceptability of functional fish meat product supplemented with plant – based polyphenolic optimal extracts. *Lipids in Health and Disease* 2019 18:1 18, 1–16. doi:10.1186/S12944-019-0982-Y

Amado, L.L., Garcia, M.L., Pereira, T.C.B., Yunes, J.S., Bogo, M.R., Monserrat, J.M., 2011. Chemoprotection of lipoic acid against microcystin-induced toxicosis in common carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 154, 146–153. doi:10.1016/j.cbpc.2011.04.007

Amen, D.G., Wu, J.C., Taylor, D., Willeumier, K., 2011. Reversing brain damage in former NFL players: Implications for traumatic brain injury and substance abuse rehabilitation. *Journal of Psychoactive Drugs* 43, 1–5. doi:10.1080/02791072.2011.566489

Arend, A., Zilmer, M., Vihalemm, T., Selstam, G., Sepp, E., 2000. Lipoic acid prevents suppression of connective tissue proliferation in the rat liver induced by n-3 PUFAs: A pilot study. *Annals of Nutrition and Metabolism* 44, 217–222. doi:10.1159/000046687

Arshad, M.S., Anjum, F.M., Khan, M.I., Shahid, M., 2013a. Wheat Germ Oil and α -Lipoic Acid Predominantly Improve the Lipid Profile of Broiler Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 11158–11165. doi:10.1021/JF4041029

Arshad, M.S., Anjum, F.M., Khan, M.I., Shahid, M., Akhtar, S., Sohaib, M., 2013b. Wheat germ oil enrichment in broiler feed with α -lipoic acid to enhance the antioxidant potential and lipid stability of meat. *Lipids in Health and Disease* 12, 1–14. doi:10.1186/1476-511X-12-164

Baydas, G., Yilmaz, O., Celik, S., Yasar, A., Gursu, M.F., 2002. Effects of certain micronutrients and melatonin on plasma lipid, lipid peroxidation, and homocysteine levels in rats. *Archives of Medical Research* 33, 515–519. doi:10.1016/S0188-4409(02)00414-9

Bengmark, S., Kotzampassi, K., 2009. Nutrition of the septic patients. *Surgical Chronicles* 14, 13–21.

Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P., 2010. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. *Aquaculture Nutrition* 16, 213–222. doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00653.x

Biewenga, G.P., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 1997. The pharmacology of the antioxidant: Lipoic acid. *General Pharmacology*. doi:10.1016/S0306-3623(96)00474-0

Bou, M., Østbye, T.-K., Berge, G.M., Ruyter, B., 2017. EPA, DHA, and Lipoic Acid Differentially Modulate the n-3 Fatty Acid Biosynthetic Pathway in Atlantic Salmon Hepatocytes. *Lipids* 2017 52:3 52, 265–283. doi:10.1007/S11745-017-4234-5

Brown, W.D., Tappel, A.L., 1959. Fatty acid oxidation by carp liver mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics 85, 149–158. doi:10.1016/0003-9861(59)90458-8

Camiolo, G., Tibullo, D., Giallongo, C., Romano, A., Parrinello, N.L., Musumeci, G., Di Rosa, M., Vicario, N., Brundo, M. V, Amenta, F., Ferrante, M., Copat, C., Avola, R., Li Volti, G., Salvaggio, A., Di Raimondo, F., Palumbo, G.A., 2019. α -lipoic acid reduces iron-induced toxicity and oxidative stress in a model of iron overload. International Journal of Molecular Sciences 20. doi:10.3390/ijms20030609

Carocci, A., Rovito, N., Sinicropi, M.S., Genchi, G., 2014. Mercury toxicity and neurodegenerative effects. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 229, 1–18. doi:10.1007/978-3-319-03777-6_1

Cheeseman, K.H., 1993. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. Molecular Aspects of Medicine 14, 191–197. doi:10.1016/0098-2997(93)90005-X

Ciardello, M.A., Camardella, L., Carratore, V., Di Prisco, G., 2000. L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*: Primary structure, function and thermodynamic characterization: relationship with cold adaptation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 1543, 11–23. doi:10.1016/S0167-4838(00)00186-2

Concarr, M.J., O'Rourke, R., Murphy, R.A., 2021. The effect of copper source on the stability and activity of α -tocopherol acetate, butylated hydroxytoulene and phytase. SN Applied Sciences 2021 3:5 3, 1–11. doi:10.1007/S42452-021-04563-Y

da Silva Martins, Á.C., Artigas Flores, J., Porto, C., Romano, L.A., Wasielesky Junior, W., Caldas, S.S., Primel, E.G., Kulkamp-Guerreiro, I., Monserrat, J.M., 2018. Antioxidant

effects of nanoencapsulated lipoic acid in tissues and on the immune condition in haemolymph of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Nutrition* 24, 1255–1262. doi:10.1111/anu.12663

da Silva Martins, Á.C., Flores, J.A., Junior, W.W., Zanette, J., Primel, E.G., Caldas, S.S., Monserrat, J.M., 2014. Modulation of antioxidant and detoxification responses induced by lipoic acid in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) subjected to hypoxia and re-oxygenation. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 47, 335–348. doi:10.1080/10236244.2014.940702

Das, U.N., 1999. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 61, 157–163. doi:10.1054/plef.1999.0085

Davidson, E.P., Coppey, L.J., Shevalye, H., Obrosof, A., Kardon, R.H., Yorek, M.A., 2017. Impaired corneal sensation and nerve loss in a type 2 rat model of chronic diabetes is reversible with combination therapy of menhaden oil, α -lipoic acid, and enalapril. *Cornea* 36, 725–731. doi:10.1097/ICO.0000000000001182

Davidson, E.P., Holmes, A., Coppey, L.J., Yorek, M.A., 2015. Effect of combination therapy consisting of enalapril, α -lipoic acid, and menhaden oil on diabetic neuropathy in a high fat/low dose streptozotocin treated rat. *European Journal of Pharmacology* 765, 258–267. doi:10.1016/j.ejphar.2015.08.015

de La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Gatellier, P., 2018. Oxidation and nitrosation of meat proteins under gastro-intestinal conditions: Consequences in terms of nutritional and health values of meat. *Food Chemistry* 243, 295–304. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.135

de Medeiros, A.C.L., Segura, J.G., de Oliveira, K.R.B., Sussel, F.R., de Oliveira, R.H.F., Viegas, E.M.M., 2017. Growth performance and chemical composition of pacus (*Piaractus mesopotamicus*) fed with vegetable oil sources and alpha-lipoic ACID [Desempenho produtivo e composição química de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com óleos vegetais e ácido alfa-lipoico]. Boletim do Instituto de Pesca 43, 74–84. doi:10.20950/1678-2305.2017.74.84

de Oliveira Lobato, R., Cruz, L.C., Josende, M.E., Tavares, P.B., Wasielesky, W., Maciel, F.E., Ventura-Lima, J., 2018. Lipoic acid modulates energetic metabolism and antioxidant defense systems in *Litopenaeus vannamei* under hypoxia/reoxygenation conditions. Aquaculture 497, 396–404. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.08.020

Dominguez J.M., I.I., Yorek, M.A., Grant, M.B., 2015. Combination therapies prevent the neuropathic, proinflammatory characteristics of bone marrow in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes 64, 643–653. doi:10.2337/db14-0433

El-Senousey, H.K., Fouad, A.M., Yao, J.H., Zhang, Z.G., Shen, Q.W., 2013. Dietary alpha lipoic acid improves body composition, meat quality and decreases collagen content in muscle of broiler chickens. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 26, 394–400. doi:10.5713/ajas.2012.12430

Enamorado, A.D., Martins, A.C., Flores, J.A., Tesser, M.B., Caldas, S.S., Primel, E.G., Monserrat, J.M., 2015. Biochemical responses over time in common carp *Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) during fed supplementation with α -lipoic acid. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 188, 9–16. doi:10.1016/J.CBPA.2015.05.023

Ente, G., 2000. Alternative medicine: An update, number 7. Children's Hospital Quarterly 11, 155–159.

Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*. doi:10.1016/j.redox.2015.07.008

Estévez, M., 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*. doi:10.1016/j.meatsci.2011.04.025

Evans, J.L., Youngren, J.F., Goldfine, I.D., 2004. Effective treatments for insulin resistance: Trim the fat and douse the fire. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 425–431. doi:10.1016/j.tem.2004.09.005

Francis, S., Delgoda, R., Young, R., 2012. Effects of embryonic exposure to α -lipoic acid or ascorbic acid on hatching rate and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Research* 43, 777–788. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02889.x

Giustina, A.D., de Souza Goldim, M.P., Danielski, L.G., Garbossa, L., Junior, A.N.O., Cidreira, T., Denicol, T., Bonfante, S., da Rosa, N., Fortunato, J.J., Palandi, J., de Oliveira, B.H., Martins, D.F., Bobinski, F., Garcez, M., Bellettini-Santos, T., Budni, J., Colpo, G., Scaini, G., Giridharan, V. V, Barichello, T., Petronilho, F., 2020. Lipoic Acid and Fish Oil Combination Potentiates Neuroinflammation and Oxidative Stress Regulation and Prevents Cognitive Decline of Rats After Sepsis. *Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s12035-020-02032-y

Golbidi, S., Badran, M., Laher, I., 2011. Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in Pharmacology* 2 NOV. doi:10.3389/fphar.2011.00069

Gonçalves-Soares, D., Zanette, J., Yunes, J.S., Yepiz-Plascencia, G.M., Bainy, A.C.D., 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp

Litopenaeus vannamei inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. *Marine Environmental Research* 75, 54–61. doi:10.1016/j.marenvres.2011.07.007

Gorąca, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., Skibska, B., 2011. Lipoic acid - Biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. doi:10.1016/S1734-1140(11)70600-4

Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C.M., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, B.N., 1999. (R)- α -Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *The FASEB Journal* 13, 411–418. doi:10.1096/fasebj.13.2.411

Hall, J.A., MacLeay, J., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Schiefelbein, H., Paetau-Robinson, I., Jewell, D.E., 2016a. Positive impact of nutritional interventions on serum symmetric dimethylarginine and creatinine concentrations in client-owned geriatric dogs. *PLoS ONE* 11. doi:10.1371/journal.pone.0153653

Hall, J.A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Panickar, K.S., Bobe, G., Jewell, D.E., 2016b. Nutritional interventions that slow the age-associated decline in renal function in a canine geriatric model for elderly humans. *Journal of Nutrition, Health and Aging* 20, 1010–1023. doi:10.1007/s12603-015-0636-3

Halliwell, B., Chirico, S., Crawford, M.A., Bjerve, K.S., Gey, K.F., 1993. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance, in: *American Journal of Clinical Nutrition*. Oxford Academic, pp. 715S-725S. doi:10.1093/ajcn/57.5.715S

Han, T., Bai, J., Liu, W., Hu, Y., 2012. Therapy of endocrine disease: A systematic review and meta-analysis of α -lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. *European Journal of Endocrinology* 167, 465–471. doi:10.1530/EJE-12-0555

Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/nrm3311

Hiltunen, J.K., Autio, K.J., Schonauer, M.S., Kursu, V.A.S., Dieckmann, C.L., Kastaniotis, A.J., 2010. Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. doi:10.1016/j.bbabi.2010.03.006

Houston, M.C., 2011. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. *Journal of Clinical Hypertension* 13, 621–627. doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00489.x

Hua, K., Cobcroft, J.M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D.R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M.J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J.M., 2019. The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*. doi:10.1016/j.oneear.2019.10.018

Huang, C. C., Sun, J., Ji, H., Oku, H., Chang, Z.-G., Tian, J.-J., Yu, E.-M., Xie, J., 2019. Influence of dietary alpha-lipoic acid and lipid level on the growth performance, food intake and gene expression of peripheral appetite regulating factors in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 505, 412–422. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.02.054

Huang, C. C., Sun, J., Ji, H., Kaneko, G., Xie, X., Chang, Z., Deng, W., 2020. Systemic effect of dietary lipid levels and α -lipoic acid supplementation on nutritional metabolism in zebrafish (*Danio rerio*): focusing on the transcriptional level. *Fish Physiology and Biochemistry* 2020 46:5 46, 1631–1644. doi:10.1007/S10695-020-00795-8

- Huang, D., Lei, Y., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, W., Mai, K., 2019. Protective effects of dietary α -lipoic acid on abalone *Haliotis discus hannai* against the oxidative damage under waterborne cadmium stress. *Aquaculture Nutrition* 25, 263–270. doi:10.1111/ANU.12849
- Huang, Z., Zeng, S., Xiong, J., Hou, D., Zhou, R., Xing, C., Wei, D., Deng, X., Yu, L., Wang, H., Deng, Z., Weng, S., Kriengkrai, S., Ning, D., Zhou, J., He, J., 2020. Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. *Microbiome* 8. doi:10.1186/s40168-020-00802-3
- Huergo, L.F., Araújo, G.A.T., Santos, A.S.R., Gerhardt, E.C.M., Pedrosa, F.O., Souza, E.M., Forchhammer, K., 2020. The NADP-dependent malic enzyme MaeB is a central metabolic hub controlled by the acetyl-CoA to CoASH ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1868, 140462. doi:10.1016/J.BBAPAP.2020.140462
- Ide, T., 2018. Physiological activities of the combination of fish oil and α -lipoic acid affecting hepatic lipogenesis and parameters related to oxidative stress in rats. *European Journal of Nutrition* 57, 1545–1561. doi:10.1007/s00394-017-1440-0
- İnanan, B.E., Kanyılmaz, M., 2020. Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress, viability and motility in the common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after short-term storage and cryopreservation. *Cryobiology* 94, 73–79. doi:10.1016/J.CRYOBIOL.2020.04.006
- Jain, A.P., Aggarwal, K.K., Zhang, P.-Y., 2015. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19, 441–445.
- Jayakar, S.S., Singhal, R.S., 2013. Kinetic modeling and scale up of lipoic acid (LA) production from *Saccharomyces cerevisiae* in a stirred tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36, 1063–1070. doi:10.1007/s00449-012-0859-1

- Jiménez-Lamana, J., Slaveykova, V.I., 2016. Silver nanoparticle behaviour in lake water depends on their surface coating. *Science of the Total Environment* 573, 946–953. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.181
- Jomeh, R., Chitsaz, H., Akrami, R., 2021. Effect of anthocyanin extract from Roselle, *Hibiscus sabdariffa*, calyx on haematological, biochemical, and immunological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research* 52, 3736–3744. doi:10.1111/ARE.15218
- Jones, D.P., 2002. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods in Enzymology* 348, 93–112. doi:10.1016/S0076-6879(02)48630-2
- Joo, M.S., Kim, W.D., Lee, K.Y., Kim, J.H., Koo, J.H., Kim, S.G., 2016. AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Molecular and Cellular Biology* 36, 1931–1942. doi:10.1128/MCB.00118-16
- Kaki, S.S., Grey, C., Adlercreutz, P., 2012. Bioorganic synthesis, characterization and antioxidant activity of esters of natural phenolics and α -lipoic acid. *Journal of Biotechnology* 157, 344–349. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.11.012
- Karaytug, S., Sevgiler, Y., Karayakar, F., 2014. Comparison of the protective effects of antioxidant compounds in the liver and kidney of Cd- and Cr-exposed common carp. *Environmental Toxicology* 29, 129–137. doi:10.1002/tox.20779
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., Uyeda, K., 2002. Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription: Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 3829–3835. doi:10.1074/jbc.M107895200

Khan, M.I., Shehzad, K., Arshad, M.S., Sahar, A., Shabbir, M.A., Saeed, M., 2015. Impact of dietary α -lipoic acid on antioxidant potential of broiler thigh meat. *Journal of Chemistry* 2015. doi:10.1155/2015/406894

Kim, J.H., Park, H.J., Kim, K.W., Hwang, I.K., Kim, D.H., Oh, C.W., Lee, J.S., Kang, J.C., 2017. Growth performance, oxidative stress, and non-specific immune responses in juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria*, by changes of water temperature and salinity. *Fish Physiology and Biochemistry* 43, 1421–1431. doi:10.1007/s10695-017-0382-z

Kim, M.S., Park, J.Y., Namkoong, C., Jang, P.G., Ryu, J.W., Song, H.S., Yun, J.Y., Namgoong, I.S., Ha, J., Park, I.S., Lee, I.K., Viollet, B., Youn, J.H., Lee, H.K., Lee, K.U., 2004. Anti-obesity effects of α -lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 10, 727–733. doi:10.1038/nm1061

Kjærsgård, I.V.H., Nørrelykke, M.R., Caroline P. Baron, A., Jessen, F., 2006. Identification of Carbonylated Protein in Frozen Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets and Development of Protein Oxidation during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9437–9446. doi:10.1021/JF061885M

Koç, O.N., Zielse, S.P., Roth, J.C., Reese, J.S., Gerson, S.L., 2002. Transfer of Drug-Resistance Genes into Hematopoietic Progenitors, in: *Gene Therapy of Cancer*. Elsevier, pp. 341–354. doi:10.1016/b978-012437551-2/50022-7

Koh, E.H., Lee, W.J., Lee, S.A., Kim, E.H., Cho, E.H., Jeong, E., Kim, D.W., Kim, M.S., Park, J.Y., Park, K.G., Lee, H.J., Lee, I.K., Lim, S., Jang, H.C., Lee, K.H., Lee, K.U., 2011. Effects of alpha-lipoic acid on body weight in obese subjects. *American Journal of Medicine* 124, 85.e1-85.e8. doi:10.1016/j.amjmed.2010.08.005

Kowluru, R.A., Zhong, Q., Santos, J.M., Thandampallayam, M., Putt, D., Gierhart, D.L., 2014. Beneficial effects of the nutritional supplements on the development of diabetic retinopathy. *Nutrition and Metabolism* 11. doi:10.1186/1743-7075-11-8

Kunimitsu, K., Tomoharu, S., Makoto M, W., Fujio, S., Hiroyasu, I., 1993. Thioic O-acid ester in sulfolipid isolated from freshwater picoplankton cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* 1169, 39–45. doi:10.1016/0005-2760(93)90079-O

Kütter, M.T., Monserrat, J.M., Primel, E.G., Caldas, S.S., Tesser, M.B., 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture* 368–369, 29–35. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2012.09.010

Kütter, M.T., Monserrat, J.M., Santos, R.A., Tesser, M.B., 2013. Dose-response effects of the antioxidant α -lipoic acid in the liver and brain of pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1123–1128. doi:10.1111/jai.12137

Kütter, M.T., Romano, L.A., Ventura-Lima, J., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2014. Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 162, 70–76. doi:10.1016/J.CBPC.2014.03.008

Latruffe, N., Vamecq, J., 1997. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 79, 81–94. doi:10.1016/S0300-9084(97)81496-4

Lehman-McKeeman, L.D., 2013. Biochemical and Molecular Basis of Toxicity, in: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. Academic Press, pp. 15–38. doi:10.1016/B978-0-12-415759-0.00001-7

Leyva-López, N., Lizárraga-Velázquez, C.E., Hernández, C., Sánchez-Gutiérrez, E.Y., 2020. Exploitation of agro-industrial waste as potential source of bioactive compounds for aquaculture. *Foods*. doi:10.3390/foods9070843

Li, X., Li, Z., Liu, J., Murphy, B.R., 2012. Growth, precocity, enzyme activity and chemical composition of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, fed different dietary protein-to-energy ratio diets. *Aquaculture Research* 43, 1719–1728. doi:10.1111/J.1365-2109.2011.02981.X

Lian, Y.H., Fang, M.X., Chen, L.G., 2014. Constructing protein-protein interaction network of hypertension with blood stasis syndrome via digital gene expression sequencing and database mining. *Journal of Integrative Medicine* 12, 476–482. doi:10.1016/S2095-4964(14)60058-3

Liu, H.X., Zhou, X.Q., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Zeng, Y.Y., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Feng, L., 2018. Optimal α -lipoic acid strengthen immunity of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by enhancing immune function of head kidney, spleen and skin. *Fish & Shellfish Immunology* 80, 600–617. doi:10.1016/J.FSI.2018.06.057

Liu, W., Sun, J., Wu, Y., Yang, L., 2020. Protocol of a meta-analysis: Clinical efficacy and complications of short versus long fusion for the treatment of degenerative scoliosis. *Medicine (United States)* 99. doi:10.1097/MD.00000000000018845

Lobato, R.D.O., Manske Nunes, S., Fattorini, D., Regoli, F., Wasielesky, W., Monserrat, J.M., Everton Maciel, F., Ventura-Lima, J., 2018. The effect of diet enriched with lipoic

acid in the accumulation and metabolization of metals in different organs of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research* 49, 3702–3710. doi:10.1111/are.13838

Lobato, R.O., Nunes, S.M., Wasielesky, W., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M., Ventura-Lima, J., 2013. The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 165, 491–497. doi:10.1016/j.cbpa.2013.03.015

Longaray-Garcia, M., Flores, J.A., Kulkamp-Guerreiro, I.C., Guterres, S.S., Pereira, T.C.B., Bogo, M.R., Monserrat, J.M., 2013. Modulation of antioxidant and detoxifying capacity in fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) after treatment with nanocapsules containing lipoic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 165, 468–475. doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.004

López, M., 2018. Hypothalamic AMPK and energy balance. *European Journal of Clinical Investigation* 48, e12996. doi:10.1111/EJC.12996

Lu, D.-L., Ma, Q., Sun, S.-X., Zhang, H., Chen, L.-Q., Zhang, M.-L., Du, Z.-Y., 2019. Reduced oxidative stress increases acute cold stress tolerance in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology* 235, 166–173. doi:10.1016/j.cbpa.2019.06.009

Lu, D.L., Limbu, S.M., Lv, H.B., Ma, Q., Chen, L.Q., Zhang, M.L., Du, Z.Y., 2019. The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary α -lipoic acid, β -glucan and l-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 86, 785–793. doi:10.1016/J.FSI.2018.12.023

Luo, Z., Hu, S., Chen, D., 2018. The trends of aquacultural nitrogen budget and its environmental implications in China. *Scientific Reports* 8, 10877. doi:10.1038/s41598-018-29214-y

Maczurek, A., Hager, K., Kenklies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D.A., Münch, G., 2008. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1463–1470. doi:10.1016/j.addr.2008.04.015

Martindale, R.G., DeLegge, M., McClave, S., Monroe, C., Smith, V., Kiraly, L., 2011. Nutrition delivery for obese ICU patients: Delivery issues, lack of guidelines, and missed opportunities. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 35, 80S-87S. doi:10.1177/0148607111415532

Méndez, L., Pazos, M., Molinar-Toribio, E., Sánchez-Martos, V., Gallardo, J.M., Rosa Nogués, M., Torres, J.L., Medina, I., 2014. Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet and its metabolic effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 1243–1253. doi:10.1016/J.JNUTBIO.2014.06.014

Mestre Prates, J.A., Mateus, C.M.R.P., 2002. Functional foods from animal sources and their physiologically active components. *Revue de Medecine Veterinaire* 153, 155–160.

Miao, L., St. Clair, D.K., 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 344–356. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.05.018

Milito, A., Brancaccio, M., D'Argenio, G., Castellano, I., 2019. Natural Sulfur-Containing Compounds: An Alternative Therapeutic Strategy against Liver Fibrosis. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8111356

Ming, J., Ye, J., Zhang, Y., Yang, X., Shao, X., Qiang, J., Xu, P., 2019. Dietary optimal reduced glutathione improves innate immunity, oxidative stress resistance and detoxification function of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against microcystin-LR. *Aquaculture* 498, 594–605. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.09.014

Monserrat, J.M., Garcia, M.L., Ventura-Lima, J., González, M., Ballesteros, M.L., Miglioranza, K.S.B., Amé, M. V, Wunderlin, D.A., 2014. Antioxidant, phase II and III responses induced by lipoic acid in the fish *Jenynsia multidentata* (Anablapidae) and its influence on endosulfan accumulation and toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 108, 8–15. doi:10.1016/j.pestbp.2013.10.009

Monserrat, J.M., Lima, J. V, Ferreira, J.L.R., Acosta, D., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Moraes, T.B., dos Santos, L.C., Amado, L.L., 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148, 287–292. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.011

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.072

Ooi, L., Patel, M., Münch, G., 2012. The thiol antioxidant lipoic acid and Alzheimer's disease, *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. doi:10.1007/978-3-642-30018-9_84

Ortial, S., Durand, G., Poeggeler, B., Polidori, A., Pappolla, M.A., Böker, J., Hardeland, R., Pucci, B., 2006. Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers: A new class of protective agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 2812–2820. doi:10.1021/jm060027e

- Osiecki, H., 2004. The Role of Chronic Inflammation in Cardiovascular Disease and its Regulation by Nutrients. *Alternative Medicine Review* 9, 32–53.
- Otto, D.M.E., Sen, C.K., Casley, W.L., Moon, T.W., 1997. Regulation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl induced cytochrome P450 metabolism by thiols in tissues of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 117, 299–309. doi:10.1016/S0742-8413(97)00003-0
- Palozza, P., Mele, M.C., Cittadini, A., Mastrantoni, M., 2011. Potential interactions of carotenoids with other bioactive food components in the prevention of chronic diseases. *Current Bioactive Compounds* 7, 243–261. doi:10.2174/157340711798375877
- Park, D., Xiong, Y.L., 2007. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chemistry* 103, 607–616. doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.004
- Park, Kwan Ha, Terjesen, B.F., Tesser, M.B., Portella, M.C., Dabrowski, K., 2006. α -Lipoic acid-enrichment partially reverses tissue ascorbic acid depletion in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed vitamin C-devoid diets. *Fish Physiology and Biochemistry* 329–338. doi:10.1007/s10695-006-9110-9
- Parng, C., Ton, C., Lin, Y.-X., Roy, N.M., McGrath, P., 2006. A zebrafish assay for identifying neuroprotectants in vivo. *Neurotoxicology and Teratology* 28, 509–516. doi:10.1016/j.ntt.2006.04.003
- Parveen, R., Asghar, A., Anjum, F.M., Khan, M.I., Arshad, M.S., Yasmeen, A., 2013. Selective deposition of dietary α -Lipoic acid in mitochondrial fraction and its synergistic effect with α -Tocopherol acetate on broiler meat oxidative stability. *Lipids in Health and Disease* 2013 12:1 12, 1–8. doi:10.1186/1476-511X-12-52

Patil, B.S., Jayaprakasha, G.K., Chidambara Murthy, K.N., Vikram, A., 2009. Bioactive compounds: Historical perspectives, opportunities and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 8142–8160. doi:10.1021/jf9000132

Patrick, L., 2002. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Alternative Medicine Review* 7, 456–471.

Paul, D., Dey, T.K., Chakraborty, A., Dhar, P., 2018. Promising Functional Lipids for Therapeutic Applications, Role of Materials Science in Food Bioengineering. doi:10.1016/B978-0-12-811448-3.00013-9

Penesová, A., Dean, Z., Kollár, B., Havranová, A., Imrich, R., Vlček, M., Rádiková, Ž., 2018. Nutritional intervention as an essential part of multiple sclerosis treatment? *Physiological Research* 67, 521–533. doi:10.33549/physiolres.933694

Pszczola, D.E., 2005. Making fortification functional. *Food Technology* 59, 44–61.

Reimers, M.J., La Du, J.K., Periera, C.B., Giovanini, J., Tanguay, R.L., 2006. Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicology and Teratology* 28, 497–508. doi:10.1016/j.ntt.2006.05.007

Riccio, P., Rossano, R., Larocca, M., Trotta, V., Mennella, I., Vitaglione, P., Ettorre, M., Graverini, A., De Santis, A., Di Monte, E., Coniglio, M.G., 2016. Anti-inflammatory nutritional intervention in patients with relapsing-remitting and primary-progressive multiple sclerosis: A pilot study. *Experimental Biology and Medicine* 241, 620–635. doi:10.1177/1535370215618462

Robles-Romo, A., Zenteno-Savín, T., Racotta, I.S., 2016. Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 478, 16–23.
doi:10.1016/j.jembe.2016.01.016

Roomi, M.W., House, D., Tsao, C.S., 1998. Cytotoxicity of lipoic acid and dihydrolipoic acid against malignant marine leukaemia cells: A comparison with ascorbic acid and dehydroascorbic acid. Medical Science Research 26, 461–463.

Sabetian, S., Shamsir, M.S., 2016. Systematic Analysis of Protein Interaction Network Associated with Azoospermia. International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 1857 17, 1857. doi:10.3390/IJMS17111857

Salami, S.A., Majoka, M.A., Saha, S., Garber, A., Gabarrou, J.F., 2015. Efficacy of dietary antioxidants on broiler oxidative stress, performance and meat quality: Science and market. Avian Biology Research 8, 65–78. doi:10.3184/175815515X14291701859483

Sampels, S., 2013. Oxidation and Antioxidants in Fish and Meat from Farm to Fork, in: Food Industry. InTech. doi:10.5772/53169

Samuki, K., Setiawati, M., Jusadi, D., Suprayudi, M.A., 2021. The evaluation of α -Lipoic acid supplementation in diet on the growth performance of giant gourami (*Osphronemus goramy*) juvenile. Aquaculture Research 52, 1538–1547. doi:10.1111/ARE.15006

Sansevero, M.R., Houser, R., Phelan, G., Wanke, C., Tang, A., Hendricks, K., 2007. Nonvitamin, nonmineral dietary supplementation in HIV-positive people. Nutrition in Clinical Practice 22, 679–687. doi:10.1177/0115426507022006679

Santos, R.A., Caldas, S., Primel, E.G., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2016. Effects of lipoic acid on growth and biochemical responses of common carp fed with carbohydrate diets. Fish Physiology and Biochemistry 42, 1699–1707. doi:10.1007/s10695-016-0250-2

Schiller Vestergren, A.L., Trattner, S., Mráz, J., Ruyter, B., Pickova, J., 2011. Fatty acids and gene expression responses to bioactive compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes. *Neuroendocrinology Letters* 32, 41–50.

Schlemmer, C.K., Coetzer, H., Claassen, N., Kruger, M.C., Rademeyer, C., Van Jaarsveld, L., Smuts, C.M., 1998. Ectopic calcification of rat aortas and kidneys is reduced with n - 3 fatty acid supplementation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 59, 221–227. doi:10.1016/S0952-3278(98)90066-7

Schmidt, M.C., Askew, E.W., Roberts, D.E., Prior, R.L., Ensign W.Y., J., Hesslink R.E., J., 2002. Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wilderness and Environmental Medicine* 13, 94–105. doi:10.1580/1080-6032(2002)013[0094:OSIHTI]2.0.CO;2

Selvam, R., 2002. Calcium oxalate stone disease: Role of lipid peroxidation and antioxidants. *Urological Research* 30, 35–47. doi:10.1007/s00240-001-0228-z

Sevgiler, Y., Karaytug, S., Karayakar, F., 2011. Antioxidative effects of N-acetylcysteine, lipoic acid, taurine, and curcumin in the muscle of *Cyprinus carpio* L. exposed to cadmium. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 62, 1–9. doi:10.2478/10004-1254-62-2011-2082

Shahid, M.S.; F.M.A.; M.I.K.; M.S.A.; M.Y.; M., 2013. Effect of α -lipoic acid and α -tocopherol acetate enriched broiler diet on oxidative stability and quality of broiler leg meat and meat products. *Journal of Food Processing and Technology* 2013 Vol.4 No.7 pp.243 ref.37 4, 1–7.

Shao, D., Oka, S.I., Liu, T., Zhai, P., Ago, T., Sciarretta, S., Li, H., Sadoshima, J., 2014. A redox-dependent mechanism for regulation of AMPK activation by thioredoxin1 during energy starvation. *Cell Metabolism* 19, 232–245. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.013

Sharman, M.J., Gyengesi, E., Liang, H., Chatterjee, P., Karl, T., Li, Q.-X., Wenk, M.R., Halliwell, B., Martins, R.N., Münch, G., 2019. Assessment of diets containing curcumin, epigallocatechin-3-gallate, docosahexaenoic acid and α -lipoic acid on amyloid load and inflammation in a male transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Are combinations more effective? *Neurobiology of Disease* 124, 505–519. doi:10.1016/j.nbd.2018.11.026

Shi, X.-C., Jin, A., Sun, J., Yang, Z., Tian, J.-J., Ji, H., Yu, H.-B., Li, Y., Zhou, J.-S., Du, Z.-Y., Chen, L.-Q., 2017. α -lipoic acid ameliorates n-3 highly-unsaturated fatty acids induced lipid peroxidation via regulating antioxidant defenses in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish and Shellfish Immunology* 67, 359–367. doi:10.1016/j.fsi.2017.06.036

Shi, X., Jin, A., Sun, J., Tian, J., Ji, H., Chen, L., Du, Z., 2018. The protein-sparing effect of α -lipoic acid in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*: effects on lipolysis, fatty acid β -oxidation and protein synthesis. *British Journal of Nutrition* 120, 977–987. doi:10.1017/S000711451800226X

Shinto, L., Lahna, D., Murchison, C.F., Dodge, H., Hagen, K., David, J., Kaye, J., Quinn, J.F., Wall, R., Silbert, L.C., Mielke, M., 2020. Oxidized products of omega-6 and omega-3 long chain fatty acids are associated with increased white matter hyperintensity and poorer executive function performance in a cohort of cognitively normal hypertensive older adults. *Journal of Alzheimer's Disease* 74, 65–77. doi:10.3233/JAD-191197

Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H.H., Woodward, W., Baldauf-Wagner, S., Waichunas, D., Bumgarner, L., Bourdette, D., Silbert, L., Kaye, J., 2014. A randomized

placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 38, 111–120. doi:10.3233/JAD-130722

Sialer, C., García, I., González-Sabín, J., Braña, A.F., Méndez, C., Morís, F., Salas, J.A., 2013. Generation by mutasynthesis of potential neuroprotectant derivatives of the bipyridyl collismycin A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 23, 5707–5709. doi:10.1016/j.bmcl.2013.08.017

Soare, A., Weiss, E.P., Holloszy, J.O., Fontana, L., 2014. Multiple dietary supplements do not affect metabolic and cardiovascular health. *Aging* 6, 149–157. doi:10.18632/aging.100597

Sohaib, M., Anjum, F.M., Nasir, M., Saeed, F., Arshad, M.S., Hussain, S., 2018. Alpha-lipoic acid: An inimitable feed supplement for poultry nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. doi:10.1111/jpn.12693

Spencer, R.P., Brody, K.R., 1964. Biotin transport by small intestine of rat, hamster, and other species. *The American journal of physiology* 206, 653–657. doi:10.1152/ajplegacy.1964.206.3.653

Springborn, R.R., Jensen, A.L., Chang, W.Y.B., 1994. A variable growth rate modification of von Bertalanffy's equation for aquaculture. *Aquaculture Research* 25, 259–267. doi:10.1111/J.1365-2109.1994.TB00689.X

Suárez-Jiménez, G.M., López-Saiz, C.M., Ramírez-Guerra, H.E., Ezquerro-Brauer, J.M., Ruiz-Cruz, S., Torres-Arreola, W., 2016. Role of Endogenous and Exogenous Tocopherols in the Lipid Stability of Marine Oil Systems: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, Vol. 17, Page 1968 17, 1968. doi:10.3390/IJMS17121968

- Surai, P.F., 2019. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. <https://doi.org/10.1079/WPS20020026> 58, 333–347. doi:10.1079/WPS20020026
- Surak, J.G., Bradley, R.L., Branen, A.L., Maurer, A.J., Ribelin, W.E., 1977. Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Butylated Hydroxytoluene (BHT) Effects on Serum and Liver Lipid Levels in *Gallus domesticus*. *Poultry Science* 56, 747–753. doi:10.3382/PS.0560747
- Surette, M.C., Nason, J.A., Kaegi, R., 2019. The influence of surface coating functionality on the aging of nanoparticles in wastewater. *Environmental Science: Nano* 6, 2470–2483. doi:10.1039/c9en00376b
- Terjesen, B F, Park, K., Tesser, M.B., Portella, M.C., Zhang, Y., Dabrowski, K., 2004. Lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free amino acids selectively in the teleost fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Journal of Nutrition* 134, 2930–2934. doi:10.1093/jn/134.11.2930
- Thangaraj, M., Gengan, R.M., Ranjan, B., Muthusamy, R., 2018. Synthesis, molecular docking, antimicrobial, antioxidant and toxicity assessment of quinoline peptides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 178, 287–295. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.11.019
- Thom, E., 2005. A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the clinical efficacy of oral treatment with DermaVite™ on ageing symptoms of the skin. *Journal of International Medical Research* 33, 267–272. doi:10.1177/147323000503300301
- Tilton, F., La Du, J.K., Tanguay, R.L., 2008. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). *Aquatic Toxicology* 90, 121–127. doi:10.1016/j.aquatox.2008.08.008

Trattner, S., Pickova, J., Park, K.H., Rinchar, J., Dabrowski, K., 2007. Effects of α -lipoic and ascorbic acid on the muscle and brain fatty acids and antioxidant profile of the South American pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture* 273, 158–164. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.09.025

Ueda, K., Asai, Y., Yoshimura, Y., Iwakawa, S., 2008. Effect of oil-in-water lipid emulsions prepared with fish oil or soybean oil on the growth of MCF-7 cells and HepG2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60, 1069–1075. doi:10.1211/jpp.60.8.0013

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I.M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigarto, C.A.K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., Von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Von Heijne, G., Nielsen, J., Pontén, F., 2015. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347. doi:10.1126/science.1260419

Ursini, F., Maiorino, M., 2020. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027

Valdecantos, M.P., Pérez-Matute, P., Prieto-Hontoria, P., Moreno-Aliaga, M.J., Martínez, J.A., 2019. Impact of dietary lipoic acid supplementation on liver mitochondrial bioenergetics and oxidative status on normally fed Wistar rats. <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1572716> 70, 834–844. doi:10.1080/09637486.2019.1572716

Vasdev, S., Stuckless, J., Richardson, V., 2011. Role of the immune system in hypertension: Modulation by dietary antioxidants. *International Journal of Angiology* 20, 189–211. doi:10.1055/s-0031-1288941

- Venigalla, M., Sonogo, S., Gyengesi, E., Sharman, M.J., Münch, G., 2016. Novel promising therapeutics against chronic neuroinflammation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 95, 63–74. doi:10.1016/j.neuint.2015.10.011
- Villasante, A., Ramírez, C., Rodríguez, H., Catalán, N., Díaz, O., Rojas, R., Opazo, R., Romero, J., 2019. In-depth analysis of swim bladder-associated microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Scientific Reports* 9. doi:10.1038/s41598-019-45451-1
- Wang, Y., Li, X., Guo, Y., Chan, L., Guan, X., 2010. α -Lipoic acid increases energy expenditure by enhancing adenosine monophosphate-activated protein kinase- γ proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α signaling in the skeletal muscle of aged mice. *Metabolism - Clinical and Experimental* 59, 967–976. doi:10.1016/J.METABOL.2009.10.018
- Weston, A.R., Rogers, R.W., Althen, T.G., 2002. Review: The Role of Collagen in Meat Tenderness. *Professional Animal Scientist* 18, 107–111. doi:10.15232/S1080-7446(15)31497-2
- Wolfson, N., Fry, D.S., 1965. The effect of oxidized lipoic acid on developing echinoderm embryos. *Experimental Cell Research* 38, 66–74. doi:10.1016/0014-4827(65)90428-3
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R., Turner, N.D., 2004. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *Journal of Nutrition*. doi:10.1093/jn/134.3.489
- Xiao, W., Wang, R.S., Handy, D.E., Loscalzo, J., 2018. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxidants and Redox Signaling*. doi:10.1089/ars.2017.7216

- Xu, C., Li, E., Liu, S., Huang, Z., Qin, J.G., Chen, L., 2018. Effects of α -lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant status and lipid catabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* fed different lipid percentage. *Aquaculture* 484, 286–292. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2017.09.036
- Xu, C., Wang, X., Han, F., Qi, C., Li, E., Guo, J., Qin, J.G., Chen, L., 2019. α -lipoic acid regulate growth, antioxidant status and lipid metabolism of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: Optimum supplement level and metabonomics response. *Aquaculture* 506, 94–103. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.03.029
- Xu, F., Xu, C., Xiao, S., Lu, M., Limbu, S.M., Wang, X., Du, Z., Qin, J.G., Chen, L., 2019. Effects of α -lipoic acid on growth performance, body composition, antioxidant profile and lipid metabolism of the GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed high-fat diets. *Aquaculture Nutrition* 25, 585–596. doi:10.1111/ANU.12881
- Xu, H., Gan, C., Gao, Z., Huang, Y., Wu, S., Zhang, D., Wang, X., Sheng, J., 2020. Caffeine Targets SIRT3 to Enhance SOD2 Activity in Mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 822. doi:10.3389/FCELL.2020.00822
- Yilmaz, Ö., Özkan, Y., Yildirim, M., Öztürk, A.I., Erşan, Y., 2002. Effects of alpha lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione, malonaldehyde, and fatty acids levels in erythrocytes of streptozotocin induced diabetic male rats. *Journal of Cellular Biochemistry* 86, 530–539. doi:10.1002/jcb.10244
- Yorek, M.S., Obrosova, A., Shevalye, H., Coppey, L.J., Kardon, R.H., Yorek, M.A., 2017. Early vs. late intervention of high fat/low dose streptozotocin treated C57Bl/6J mice with enalapril, α -lipoic acid, menhaden oil or their combination: Effect on diabetic neuropathy related endpoints. *Neuropharmacology* 116, 122–131. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.12.022

Youssef, N.H., Farag, I.F., Hahn, C.R., Premathilake, H., Fry, E., Hart, M., Huffaker, K., Bird, E., Hambright, J., Hoff, W.D., Elshahed, M.S., 2019. Candidatus Krumholzbacterium zodletonense gen. nov., sp nov, the first representative of the candidate phylum Krumholzbacteriota phyl. nov. recovered from an anoxic sulfidic spring using genome resolved metagenomics. *Systematic and Applied Microbiology* 42, 85–93. doi:10.1016/j.syapm.2018.11.002

Zhang, H., Luo, Q., Gao, H., Feng, Y., 2015. A new regulatory mechanism for bacterial lipoic acid synthesis. *MicrobiologyOpen* 4, 282–300. doi:10.1002/mbo3.237

Zhang, J., Zhou, X., Wu, W., Wang, J., Xie, H., Wu, Z., 2017. Regeneration of glutathione by α -lipoic acid via Nrf2/ARE signaling pathway alleviates cadmium-induced HepG2 cell toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51, 30–37. doi:10.1016/J.ETAP.2017.02.022

Zhang, W., Chen, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, X., Liufu, Z., 2010. Effects of dietary α -lipoic acid on the growth and antioxidative responses of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture Research* 41, e781–e787. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02592.x

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. doi:10.1089/10665270050081478

4. DISCUSSAO GERAL DA TESE

Segundo o observado no primeiro Capítulo é possível fazer uma ligação teoricamente factível entre o catabolismo e a anabolismo a partir de mudanças gerais ou localizadas do status redox, onde a promoção do sistema antioxidante parece uma peça importante não só para a contenção de possíveis situações pró-oxidantes, mas para desempenhar uma função

de regulação (feed-back negativo) da sinalização pró-oxidante para a alternância entre processos anabólicos e catabólicos. Isto porque como foi mencionado estes processos promovem a geração de ROS de diversas maneiras, como mensageiros para modulação de respostas bioquímicas agônicas ou antagônicas. São diversos os exemplos onde a produção de ROS possui uma função fundamental na homeostase dos indivíduos, segundo isso a manipulação nutracêutica do status redox deveria ser fortemente considerada para adaptar a fisiologia dos organismos aquáticos para a produção. Ao parecer nos Capítulos 2 e 3 são um exemplo de como metabolismo de um animal pode ser modulado dentro de situações que não afastam-se da homeostase, mas dentro desta compostos exógenos atuam como sinais bioquímicas para a restrição ou promoção de processos, o LA que por sua vez a partir de reações pró-oxidantes pode levar ao animal à incremento da taxas catabolicas, onde a utilização da glicose circulante como substrato energético poderia se ver incrementada. Já no caso do acetato de sódio (SA; Capítulo 3), é de se prever que além de servir como fonte de energia, diminua a utilização de outros substratos energéticos mediante diversos tipos de regulação alostérica direta ou indireta

Dentro dos resultados obtidos neste trabalho foi possível observar a capacidade que tem o ácido lipóico (LA) como modulador do metabolismo energético, são fortes as evidências apresentadas aqui, que indicam que ou bem o LA pode aumentar a capacidade do sistema transportador de elétrons ou a quantidade de mitocondrial nos tecidos. Como foi observado no Capítulo 2 este incremento da capacidade e atividade metabólica podem ocorrer em paralelo com uma diminuição da produção na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) o qual pode estar indicando um aumento da eficiência energética dos animais. isto porque a demanda metabólica que exerce o controle de uma possível sobre produção de ROS pode ser determinante dentro da fisiologia produtiva do animal. Esta diminuição da produção de ROS poderia estar vinculada como encontrou-se com o aumento da utilização

da glicose como substrato energético (verificado neste trabalho nos Capítulos 2 e 3) devido a que a produção de energia a partir de esta começa (glicólise) sem a intermediação da fosforilação oxidativa que é a fonte principal de ROS dentro da célula (o qual explica o RQ de 1, veja-se Capítulo 3).

Tendo em conta que a glicólise é um processo não só para a descarboxilação e produção de acetil CoA, mas também para a produção de ATP é possível assumir que é um processo mais eficiente para a produção de energia por unidade de ROS gerado, no entanto existe a possibilidade diante um aumento da glicólise de ocorrer uma diminuição da sinalização para a síntese de defesas antioxidantes como podem estar sugerindo os resultados de diminuição do ACAP com a suplementação com LA observada no Capítulo 2. No entanto, isto poderia chegar a ser revertido pelo LA em determinadas doses, como apontam os resultados encontrados no Capítulo 2 com a adição do LA na concentração de 10 μM às 24 h de exposição da artemia.

Enquanto aos efeitos do LA como promotor da preservador da proteína a partir da utilização de outros substratos energéticos, este trabalho traz informação que apesar de corroborar fortemente este efeito, também o relativizam à possível em função à disponibilidade de outros substratos energéticos, já a que a pesar do LA apresentar em determinadas concentrações, valores de proteína acima dos valores de proteína encontrados no controle e nos animais tratados com acetato de sódio (SA) nos tempos 6 e 12 h (Capítulo 3), estes valores acabam caindo até níveis equiparáveis aos do controle como observou-se no Capítulo 2 e 3.

Tendo em conta que o LA e o SA apresentaram um comportamento potencialmente sinérgico para a preservação da energia contida nos animais é necessário explorar os fatores bioquímicos que levaram a este efeito, se bem pode se apontar que a diminuição da

produção de ROS provocada pelo LA permitiu uma melhor utilização da energia fornecida pelo SA é importante verificar que a preservação da energia não tenha acontecido em detrimento do desenvolvimento dos animais, mais do que no aumento da eficiência energética, assim é necessário verificar mediante análises ontogênicas o efeito destes compostos de maneira separada e em co-administração no desenvolvimento do animal.

Considerando o fato de ter utilizado animais dependentes do vitelo, o qual pode se interpretar como análogo a uma dieta ajustada aos requerimentos nutricionais do animal, é possível assumir que o SA e/ ou a combinação entre SA e LA podem ser suplementados como moduladores do metabolismo animal e do requerimento nutricional. Caso a preservação da proteína seja um efeito sem consequências negativas sobre o crescimento, é razoável pensar que estes compostos implementados na dieta de outras espécies aquáticas poderiam levar à diminuição do requerimento protéico com uma potencial redução da utilização de matérias primas de origem animal e da pesca. Além disso, deveriam ser testadas a possibilidade da diminuição da inclusão de óleo procedente de organismos aquáticos, diante os resultados observados neste trabalho sobre a regulação positiva da utilização da glicose com a suplementação com LA.

A informação disponível sobre os efeitos do LA em organismos aquáticos compilada para o Capítulo 4 em grande parte corrobora os resultados obtidos no Capítulos 2 e 3, no entanto revela possíveis efeitos do hábito alimentar na resposta à suplementação com LA, é o caso da taxa de eficiência protéica (PER) dos animais, já que embora os resultados obtidos neste trabalho usando à artêmia como modelo sugerem que o LA poderia contribuir positivamente à PER, o Capítulo 4 apresenta evidência que sugere a influência e interação do hábito alimentar com o LA sobre a PER, onde mesmo animais com hábito alimentar herbívoro apresentem um incremento da PER, em animais carnívoros foi encontrado o efeito oposto. Somado a isto a taxa específica de crescimento em carnívoros foi

influenciada negativamente com a adição do LA sugerindo fortemente uma maior sensibilidade de espécies carnívoras à suplementação com LA, isto de novo contrasta com os resultados obtidos em organismos onívoros nos que embora não tenha se apresentado um efeito significativo do LA sobre o peso corporal dos animais diferente dos organismos herbívoros e carnívoros o coeficiente deste grupo é positivo sinalizando um potencial efeito positivo do LA no desempenho destes animais. Isto deveria ser explorado para futuros trabalhos.

Sobre os efeitos metabólicos do LA, é possível observar a regulação positiva que este faz sobre proteínas relevantes na produção de energia a partir da glicólise (Co-transportador 1 dependente do sódio, Glicose 6 fosfatase, Fosfofructoquinase), como apresentado no Capítulo 4, isso confirma as observações dos capítulos prévios, onde o LA influiu de maneira significativa na diminuição dos teores de glicose e de maneira dose-dependente (Capítulo 1 e 2). É interessante notar que se bem nos capítulos 2 e 3 no foi observado um efeito do LA como promotor do catabolismo de triglicérides na artêmia, o Capítulo 4 aporta forte evidência sobre a regulação positiva que o LA faz sobre o metabolismo catabólico dos lipídios em outras espécies aquáticas, onde foi encontrada uma regulação positiva das proteínas Lipase sensível a hormônios, Lipoproteína lipase, ao tempo que proteínas relacionadas com a síntese de lipídios como a proteína Diaciglicerol-O-Acetiltransferase e a α acetil CoA carboxilase apresentaram uma regulação negativa por efeito do LA. Este trabalho não é capaz de estabelecer os motivos pelos quais o LA aparentemente não promoveu a utilização de triglicérides como fonte de energia, mas existe a possibilidade de que isto se deva a fatores inerentes à artêmia.

No referente ao sistema antioxidante e produção de ROS se bem os capítulos 2 e 3 apresentam o que poderia se interpretar como a ação ambivalente do LA como pró-oxidante/antioxidante o efeito do LA observado no Capítulo 3 para o tempo de 6 h

ilustra de maneira mais consistente a promoção do sistema antioxidante nos organismos o qual difere das observações no Capítulo 3 onde este efeito dose dependente do LA sobre o aumento da ACAP só apreciou-se no tempo 12 h o qual poderia estar relacionado ao efeito do veículo do LA o DMSO como antagonico à possível sinalização redox gerada pelo LA. Por outro lado, chama a atenção o fato de nestes dois capítulos o LA não ter apresentado uma melhora permanente do ACAP isto poderia ser um reflexo como mencionado, da diminuição geral da sinalização pró-oxidante endógena resultante da notável diminuição da produção de ROS, alias para afirmar isto deve ser tido em conta a atividade do ETS como fator de relativização da produção de ROS. Segundo isto é tomando como exemplo a resposta dos organismos no tempo 24 h, no capítulo 2 é possível observar um potente efeito antioxidante do LA, já que mesmo o ACAP tenha diminuído de maneira significativa em função dose dependente ao LA (exceto no tratamento com 10 uM de LA) houve uma diminuição do ROS em função à concentração de LA quando a atividade do ETS apresentava valores acima dos apresentados pelo controle, algo similar acontece com o tratamento com 0.05 uM de LA no Capítulo 3 onde sendo a ACAP estatisticamente igual ao controle a atividade do ETS foi significativamente maior comparado com o tratamento não suplementado, no entanto os valores de ROS do tratamento com 0.05 uM de LA foram significativamente inferiores pelo que a contenção da produção de ROS por efeito do LA é fisiologicamente mais relevante.

As evidências apresentadas no Capítulo 4 sobre o efeito do LA no status redox do animal parecem apontar aos possíveis motivos para a diminuição da ACAP onde encontrou-se evidência de que apesar do LA regular positivamente as proteínas superóxido dismutase Cu/Zn (SOD1) e a glicina cisteína ligase (GCLC) observou-se uma diminuição da proteína glutathiona peroxidase (GPx3) o qual poderia chegar a ser interpretado como uma diminuição da produção de H₂O₂ que por sua vez condiz com o encontrado nos capítulos