



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Jorge Filipe Banze

Suplementação dietética com colesterol para juvenis de tilápia do Nilo criados em temperatura subótima de 22°C: desempenho, digestibilidade e metabolismo

Florianópolis
2023

Jorge Filipe Banze

Suplementação dietética com colesterol para juvenis de tilápia do Nilo criados em temperatura subótima de 22°C: desempenho, digestibilidade e metabolismo

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor Aquicultura.

Orientadora: Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.

Coorientadora: Profa. Maria Risoleta Freire Marques, Dra.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Banze, Jorge Filipe

Suplementação dietética com colesterol para juvenis de tilápia do Nilo criados em temperatura subótima de 22°C: desempenho, digestibilidade e metabolismo / Jorge Filipe Banze ; orientadora, Débora Machado Fracalossi, coorientadora, Maria Risoleta Freire Marques, 2023.

89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Oreochromis niloticus. 3. crescimento. 4. digestibilidade. 5. metabolismo. I. Fracalossi, Débora Machado. II. Marques, Maria Risoleta Freire. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Jorge Filipe Banze

Suplementação dietética com colesterol para juvenis de tilápia do Nilo criados em temperatura subótima de 22°C: desempenho, digestibilidade e metabolismo

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 11 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Camila Fernandes Corrêa, Dra.
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

Profa. Flávia Lucena Zacchi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Andrade Rodrigues, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2023

*Este trabalho é dedicado a todos os meus colegas,
pelas trocas e aprendizados valiosos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir viver essa experiência enriquecedora que foi o doutorado. Agradeço aos meus pais, Garcia Banze e Rosalina Massinga, ao meu irmão Vasco Banze, pelo apoio, amor e carinho durante todos estes quatro anos distante do convívio familiar. Ao Bruno Pierri e seus pais, pelo carinho e hospedagem nas minhas primeiras semanas do doutorado em Florianópolis – o meu obrigado!

Agradeço à Professora Débora Machado Fracalossi, pela sabedoria, pelos ensinamentos e conhecimentos repassados, pela paciência, pela pessoa muito querida e que é com todos – meu muitíssimo obrigado! Seus ensinamentos me servirão a vida toda!

Agradeço a minha coorientadora, a Professora Risoleta Marques pelos conhecimentos repassados, pelo incentivo, encorajamento e inspiração.

Aos meus queridos colegas do LABNUTRI e para sempre companheiros: Renata Nobrega, Bruna Mattioni, Maria Fernanda, Sônia Rejane, Katharinne Ingrid, Rafael Romanelli, Bianca Richter, Rosa Oliveira, Vitória Daitx, Virian Brutti, Michele Oliveira, Guto, o Delano, Vitor Lehmkuhl, sem os quais meu percurso não seria o mesmo. Obrigado pela parceria! Aos professores, colegas e amigos do LAPAD, pelo apoio em todos os momentos e por estarem sempre presentes, Professores Alex, Prof. Robson, Luciano Weiss, Vinícius Buratto, Renata, Ronaldo, Maurício, Edson, Felipe pelo convívio e por estarem sempre prontos para ajudar, obrigado.

A todos os colegas do LABCAI, em especial ao Jacó, meu agradecimento pela recepção, e principalmente conhecimentos de biologia molecular repassados, que experiência incrível! Ao pessoal no NEPAQ pela ajuda nas análises histológicas, o meu obrigado!

À Epagri, em especial ao Bruno Corrêa, pelo fornecimento dos peixes.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Camila Fernandes Corrêa, Dr. Robson Andrade, Dra. Flávia Zacchi e Dr. Afonso Bainy, pelas sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram a consolidar este trabalho. Meu obrigado a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura - UFSC, pelos ensinamentos e partilha de experiências. Meu agradecimento se estende ao Carlito Klunk, pelo profissionalismo.

Agradeço a Luiza, que desde sempre, acreditou e me apoiou. Agradeço aos meus amigos, que sempre estiveram por perto me desejando força: Stélio Manguê, Felício, Enoque, Sara Tembe, Manecas Baloi Inácio Assane, Giovanna, Dona Zélia, Maria Antônia, Maurício, Sara Ioci, Adilson, Celma, Tiby, Benjour, Khety.

Agradeço ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Código de Financiamento 24/2018-1, pela bolsa de doutorado.

“Contar uma história significa levar as mentes no voo da imaginação e trazê-las de volta ao mundo da reflexão”

Paulina Chiziane

RESUMO

Animais ectotérmicos, como peixes, são diretamente afetados por mudanças na temperatura da água, o que pode levar a uma diminuição significativa no crescimento. Pouco ou quase nada se sabe sobre o efeito da suplementação de colesterol dietético no crescimento e metabolismo lipídico em juvenis de tilápia-do-nylo criados em temperaturas subótimas de crescimento. O presente estudo avaliou o efeito da suplementação dietética de colesterol no crescimento, composição corporal, perfil corporal de ácidos graxos e colesterol, determinação da digestibilidade de nutrientes, composição proximal do hepatopâncreas, perfil plasmático de colesterol, triacilgliceróis, HDL, além de alterações morfológicas no hepatopâncreas e nível dos transcritos de genes envolvidos nos processos de absorção, síntese e degradação de colesterol em juvenis de tilápia-do-nylo. Dois ensaios foram conduzidos: um ensaio de alimentação, tipo dose-resposta (91 dias), com juvenis ($29,24 \pm 0,02$ g) seguido de outro, de digestibilidade, com peixes maiores ($230,47 \pm 1,51$ g), por 60 dias. Para o ensaio de alimentação, dietas isonitrogenadas e isolipídicas foram formuladas com níveis crescentes de colesterol dietético (0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%) testadas em seis réplicas cada. Duas dietas foram selecionadas para o ensaio de digestibilidade, 0% e 0,25%, as quais foram testadas em triplicata, utilizando-se óxido de ítrio como marcador inerte. A suplementação dietética com colesterol não afetou o crescimento ($P > 0,05$), mas favoreceu acúmulo linear de colesterol no corpo ($P < 0,05$) de juvenis de tilápia-do-nylo criados a 22 °C. Da mesma forma, a composição corporal proximal, incluindo matéria seca, proteína, lipídios e cinzas, não foi afetada pela suplementação crescente de colesterol na dieta. No entanto, a digestibilidade da matéria seca, proteína, lipídios e ácidos graxos diminuiu ($P < 0,05$) com a suplementação de 0,25% de colesterol. Além disso, a suplementação com colesterol proporcionou aumento crescente dos índices viscerossomático e hepatossomático, favoreceu o acúmulo crescente de colesterol e triacilgliceróis no hepatopâncreas e aumento linear do colesterol e das lipoproteínas não-HDL no plasma, mas a diminuição linear de triacilgliceróis no plasma. Além disso, a suplementação com colesterol dietético causou congestão e dilatação nos sinusoides no hepatopâncreas, intensificou a esteatose e a perda do núcleo dos hepatócitos a partir de 0,5% de colesterol dietético. A nível molecular, a suplementação com colesterol a partir de 0,5% reduziu o nível de transcrição de *HMGCr*, gene que codifica a enzima responsável pela síntese do colesterol no hepatopâncreas. Esses resultados indicam que a suplementação dietética com colesterol, embora não tenha afetado o crescimento, reduziu a digestibilidade dos nutrientes, afetou a morfologia e a composição do hepatopâncreas, promovendo o acúmulo de colesterol, triacilgliceróis, além de afetar o metabolismo lipídico em juvenis de tilápia-do-nylo quando criados a uma temperatura de 22 °C, abaixo da ideal.

Palavras-chave: Aquicultura, *Oreochromis niloticus*; crescimento; digestibilidade; metabolismo.

ABSTRACT

Ectothermic animals such as fish are directly affected by changes in water temperature, which can lead to a significant decrease in growth. Little or nothing is known about the effect of dietary cholesterol supplementation on growth and lipid metabolism in juvenile Nile tilapia reared at suboptimal growth temperatures. The present study evaluated the effect of dietary cholesterol supplementation on growth, body composition, fat and cholesterol whole body contents, nutrient digestibility, hepatopancreas composition, cholesterol, triacylglycerols, and HDL plasma contents besides morphological alterations in the hepatopancreas and the level of transcripts of genes involved in the processes of absorption, synthesis, and degradation of cholesterol in Nile tilapia juveniles. Two trials were performed: a dose-response feeding trial (91 days) with juveniles (29.24 ± 0.02 g) followed by a digestibility trial with larger fish (230.47 ± 1.51 g), for 60 days. For the feeding trial, isonitrogenous and isolipidic diets were formulated with increasing levels of dietetic cholesterol (0%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, and 1.0%) tested in six replicates each. Two diets were selected for the digestibility test, 0% and 0.25%, which were tested in triplicate, using yttrium oxide as an inert marker. Dietary cholesterol supplementation did not affect growth ($P > 0.05$) but favored linear cholesterol accumulation in the body ($P < 0.05$) of Nile tilapia juveniles reared at 22 °C. Likewise, proximal body composition, including dry matter, protein, lipids, and ash, were not affected by increasing dietary cholesterol supplementation. However, the digestibility of dry matter, protein, lipids, and fatty acids decreased ($P < 0.05$) with the supplementation of 0.25% cholesterol. Furthermore, cholesterol supplementation increased hepatosomatic and viscerosomatic indexes, increasing accumulation of cholesterol and triacylglycerols in the hepatopancreas. There was a linear increase in plasma cholesterol and non-HDL lipoproteins but a linear decrease in plasma triacylglycerols. Conversely, supplementation with dietary cholesterol caused congestion and dilation in the sinusoids in the hepatopancreas, intensified steatosis and loss of hepatocyte nucleus from 0.5% dietary cholesterol, without causing necrosis in the hepatopancreas. At the molecular level, supplementation with cholesterol from 0.5% reduced the transcription level of *HMGCr*, gene coding for the enzyme responsible for the synthesis of cholesterol in the hepatopancreas. These results indicate that dietary supplementation with cholesterol although didn't affect growth, it reduced the digestibility of nutrients, affected the morphology and composition of the hepatopancreas, promoting the accumulation of cholesterol, triacylglycerols, in addition to affecting lipid metabolism in juvenile Nile tilapia when reared at a suboptimal temperature of 22 °C.

Keywords: Aquaculture, *Oreochromis niloticus*; growth; digestibility; metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura do colesterol. Os anéis individuais do sistema de anéis fundidos (A a D) é que formam o anel esteroide, o qual é responsável por conferir rigidez à molécula do colesterol, principalmente em temperaturas mais frias. 21
- Figura 2** - Formação de microdomínios (“rafts”), que são domínios pequenos (10-20 nm), heterogêneos, altamente dinâmicos, enriquecidos com colesterol e esfingolipídios. Estes domínios compartimentam os processos celulares ao longo da membrana plasmática, podendo formar plataformas maiores por meio de interações lipídio-lipídio ou proteína-lipídio. 26
- Figura 3** - Suplementação dietética com colesterol e índices viscerossomático (IVS) e hepatossomático (IHS) em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados por 91 dias, a 22 °C. 66
- Figura 4** - Alterações histológicas de tecidos hepáticos em juvenis de tilápia-do nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético a 22 °C. Em “A”, tratamento 0% observa-se esteatose em menor intensidade, (setas), escala 50 µm; Em “B” , tratamento 0,5%, têm-se esteatose em maior intensidade (setas), barra 50 µm; Em “C” tratamento 0%, observa-se menor intensidade de perda do núcleo dos hepatócitos (setas), barra 20 µm; Em “D” Tratamento 0,5%, observa-se maior intensidade de perda do núcleo dos hepatócitos (setas), barra 20 µm. Coloração: H&E. 73
- Figura 5** - Níveis de transcritos dos genes (A) *NPC1L1*, (B) *HMGCr* e (C) *CYP7A1*, relacionados à absorção, síntese e degradação de colesterol, respectivamente, em juvenis de tilápia-do-nilo, quando alimentados com níveis crescentes de colesterol e criados em temperatura subótima de 22 °C. Valores expressos em média de seis repetições por tratamento (n=12). 76

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Resumo de trabalhos realizados com suplementação de colesterol em dietas para diferentes espécies de peixe: temperatura, duração, doses e principais resultados. . 24
- Quadro 2** - Genes de interesse, suas respectivas funções e sequências de iniciadores. 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio de alimentação dose-resposta de colesterol ¹	36
Tabela 2 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio de digestibilidade de nutrientes ^{1,2}	39
Tabela 3 - Desempenho, eficiência alimentar, retenção proteica e sobrevivência de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com inclusões crescentes de colesterol por 91 dias, a 22 °C.	43
Tabela 4 - Composição corporal proximal (expressa na matéria úmida) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com inclusões crescentes de colesterol por 91 dias, a 22 °C.	43
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos e colesterol corporais (expresso em g 100 g ⁻¹ peso seco) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com inclusões crescentes de colesterol por 91 dias, a 22 °C ^{1,2}	44
Tabela 6 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de nutrientes selecionados para juvenis de tilápia-do-nilo quando alimentados com rações com ou sem inclusão de colesterol, a 22 °C ^{1,2}	46
Tabela 7 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio de alimentação dose-resposta de colesterol (Capítulo II).	61
Tabela 8 - Composição proximal do hepatopâncreas de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético, por 91 dias, à 22 °C.	67
Tabela 9 - Perfil de colesterol total, triacilgliceróis e lipoproteínas no plasma de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético, por 91 dias, em temperatura subótima de 22°C ¹	70
Tabela 10 - Intensidade das alterações histológicas no hepatopâncreas de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético, por 91 dias, à 22 °C. ¹	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ARA	Ácido araquidônico (20:4n-6)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ct	Ciclo do limiar de detecção em uma reação de qPCR
CYP7A1	Enzima 7 α hidroxilase
<i>CYP7A1</i>	<i>Gene 7α hidroxilase</i>
cDNA	DNA complementar
DHA	Ácido docosaenoico (22:6n-3)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido docosapentaenoico (22:5n-3)
E	Eficiência da reação de qPCR
EPA	Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>
GIFT	<i>Genetically Improved Farmed Tilapia</i>
HMGCr	Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
HMGCr	<i>Gene 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase</i>
L	Litro
LABNUTRI	Laboratório de nutrição de espécies aquícolas
LABCAI	Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LAPAD	Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água doce
LC-PUFA	PUFA de cadeia longa (≥ 20 carbonos)
LOA	Ácido linoleico (18:2n-6)
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
NPC1L1	Proteína <i>Niemann–Pick C1-like 1</i>
<i>NPC1L1</i>	<i>Gene Niemann–Pick C1-like 1</i>
n-3	Série n-3
n-6	Série n-6
NRC	<i>National Research Council</i>
opt	Ótimo
P	Probabilidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
RAS	Sistema aquícola de recirculação
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _t	Ácido ribonucléico total
SC	Santa Catarina
SP	São Paulo
SFA	Ácidos graxos saturados

SREBP-1	Proteínas de ligação do elemento regulador do esterol
TWAS	<i>The World Academy of Sciences</i>
v	Volume
x g	Força centrífuga aplicada
α-LNA	Ácido alfa-linolênico (18:3n-3)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Letra grega alfa
β	Letra grega beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 TILAPICULTURA E DESAFIOS CLIMÁTICOS	17
1.1.1 Temperatura e criação de tilápia-do-nylo	19
1.1.2 Efeito da temperatura na digestão e absorção de lipídios.....	20
1.2 COLESTEROL.....	21
1.2.1 Importância do colesterol no funcionamento das membranas plasmáticas	21
1.2.2 Colesterol em dietas para peixes	23
1.2.3 Efeito do colesterol na absorção de nutrientes	25
1.2.4 Respostas moleculares ao consumo de colesterol	26
1.3 OBJETIVOS.....	28
CAPÍTULO II: COLESTEROL REDUZ A DIGESTIBILIDADE DA DIETA SEM AFETAR O CRESCIMENTO DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO CRIADOS EM TEMPERATURA SUBÓTIMA DE 22 °C	29
1 INTRODUÇÃO	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, PEIXES E DIETAS	34
2.2 CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO ALIMENTO	37
2.3 ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE	37
2.3 ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO PROXIMAL	40
2.4 ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS E ESTERÓIS	40
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 DESEMPENHO, SOBREVIVÊNCIA E ÍNDICES CORPORAIS.....	42
3.2 DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES.....	44
4 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO III: METABOLISMO LIPÍDICO EM TILÁPIAS-DO-NILO MANTIDAS A 22°C E ALIMENTADAS COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM COLESTEROL	55
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 PEIXES, DELINEAMENTO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	60

2.2	ÍNDICES SOMÁTICOS	62
2.3	COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO HEPATOPÂNCREAS	62
2.4	DETERMINAÇÃO DE LIPIDOGRAMA.....	62
2.5	ALTERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS DO HEPATOPÂNCREAS.....	63
2.6	ANÁLISES MOLECULARES	63
2.6.1	Extração de RNA_t e síntese de cDNA por transcrição reversa	64
2.6.2	Desenho de iniciadores e reações de qPCR.....	64
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	ÍNDICES SOMÁTICOS	66
4.2	COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO HEPATOPÂNCREAS	67
4.3	LIPIDOGRAMA	68
4.4	ALTERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS NO HEPATOPÂNCREAS.....	71
4.5	RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS	74
5	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	CONCLUSÕES GERAIS.....	82
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	83

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 TILAPICULTURA E DESAFIOS CLIMÁTICOS

A tilápia-do-nilo é uma espécie tropical de águas continentais, sendo a terceira mais produzida mundialmente e a principal no Brasil, representando 63,9% da piscicultura nacional brasileira (FAO, 2022; PEIXE-BR, 2023). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia-do-nilo depois da China, Indonésia e Egito, apresentando maior concentração de produção nos estados de Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina, que incluem regiões com clima subtropical (PEIXE-BR, 2023). Este clima caracteriza-se por grande oscilação de temperatura, principalmente entre o verão e o inverno, ocasionando estresse por baixa temperatura para a tilápia, fato que limita a expansão da sua criação (NOBREGA *et al*, 2020).

Assim, algumas estratégias têm sido aplicadas com vista a minimizar os efeitos negativos à produção causados pelo estresse térmico na tilapicultura, principalmente nos meses mais frios do ano como: (1) uso de estufas (HEPHER e PRUGININ, 1981), (2) aquecimento da água e uso de águas geotermiais (PULLIN, 1991), (3) aumento da profundidade de tanques escavados (EL-SAYED *et al*, 1996; LIN, 1991), e (4) cobertura de tanques com polietileno (EL-SAYED *et al*, 2006; MABDEL-AAL, 2008).

A temperatura exerce um papel importante no metabolismo lipídico em peixes (TURCHINI, NG, TOCHER, 2010). Porém, são limitadas as pesquisas com enfoque nas exigências nutricionais para mitigar estresse por baixa temperatura. Neste contexto, estudos promissores demonstram que a genética e a nutrição podem também afetar o desempenho da tilápia em temperaturas subótimas (NOBREGA *et al*, 2020). Após avaliação do crescimento de diferentes estoques de juvenis de tilápia-do-nilo submetidos a baixa temperatura, foram selecionados peixes mais tolerantes ao frio (22 a 24 °C), além de identificados alelos de marcadores de microssatélites associados a tolerância térmica. Ainda nesse estudo, foi possível identificar grupo de peixes que resultou em progênie mais tolerante ao frio, demonstrando ser possível a seleção de próximas gerações de linhagens mais tolerantes a frio para a tilápia-do-nilo (DA SILVA *et al*, 2020). Por outro lado, a nutrição pode igualmente contribuir para melhorar a tolerância térmica em peixes conforme já demonstrado para peixes de água doce como o bagre de canal e truta arco-íris (MURRAY *et al*, 1977; MÉDALE *et al*, 1995) ou marinhos, como salmão do Atlântico e dourado (JOBLLING e BENDIKSEN, 2003; RICHARD *et al*, 2016). Para o efeito, a composição da dieta tem sido determinante no enfrentamento ao frio, por meio do ajuste em relação ao perfil de ácidos graxos poli-insaturados (CORRÊA *et al*, 2017, 2018; NOBREGA *et al*, 2017, 2019), a suplementação de fosfolípidios (BAPTISTA *et*

al., 2023; HAZEL e WILLIAMS, 1990), ou de colesterol (SISSENER *et al.*, 2017a). Tradicionalmente, tilápias criadas em temperatura ótima apresentam exigência dietética em ácidos graxos de cadeia média como o alfa-linolênico (18:3 n-3, α -LNA) e ácido linoleico (18:2 n-6, LOA) (CHEN *et al.*, 2013; TAKEUCHI *et al.*, 1983). Estudos recentemente conduzidos em temperatura baixa, mostram melhora no crescimento e eficiência alimentar em tilápias-do-nilo alimentadas com dietas contendo fontes de ácidos graxos poli-insaturados da série n-3 (PUFAs n-3) (CORRÊA *et al.*, 2017, 2018; NOBREGA *et al.*, 2019), em comparação com peixes alimentados com outras fontes de lipídios ricos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia média como alfa linolênico ou linoleico (α -LNA ou LOA).

Tilápias apresentaram aumento de 18% em ganho em peso quando alimentadas com óleo de peixe rico em ácidos graxos de cadeia longa, (de 20 a 22 carbonos com mínimo de duas insaturações) da série n-3 (LC PUFA n-3) em comparação com peixes alimentados com dietas contendo mistura de óleos vegetais ricos em LOA ou α -LNA (CORRÊA *et al.*, 2018). Em outro estudo a 22 °C, a utilização da farinha de *Aurantiochytrium* sp. como ingrediente alternativo à farinha de peixe e rico em ácido graxo poli-insaturado da série n-3 (22:6 n-3, DHA), melhorou o crescimento e composição em ácidos graxos de juvenis de tilápia-do-nilo mantidos a 22 °C.

Pesquisas sobre o uso de ingredientes lipídicos vegetais alternativos ao óleo de peixe, têm igualmente se mostrado importantes para o crescimento de peixes em condições de temperatura subótima baixa (ABDEL-GHANY *et al.*, 2019; CORRÊA *et al.*, 2017, 2018; EL-ASELY *et al.*, 2020; NOBREGA *et al.*, 2017, 2019). Entretanto, pouco ou quase nada se sabe sobre o efeito da suplementação de colesterol em dietas sobre o crescimento, digestibilidade e metabolismo de tilápias criadas em condições de temperatura subótima.

No geral, dietas com altos níveis de ácidos graxos saturados (SFA), ou seja ácidos graxos sem nenhuma insaturação na cadeia de carbonos, contribuem para a redução da fluidez e aumento da viscosidade de óleos, afetando dessa forma a digestibilidade de lipídios e metabolismo em peixes. Vários estudos mostram claramente que uma dieta rica em SFA, compromete o crescimento da tilápia-do-nilo em temperatura subótima (TAKEUCHI *et al.*, 1983; NG *et al.*, 2004; TURCHINI *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2017; ABDEL-GHANY *et al.*, 2019). A baixa digestibilidade de dietas com alta inclusão de saturados pode explicar o baixo crescimento da tilápia-do-nilo a 22 °C quando alimentados com dietas ricas em óleo de coco (CORRÊA *et al.*, 2017). De acordo com Turchini *et al.* (2019), dietas ricas em SFA perdem menos gordura para a água devido ao seu alto ponto de fusão, o que pode igualmente comprometer a digestibilidade e absorção de nutrientes pelos peixes.

Quando avaliada a digestibilidade de grupos de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), ou seja, com apenas uma insaturação na cadeia carbônica e SFA da farinha de *Aurantiochytrium* sp. de tilápia-do-nilo a 22 °C, foram registradas baixas digestibilidades, nomeadamente de 15 e 52%, respetivamente. Dentre os saturados, a digestibilidade do ácido palmítico (16:0) reduziu de 70,81% a 28 °C (FERNANDES *et al*, 2019) para 52,25% a 22 °C (NOBREGA *et al*, 2019). Houve também redução da digestibilidade em 20% da proteína da farinha de *Aurantiochytrium* sp. a 22 para 28 °C, para tilápia-do-nilo (NOBREGA *et al*, 2019). A 22 °C, todos PUFAs na farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram alta digestibilidade, quer em temperatura ótima ou subótima de 22 °C, variando de 96 a 100% (NOBREGA *et al*, 2019). Resultados similares foram reportados para o salmão do Atlântico, quando mantidos a 8.8 °C, temperatura abaixo da ótima para a espécie (KOUSOULAKI *et al*, 2016). Estes achados demonstram a importância de incluir fontes de PUFAs nas formulações comerciais para tilápia-do-nilo criadas em temperatura baixa. Dietas com alta inclusão de SFA pode reduzir a digestibilidade de ácidos graxos monoinsaturados, MUFA, PUFA e lipídios dietéticos. Este efeito negativo é mais evidente em temperaturas subótimas (NOBREGA *et al*, 2020).

1.1.1 Temperatura e criação de tilápia-do-nilo

A temperatura da água é um fator extrínseco importante que influencia diretamente o comportamento e bem-estar de organismos ectotérmicos como os peixes (LU *et al*, 2019; SAUCEDO *et al*, 2004). Em geral, as temperaturas mais frias reduzem a taxa metabólica e as atividades bioquímicas, afetando a fisiologia e crescimento dos peixes, que ficam sujeitos ao estresse, principalmente quando a temperatura ambiente excede sua capacidade de tolerância térmica (DONALDSON *et al*, 2008). Dentre os peixes de águas continentais, a tilápia-do-nilo apresenta maior crescimento na faixa térmica ideal de 26 a 30 °C (AZAZA *et al*, 2008; MA *et al*, 2015). Abaixo da temperatura ideal, há redução significativa no crescimento desta espécie (CORRÊA *et al*, 2017, 2018). Abaixo de 20 °C, há uma drástica redução da ingestão de alimento que, aos 16 °C, pode cessar; já aos 12 °C, mortalidades severas podem ocorrer, sendo que em temperaturas inferiores a 10 °C, a tilápia-do-nilo é incapaz de sobreviver por muito tempo (BALARIN e HALLER, 1982; CHERVINSKI, 1982; DA SILVA *et al*, 2020; EL-SAYED, 2006). Entretanto, importa salientar que a capacidade de tolerância térmica varia conforme a linhagem da tilápia, o tipo de manejo e da nutrição (ABDEL-GHANY *et al*, 2019; MA *et al*, 2015; NOBREGA *et al*, 2020).

1.1.2 Efeito da temperatura na digestão e absorção de lipídios

Os lipídios são fontes de esteróis, ácidos graxos e são veículos importantes para a absorção de vitaminas lipossolúveis (HERTRAMPF e PIEDAD-PASCUAL, 2000). Os lipídios são geralmente bem digeridos pelos peixes, porém os ácidos graxos são absorvidos em taxas diferentes (HERTRAMPF e PIEDAD-PASCUAL, 2000; TURCHINI, NG, TOCHER, 2010). Os lipídios dietéticos atendem a funções vitais importantes na nutrição de peixes, entretanto seu potencial é limitado pelo seu grau de digestibilidade, que é a proporção de nutrientes ingeridos que transitam do lúmen intestinal para a circulação (TURCHINI, NG, TOCHER, 2010).

A digestão dos lipídios inicia com a hidrólise dos triacilgliceróis por meio de lipases, sendo que o produto da digestão é misturado com sais biliares para formação de micelas, absorvidas por meio da mucosa intestinal (TOCHER, 2003; TURCHINI, NG, TOCHER, 2010). A composição da dieta e a adaptação do animal à temperatura da água, são os principais fatores que influenciam a digestão. Em peixes, a absorção intestinal de ácidos graxos decresce com o tamanho da cadeia dos ácidos graxos e aumenta com o seu grau de insaturação. A digestibilidade de lipídios é também afetada pela temperatura de fusão, já que quanto maior a temperatura de fusão, menor a digestibilidade (HERTRAMPF e PIEDAD-PASCUAL, 2000). Nesse aspecto, a composição de ácidos graxos, o grau de insaturação e comprimento da cadeia, determinam a sua temperatura de fusão e, portanto, seu potencial digestivo em peixes, dependendo da temperatura de criação. Ainda, quanto maiores o comprimento e saturação da cadeia de ácidos graxos, menor a digestibilidade. Normalmente, ácidos graxos da série n-3 são preferencialmente absorvidos em relação aos ácidos graxos da série n-6 (TURCHINI, TORTENSEN, NG, 2009).

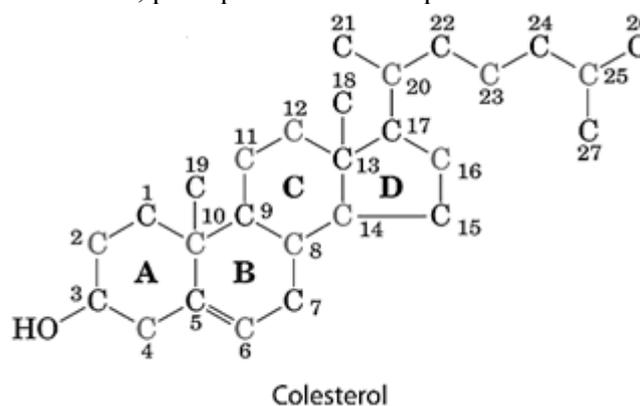
Assim, qualquer alteração na composição de fontes lipídicas em dietas para peixes pode também afetar a digestibilidade de outros nutrientes, tais como proteína (DE SILVA e ANDERSON, 1995; TURCHINI, TORTENSEN, NG, 2009). A substituição do óleo de peixe por mistura de óleos vegetais, em dietas semi-purificadas lipoproteicas e isolipídicas para juvenis de bacalhau Murray (*Maccullochella peelii peelii*), resultaram na redução da digestibilidade aparente de lipídio (95,0 a 90,8%) e da proteína (de 96,6 a 94,3%) (FRANCIS *et al*, 2007).

1.2 COLESTEROL

1.2.1 Importância do colesterol no funcionamento das membranas plasmáticas

O colesterol é constituinte essencial de células eucarióticas e exerce efeito sobre as propriedades físicas e funcionais das membranas plasmáticas, participando ativamente na regulação da membrana plasmática em condições de adaptação térmica (HAZEL e WILLIAMS, 1990; NOBREGA *et al*, 2020). Nas membranas, o colesterol interage com as diferentes classes fosfolipídicas e de esfingolipídios, tendendo a formar pequenos agregados com moléculas lipídicas mais saturadas, graças a sua estrutura química apolar (OHVO-REKILÄ *et al*, 2002). Na maioria das células eucarióticas, existe uma molécula de colesterol a cada dez moléculas de fosfolipídios (TURCHINI, TORTENSEN, NG, 2009). O colesterol é composto por um esqueleto de anel fundido tetracíclico, uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6, uma cadeia lateral de hidrocarboneto isoctil no carbono 17, além de um grupo hidroxila no carbono 3, (Figura 1), que proporcionam a esta molécula, características anfipáticas na membrana plasmática (OHVO-REKILÄ *et al*, 2002; HAZEL e WILLIAMS, 1990). Na membrana, o grupo hidroxila do colesterol fica orientado para a parte mais externa, junto com a fração polar dos fosfolipídios, sendo que a parte apolar fica orientada para a parte interna da membrana, junto com diferentes cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios (HAZEL e WILLIAMS, 1990). Há evidências baseadas em modelos de membranas, indicando que o colesterol tem baixa afinidade por ácidos graxos insaturados (BACH e WACHTEL, 2003; PIKE 2006).

Figura 1 - Estrutura do colesterol. Os anéis individuais do sistema de anéis fundidos (A a D) é que formam o anel esteroide, o qual é responsável por conferir rigidez à molécula do colesterol, principalmente em temperaturas mais frias.



Fonte: Adaptado de NELSON e COX (2014).

O metabolismo do colesterol envolve quatro etapas: biossíntese, absorção, esterificação e degradação (LUO *et al*, 2020). A síntese do colesterol inicia a partir do acetado

e envolve reações químicas que incluem pelo menos vinte enzimas, a maioria das quais localizadas na membrana do retículo endoplasmático. O colesterol é sintetizado por meio de reações enzimáticas complexas, com custo metabólico relativamente alto, o que pode afetar o status energético dos peixes, aspecto crítico-vital em condições de estresse térmico (NOBREGA *et al*, 2020; HAZEL e WILLIAMS, 1990). Diferentemente de invertebrados como os crustáceos, os peixes não necessitam de uma fonte dietética de colesterol, uma vez que podem produzi-lo a partir do acetato (DENG *et al*, 2010; NRC 1993; SEALEY *et al*, 2001; TOCHER *et al*, 2008). Este fato pode ter limitado, por algum tempo, as pesquisas sobre o possível benefício da suplementação dietética de colesterol no desempenho zootécnico em peixes, em condições desfavoráveis para o crescimento, tais como em temperaturas subótimas (BJERKENG *et al*, 1999; SEALEY *et al*, 2001; TWIBELL e WILSON 2004). Neste sentido, se torna importante entender o possível efeito do colesterol como suplemento exógeno em dietas para peixes.

Mudanças na temperatura ambiente impactam diretamente os peixes, já que estes não mantêm sua temperatura corporal constante. Essas mudanças da mesma forma, afetam o funcionamento das suas membranas plasmáticas, proporcionando a estas um estado de fluidez específico, o qual pode ser mais ou menos líquido (OHVO-REKILÄ *et al*, 2002). De forma a manter a homeostase fisiológica em temperaturas baixas e desfavoráveis, os peixes podem aumentar os níveis de insaturação dos ácidos graxos dos fosfolipídios que constituem suas membranas celulares, mantendo assim a fluidez e permeabilidade necessárias para o melhor funcionamento celular (NOBREGA *et al*, 2020; TURCHINI, NG, TOCHER, 2010). Este processo é conhecido como adaptação homeoviscosa e é uma resposta adaptativa importante de muitos ectotérmicos, como os peixes (ATWOOD *et al*, 2003; CRAIG *et al*, 1995; CROCKETT e HAZEL, 1995; FRACALOSSO e LOVELL, 1995; WALLAERT e BABIN, 1994). Na membrana de organismos ectotérmicos, a reestruturação dos fosfolipídios é um mecanismo comum que assegura a estabilidade da funcionalidade da membrana em diferentes temperaturas.

As mudanças na distribuição relativa das classes de fosfolipídios (por exemplo, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol) da membrana celular, tem sido estudada como mecanismos potenciais de adaptação homeoviscosa (COSSINS e SINENSKY, 1984; CROCKETT e HAZEL, 1995; HAZEL e WILLIAMS, 1990). O colesterol pode aumentar a separação lateral dos lipídios presentes na bicamada, independentemente de sua composição ser mais simples ou complexa. Entretanto, pouca atenção tem sido dada ao potencial papel do colesterol na adaptação térmica das membranas

biológicas em peixes. Em temperaturas baixas, a bicamada lipídica tende a formar um estado de gel, ou seja mais denso, e permanece mais compacta; à medida que a temperatura aumenta, a bicamada favorece o movimento tridimensional das moléculas lipídicas e o espaço interior entre os dois folhetos torna-se mais fluido. É o estado de troca de fase gel/fluido que permite o movimento horizontal e vertical dos lipídios e de outros componentes da membrana (DOLGANIUC, 2011). O estado de fase líquido se difere do estado de fase gel, por apresentar cadeias de ácidos graxos com maior insaturação, conferindo assim maior mobilidade de nutrientes, metabólitos e energia na bicamada celular (CROCKETT e HAZEL, 1995; OHVOREKILÄ *et al*, 2002).

1.2.2 Colesterol em dietas para peixes

Com a atual estagnação das capturas pesqueiras tem sido reduzida a inclusão dietética de farinha e óleo de peixe, principalmente em dietas comerciais para a tilápia-do-nilo. Assim, há maior inclusão de ingredientes alternativos de origem vegetal, o que acaba reduzindo os níveis dietéticos de colesterol, presente somente em ingredientes de origem animal (TOCHER 2003). Normalmente, dietas formuladas para peixes que utilizam a farinha e óleo de peixe, fornecem pelo menos 1 g de colesterol por quilo de dieta (TOCHER *et al*, 2008). Ensaios experimentais com suplementação de colesterol em peixes (Quadro 1) têm sido normalmente realizados com fontes sintéticas, de forma a contornar a grande variação do nível deste nutriente encontrada nas fontes animais tradicionais como farinha de vísceras de frango, farinha de carne e ossos ou farinha de peixe, sem causar variação do teor de lipídio entre as dietas (TOCHER *et al*, 2008).

Estudos demonstram que peixes alimentados com dietas a base de ingredientes de origem vegetal, em substituição a farinha ou óleo de peixe, apresentam melhor desempenho zootécnico quando as dietas são suplementadas com doses moderadas de colesterol (Quadro 1). Entretanto, nenhum trabalho com suplementação dietética de colesterol para peixes foi realizado em temperatura subótima de crescimento. Ainda assim, estudos realizados em temperatura ótima de criação, evidenciam até certo ponto, o papel importante da suplementação do colesterol em dietas para a criação de peixes; entretanto, o seu efeito em nível fisiológico e molecular, precisa ser mais bem esclarecido (TOCHER *et al*, 2008; ZHU *et al*, 2018).

Quadro 1 - Resumo de trabalhos realizados com suplementação de colesterol em dietas para diferentes espécies de peixe: temperatura, duração, doses e principais resultados.

Espécie (peso inicial)	Temperatura ¹ °C	Período, dias	Colesterol dietético, % (doses testadas) ²	Principais resultados	Referência
Bagre americano, <i>Ictalurus punctatus</i> (9,70 g)	27	56	1% de colesterol em dietas com alta inclusão de farelo de soja (55%) e dieta controle sem colesterol.	Peixes alimentados com dietas contendo colesterol, apresentaram maior ganho em peso e eficiência alimentar.	TWIBELL e WILLSON (2004)
Carpa-capim, <i>Ctenopharyngodon idella</i> (225,37 g)	28,5	60	0,04; 0,33; 0,64; 0,93; 1,24 e 1,53	Suplementação com colesterol comprometeu a imunidade e agravou a resposta pró-inflamatória.	WANG <i>et al.</i> (2018)
Garoupa, <i>Epinephelus lanceolatus</i> (12, 39 g)	29	56	0 e 1,0	1% proporcionou maior consumo, ganho em peso e eficiência protéica.	WU <i>et al.</i> (2019)
Linguado, <i>Scophthalmus maximus</i> (5,84 g)	19 to 22	63	0; 0,5; 1 e 1,5% em dietas contendo farelo de soja	1,0% proporcionou maior consumo e ganho em peso, e acúmulo colesterol no plasma e hepatopâncreas.	YUN <i>et al.</i> (2011)
Linguado (5,18 g)	15 to 18	70	0,38; 0,76; 1,30; 1,80 e 2,22	Maior ganho em peso em peixes alimentados com dietas contendo 1,30; 1,8 e 2,2% de colesterol.	ZHU <i>et al.</i> (2014)
Tilápia-do-nylo, <i>Oreochromis niloticus</i> (2,20 g)	32	56	0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,4	0,4% de colesterol, proporcionou maior ganho em peso e melhor conversão alimentar.	XU <i>et al.</i> (2018)
Tilápia-do-nylo (1,63 g)	28	56	0, 0,8; 1,6; 2,4 e 3,2	1,6% reduziu a síntese de colesterol e aumentou a expressão de genes relacionados à lipogênese.	LI <i>et al.</i> (2023)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i> (58 g)	14-18	63	0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5	Suplementação proporcionou maior acúmulo de colesterol e lipídio total no hepatopâncreas.	DENG <i>et al.</i> (2013a)
Truta arco-íris (58 g)	14-18	63	0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2 e 1,5	0,9 e 1,2%, melhoraram a capacidade antioxidante e resistência a infecção por <i>A. hydrophila</i> .	DENG <i>et al.</i> (2013b)

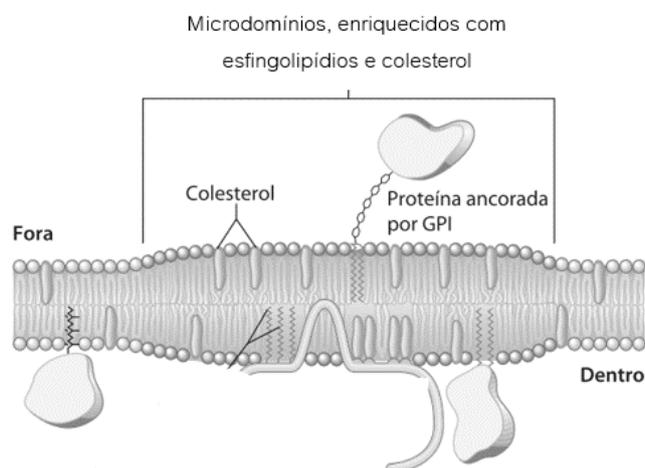
¹ Todos os experimentos foram conduzidos dentro ou acima da faixa ótima de temperatura de crescimento.

1.2.3 Efeito do colesterol na absorção de nutrientes

A composição de ácidos graxos e esteróis das células intestinais pode ser diretamente modulada pela composição lipídica da dieta (CHRISTON *et al*, 1991). Os enterócitos, células pelas quais os nutrientes são absorvidos, apresentam composição lipídica específica e, portanto, crítica, dependendo da temperatura. Tal como em mamíferos, a absorção intestinal de colesterol em peixes é um processo integrado que inclui pelo menos três etapas principais: (1) solubilização nas micelas intestinais; (2) transporte através da membrana apical de enterócitos e (3), mobilização por quilomícrons para secreção na linfa e no sangue, através da membrana basolateral dos enterócitos. O colesterol tem um papel regulador na membrana plasmática dos enterócitos, pois induz a um estado intermediário de organização e distribuição das moléculas fosfolipídicas com as quais interage (NOBREGA *et al*, 2020; OHVO-REKILÄ *et al*, 2002).

Outra adaptação importante das membranas plasmáticas dos enterócitos é a formação de microdomínios ou aglomerados de moléculas específicas nas membranas plasmáticas, tais como proteínas, fosfolipídios e colesterol (Figura 2). Este processo é impulsionado por interações lipídio/lipídio como consequência de suas propriedades físicas, que podem ser condicionadas por sua temperatura de fusão, que é o ponto em que os lipídios passam, por exemplo de seu estado de fase gel para um estado mais líquido (OHVO-REKILÄ *et al*, 2002; PIKE, 2006; SHAIKH e EDIDIN, 2006). Uma vez que o colesterol afeta as propriedades da membrana plasmática dos enterócitos, pode também influenciar a absorção de nutrientes, ou seja, o comportamento e funções das proteínas associadas à membrana (canais de transporte, receptores, enzimas), cujo funcionamento adequado é crucial na adaptação térmica celular e bem-estar animal (OHVO-REKILÄ *et al*, 2002).

Figura 2 - Formação de microdomínios (“*rafts*”), que são domínios pequenos (10-20 nm), heterogêneos, altamente dinâmicos, enriquecidos com colesterol e esfingolípídios. Estes domínios compartimentam os processos celulares ao longo da membrana plasmática, podendo formar plataformas maiores por meio de interações lipídio-lipídio ou proteína-lipídio.



Fonte: Adaptado de NELSON e COX (2014).

Os lipídios que se agrupam firmemente têm uma alta temperatura de fusão, enquanto os que têm uma temperatura de fusão baixa, favorecem uma fase mais fluida. Moléculas ricas em cadeias acil longas e saturadas tendem a ter um posicionamento mais próximo entre eles, aumentando, por conseguinte, sua temperatura de fusão. Isto promove a formação de aglomerados ao longo das membranas celulares (OHVO-REKILÄ *et al*, 2002). De fato, bicamadas de lipídios poli-insaturados tendem a excluir o colesterol (SHAIKH e EDIDIN 2006; PIKE 2006). Por outro lado, a membrana plasmática das microvilosidades dos enterócitos constitui em si um reservatório considerável de colesterol, onde compõe cerca de um terço dos lipídios, encontrando-se densamente empacotado (NAKANO, INOUE, MURAKOSHI, 2019). Estes fatos: (1) alta temperatura de fusão do colesterol e (2) presença de colesterol nas microvilosidades, evidenciam a necessidade de especial atenção em estudos com suplementação dietética de colesterol para peixes, principalmente em temperaturas mais frias.

1.2.4 Respostas moleculares ao consumo de colesterol

São poucos os relatos sobre respostas moleculares em peixes submetidos ao estresse por baixas temperaturas (JUN *et al*, 2014; YANG *et al*, 2015). Após o consumo de colesterol dietético, há normalmente aumento da expressão da proteína NPC1L1 (*Niemann–Pick C1-like 1*), principal reguladora do processo de absorção do colesterol e outros esteróis, como os fitosteróis, nos enterócitos (BETTERS e YU, 2010). Entretanto, diferente de estudos em

humanos, em peixes são limitados os estudos sobre as respostas moleculares da proteína NPC1L1. No fígado em humanos ou nos hepatopâncreas em peixes como as tilápias, a HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase) é a enzima reguladora da síntese de colesterol (MAITA *et al*, 2006; ZHU *et al*, 2014). Ocorre ainda no hepatopâncreas a degradação ou conversão do colesterol em ácido biliar pela 7 α hidroxilase, conhecida como CYP7A1 (MATSUMOTO *et al*, 2005; YUN *et al*, 2011; ZHU *et al*, 2014).

O transporte de colesterol entre os tecidos e órgãos ocorre com o auxílio de lipoproteínas específicas. Dentre elas, se destacam a lipoproteína de baixa densidade (LDL), que transporta o colesterol do hepatopâncreas para os tecidos periféricos e a lipoproteína de alta densidade (HDL), que transporta colesterol dos tecidos periféricos para o hepatopâncreas (CHEN *et al*, 2003; DENG *et al*, 2010).

Em situações de excesso de colesterol no sangue, resultado da síntese ou mesmo da absorção, ocorre a esterificação do colesterol por ação da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT), presente no hepatopâncreas. Nessas situações, o colesterol esterificado pode retornar ao intestino, ser reabsorvido ou mesmo excretado. Em humanos e em peixes, já foi relatado que a eliminação do colesterol ocorre principalmente por meio da excreção direta do colesterol em si, quando em excesso e por meio da sua degradação em ácidos biliares (DIETSCHY 1984; LI *et al*, 2023).

Portanto, a integração desses processos metabólicos sugere algum tipo de regulação dos níveis de colesterol corporal e plasmático nos animais, como já relatado em alguns trabalhos com salmão do Atlântico, *Salmo salar* (LILAND *et al*, 2013; KORTNER *et al*, 2014; SISSENER *et al*, 2017a, 2017b). Em estudo testando diferentes níveis de colesterol dietético em truta arco-íris (DENG *et al*, 2013), foi verificada uma tendência de redução nas atividades enzimáticas relacionadas com a biossíntese, degradação e esterificação do colesterol, com sua suplementação dietética (0,3 a 0,9 %), sugerindo serem atividades altamente responsivas ao colesterol dietético. Os processos de absorção, síntese, degradação, esterificação, transporte, distribuição, entre outros, são complexos e interrelacionados, mas ainda pouco estudados em peixes criados em temperaturas subótimas.

1.3 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o efeito da suplementação crescente de colesterol em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo criados em temperatura subótima de 22 °C.

Objetivos específicos

- Avaliar o ganho em peso, eficiência alimentar, composição proximal do corpo inteiro.
- Avaliar o perfil corporal de ácidos graxos e colesterol.
- Determinar os coeficientes de digestibilidade aparente de nutrientes.
- Avaliar os índices hepatossomático e viscerossomático.
- Relacionar as concentrações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis e HDL circulantes no plasma à morfologia e composição proximal do hepatopâncreas.
- Analisar as vias de absorção, biossíntese e catabolismo do colesterol através de análises de transcritos de genes específicos.

CAPÍTULO II: COLESTEROL REDUZ A DIGESTIBILIDADE DA DIETA SEM AFETAR O CRESCIMENTO DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO CRIADOS EM TEMPERATURA SUBÓTIMA DE 22 °C

Jorge Filipe Banze ^a, Renata Oselame Nobrega ^a, Bruna Mattioni ^b, Bianca Letícia Richter ^a, James Eugene Pettigrew ^c, Débora Machado Fracalossi ^{a*}

^a Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

^b Kansas State University, Manhattan, KS, USA

^c Pettigrew Research Services, Tubac, AZ, USA

*Autor correspondente. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: debora.fracalossi@ufsc.br

Este artigo foi formatado de acordo com as normas da ABNT.

RESUMO

Animais ectotérmicos como os peixes são diretamente afetados por mudanças na temperatura da água o que pode levar a uma diminuição significativa no crescimento. O colesterol desempenha um papel essencial na membrana plasmática dos peixes, reestruturando as classes de fosfolipídios da membrana para garantir seu funcionamento adequado em diferentes temperaturas. Assim, o presente estudo avaliou o efeito da suplementação dietética de colesterol no crescimento, composição corporal, perfil corporal de ácidos graxos e colesterol, além da determinação da digestibilidade de nutrientes, em tilápias-do-nilo criadas em temperatura subótima (22 °C), simulando condições de outono e primavera de regiões subtropicais. Dois ensaios foram conduzidos: um ensaio de alimentação, tipo dose-resposta (91 dias), com juvenis ($29,24 \pm 0,02$ g) seguido de outro, de digestibilidade, com peixes maiores ($230,47 \pm 1,51$ g), por 60 dias. Para o ensaio de alimentação, dietas isonitrogenadas e isolipídicas foram formuladas com cinco níveis crescentes de colesterol (0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%) e foram testadas em seis repetições cada. Tais doses foram suplementadas em uma dieta basal prática extrusada, pobre em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA n-3). Duas dietas foram selecionadas para o ensaio de digestibilidade, 0% e 0,25%, as quais foram testadas em triplicata, utilizando-se óxido de ítrio como marcador inerte. A suplementação dietética com colesterol não afetou o crescimento ($P > 0,05$), mas favoreceu acúmulo linear de colesterol no corpo ($P < 0,05$). Da mesma forma, a composição corporal proximal, incluindo matéria seca, proteína, lipídios e cinzas, não foi afetada pela suplementação crescente de colesterol na dieta. No entanto, a digestibilidade da matéria seca, proteína, lipídios e ácidos graxos diminuiu ($P < 0,05$) com a suplementação de 0,25% de colesterol. A suplementação de 0,25% de colesterol na dieta não afetou o crescimento de juvenis de tilápia-do-nilo criados em temperatura subótima, apesar de reduzir a digestibilidade nutrientes selecionados. Este é o primeiro relato sobre o efeito da suplementação dietética de colesterol sobre o crescimento e digestibilidade de nutrientes para tilápia-do-nilo em temperatura subótima.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*; temperatura baixa; colesterol dietético; coeficiente de digestibilidade aparente.

ABSTRACT

Ectothermic animals such as fish are directly affected by changes in water temperature, leading to a significant decrease in growth. Cholesterol plays an important role in the plasmatic membrane of fish, restructuring membrane phospholipid classes to ensure adequate membrane function at different temperatures. Thus, this study assessed the effect of dietary cholesterol supplementation on growth, body proximal composition, fatty-acid and cholesterol body profiles, and digestibility in Nile tilapia reared at cold suboptimal water temperature (22 °C), simulating fall and spring conditions in subtropical regions. Two trials were conducted: a dose-response feeding trial (91 days) with Nile tilapia juveniles (29.24 ± 0.02 g) and a subsequent digestibility trial with the same animals (230.47 ± 1.51 g) for 60 days. For the feeding trial, isonitrogenous and isolipidic diets were formulated with five increasing levels of cholesterol (0%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, and 1.0%), tested in six replicates each. Such doses were supplied in a basal extruded practical diet low in long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA n-3) and were tested in six replicates each. Two diets were selected for the digestibility trial, 0% and 0.25%, and were run in three replicates each, with yttrium oxide as the inert marker. Dietary cholesterol supplementation did not affect growth ($P > 0.05$) but favored a linear accumulation of cholesterol in the body ($P < 0.05$). Likewise, body proximal composition including dry matter, protein, lipid, and ash were not affected by dietary cholesterol inclusions. However, the digestibility of dry matter, protein, lipid, and fatty acids decreased ($P < 0.05$). The supplementation of 0.25% of dietary cholesterol didn't affect although it reduced the digestibility of the selected nutrients. This is the first report on dietary cholesterol supplementation effect on the growth and nutrient digestibility for Nile tilapia raised at suboptimal temperature.

Key-words: *Oreochromis niloticus*; low temperature; dietetic cholesterol; apparent digestibility coefficient.

1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é a terceira espécie de água doce mais criada no mundo e a primeira no Brasil, sua produção tem recebido muita atenção especialmente devido às altas taxas de crescimento, boa textura da carne e excelente sabor (EL-SAYED, 2006; FAO, 2022; Peixe-BR, 2023). A tilápia-do-nilo atinge um ótimo desempenho de crescimento dentro de uma faixa de temperatura de 26 a 30 °C (AZAZA *et al*, 2008). Embora seja uma espécie tropical, a tilápia-do-nilo é produzida em regiões subtropicais em todo o mundo, incluindo no Brasil, onde a principal produção está concentrada em regiões subtropicais como Paraná e São Paulo (NOBREGA *et al*, 2020; Peixe-BR, 2023). A temperatura subótima para o crescimento é um dos grandes desafios enfrentados pelos produtores de tilápia em todo o mundo (AZAZA *et al*, 2008; NOBREGA *et al*, 2020; REDA *et al*, 2020).

Animais ectotérmicos, como os peixes, são diretamente afetados por desvios da temperatura de conforto para a espécie, os quais prejudicam os processos fisiológicos e bioquímicos, levando a uma diminuição significativa no crescimento (CORRÊA *et al*, 2017, 2018; MA *et al*, 2015). O aumento da tolerância ao frio em tilápias-do-nilo criadas em regiões subtropicais resulta em benefício do desempenho zootécnico, reduzindo a mortalidade e perdas econômicas (AZAZA *et al*, 2008; REDA *et al*, 2020). De forma a contornar esse problema, estratégias de manejo têm sido aplicadas para manter a tilápia-do-nilo durante o inverno, incluindo aumento da profundidade e cobertura dos tanques (EL-SAYED *et al*, 2006; MABDEL-AAL, 2008), criação em sistemas de bioflocos (CRAB *et al*, 2009; PÉREZ-FUENTES *et al*, 2013), bem como a seleção de linhagens de peixes mais tolerantes a baixas temperaturas (CNAANI *et al*, 2000; CHARO-KARISA *et al*, 2005; SIFA *et al*, 2002; SILVA *et al*, 2020). Atenção também tem sido dada a algumas estratégias nutricionais - como a suplementação com aditivos alimentares ricos em ácidos graxos insaturados de cadeia longa (LC-PUFA) como o ácido docosahexaenóico (DHA) ou fosfolipídios - com efeitos positivos no crescimento de tilápias-do-nilo criadas em temperatura subótima (BATISTA *et al*, 2023; CORRÊA *et al*, 2017, 2018; CHEN *et al*, 2013; MUFATTO *et al*, 2019; NOBREGA *et al*, 2017; 2020; NG *et al*, 2013; REDA *et al*, 2020; TAKEUCHI *et al*, 1983). No entanto, o papel do colesterol dietético, um constituinte lipídico essencial das membranas plasmáticas e, portanto, crucial para a adaptação térmica dos peixes (CROCKETT e HAZEL, 1995), tem sido pouco estudado em peixes.

Exposições a baixas temperaturas ambientais demandam ajustes na taxa metabólica dos peixes, além da manutenção da fluidez de suas membranas celulares, por meio da adaptação

homeoviscosa (CROCKETT, 1998). O colesterol desempenha um papel importante nesta homeostase, atuando na reestruturação das classes de fosfolipídios, conforme seus diferentes graus de saturação ao longo da membrana, para garantir seu funcionamento adequado mesmo em temperaturas diferentes (CROCKETT e HAZEL, 1995; WANG *et al*, 2018). A aclimação ao frio em peixes está associada a um aumento na proporção entre ácidos graxos insaturados: saturados ligados aos fosfolipídios da membrana (NOBREGA *et al*, 2020; HAZEL e WILLIAMS, 1990). Além disso, o colesterol tem uma influência ordenadora, a qual é particularmente pronunciada em membranas ricas em fosfolipídios saturados em comparação com àquelas ricas em fosfolipídios insaturados (CROCKETT 1998; MERKLE *et al*, 1987; KUSUMI *et al*, 1986).

Estudos para avaliar os efeitos dietéticos do colesterol no crescimento dos peixes são inconclusivos. Trabalhos mostram, por um lado, que quando os peixes são alimentados com dietas ricas em ingredientes vegetais e, conseqüentemente com baixos teores de colesterol, o crescimento é melhorado por uma suplementação dietética moderada de colesterol. Essa melhora no crescimento foi relatada para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, TWIBELL e WILSON, 2004), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*, DENG *et al*, 2013), linguado (*Scophthalmus maximus*, ZHU *et al*, 2018), bem como a própria tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*, XU *et al*, 2018), cujas dietas comerciais são geralmente pobres em LC-PUFA. Por outro lado, foi relatado que a inclusão de colesterol purificado na dieta não afetou o crescimento de truta arco-íris (NORAMBUENA *et al*, 2013; DENG *et al*, 2014), garoupa gigante (*Epinephelus lanceolatus*, WU *et al*, 2019), salmão do Atlântico (*Salmo salar*, BJERKENG e STOREBAKKEN, 1999) e robalo listrado (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*, SEALEY *et al*, 2000).

Nenhum estudo demonstrou ainda o efeito da suplementação dietética de colesterol sobre a digestibilidade de nutrientes, em temperatura subótima para a tilápia-do-nilo. Isto é particularmente importante, considerando-se a redução em ingredientes de origem animal em rações para a espécie nos últimos anos. Uma compreensão mais profunda sobre o processo de digestão em peixes em condições subótimas de temperatura, é crítica para melhorar a eficiência da utilização de nutrientes e crescimento (GILANNEJAD *et al*, 2019; MOCK *et al*, 2022; NORDRUM *et al*, 2003; VALEN *et al*, 2011).

O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar o efeito da suplementação dietética de colesterol no crescimento, composição corporal - incluindo perfil de ácidos graxos, colesterol - e digestibilidade de nutrientes selecionados para tilápias-do-nilo criadas em água com temperatura subótima de 22 °C.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, PEIXES E DIETAS

Dois ensaios foram conduzidos: um ensaio de alimentação, tipo dose-resposta (91 dias) com juvenis de tilápia-do-nilo ($29,24 \pm 0,02$ g, média \pm desvio padrão) seguido de outro, de digestibilidade, com tilápias-do-nilo ($230,47 \pm 1,51$ g), por 60 dias. Para o ensaio de alimentação, dietas isonitrogenadas e isolipídicas foram formuladas com níveis crescentes (0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%) de colesterol de uma fonte 92,5% pura (Sigma, St. Louis, USA). Tais doses foram suplementadas em uma dieta prática extrusada basal e foram testadas em seis repetições cada. Duas dietas foram selecionadas para o ensaio de digestibilidade, 0 e 0,25% sendo testadas em triplicata, com inclusão de óxido de ítrio como marcador inerte.

Juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem *GIFT* (Epagri SC03), sexualmente invertidos para machos, selecionados para temperaturas baixas, foram obtidos da Empresa de Pesquisa, Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI, Camboriú, SC, Brasil). O manejo dos peixes seguiu o protocolo número 5227201021, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC). Os peixes foram inicialmente estocados em quatro tanques de 1000 L (mil litros), conectados a um sistema de recirculação de água doce, equipado com filtros mecânicos e biológicos, suprimento de ar e troca de calor. A vazão de água de entrada nas unidades experimentais variou de 10 a 25 mL s⁻¹, proporcionando a troca de água de, no mínimo, oito vezes o volume total de cada unidade experimental por dia.

O fotoperíodo foi ajustado para um ciclo claro-escuro de 12 h. Após duas semanas, trinta grupos de treze peixes, na densidade de 0,13 L⁻¹, foram distribuídos aleatoriamente em tanques de 100 L e aclimatados às condições experimentais a 28 °C, por uma semana. Na segunda semana, a temperatura da água foi gradualmente reduzida para 22 °C (1 °C por dia) e, a partir da terceira semana de aclimação, a temperatura da água foi mantida a 22 °C. Durante o período de aclimação de três semanas, os peixes foram alimentados com a dieta basal (Tabela 1), sem suplementação de colesterol.

Dietas semelhantes em teores de nitrogênio, energia e lipídios foram formuladas para atender às exigências nutricionais da tilápia-do-nilo (NRC, 2011). Para o ensaio de alimentação, quatro níveis crescentes de colesterol foram suplementados em uma dieta extrusada prática basal, além da dieta controle sem a suplementação. A farinha de vísceras de frango e o óleo de milho foram as principais fontes dietéticas de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA). Proporções semelhantes de SFA, MUFA e n-6 PUFA

foram mantidas nas dietas (Tabela 1). Para evitar interferência no possível efeito do colesterol dietético no desempenho dos peixes, não foram incluídas fontes LC-PUFA n-3 nas dietas experimentais.

Os ingredientes práticos foram moídos (peneira de 1 mm, moinho de martelo), peneirados (0,6 mm, peneira manual), pesados e homogeneizados (misturador horizontal). O óleo foi então incorporado e homogeneizado na mistura. Por fim, a umidade foi ajustada para 30%. As dietas foram produzidas em extrusora de rosca simples, Modelo MX40 (INBRAMAQ, Ribeirão Preto, Brasil). Os parâmetros de extrusão foram os seguintes: temperatura 75 °C, vazão 30% da capacidade nominal, velocidade da rosca 200 x g, relação L/D 2,3/1, diâmetro da rosca 92,5 mm e comprimento do cilindro 210 mm. Após a extrusão, os pellets foram secos em estufa de circulação forçada de ar (50 °C) até atingir 7% de umidade. Ao final foram obtidos *pellets* de 2 e 3 mm, para os ensaios de alimentação e digestibilidade, respectivamente, com 100% de fluabilidade. As dietas foram acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas a 4 °C. Durante o período experimental de 91 dias, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 h) até a saciedade aparente.

O consumo de ração e a mortalidade foram registrados diariamente. Os parâmetros indicadores da qualidade da água foram medidos semanalmente, exceto temperatura da água e oxigênio dissolvido, que foram medidos diariamente. Os valores médios (\pm desvio padrão) foram os seguintes: temperatura $22,08 \pm 0,19$ °C; oxigênio dissolvido $7,74 \pm 0,48$ mg L⁻¹; pH $7,25 \pm 0,08$; salinidade $0,98 \pm 0,09$ g L⁻¹; alcalinidade $41,97 \pm 6,03$ mg L⁻¹; amônia total $0,13 \pm 0,10$ mg L⁻¹; nitrito $0,06 \pm 0,01$ mg L⁻¹ e nitrato $3,68 \pm 0,33$ mg L⁻¹. Estes indicadores estavam dentro dos níveis aceitos para a tilápia-do-nilo (EL-SAYED *et al*, 2006), exceto a temperatura da água, que foi mantida a 22 °C para simular condições de outono-primavera em regiões subtropicais.

Tabela 1 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio de alimentação dose-resposta de colesterol¹.

Ingredientes, g 100 g ⁻¹ peso seco	Suplementação dietética de colesterol, %				
	0,00	0,25	0,5	0,75	1,00
Farelo de soja	38,00	38,00	38,00	38,00	38,00
Farinha de arroz	33,74	33,48	33,21	32,94	32,66
Concentrado proteico de soja	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Farinha de vísceras de frango	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de milho	3,30	3,30	3,30	3,30	3,31
Colesterol ²	0,00	0,26	0,53	0,80	1,07
Fosfato bicálcico	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Premix ³	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Butil-hidroxitolueno	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-metionina	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
L-treonina	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Composição analisada⁴, g 100 g⁻¹ peso seco					
Matéria seca	92,65	91,41	93,07	93,35	91,57
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	4794	4846	4843	4779	4799
Proteína bruta	32,88	31,98	31,74	31,86	32,40
Extrato etéreo	7,65	8,30	8,40	8,39	8,47
Cinzas	6,82	6,83	6,86	6,81	6,90
C16:0	0,93	0,95	0,92	0,91	0,90
C18:0	0,18	0,16	0,15	0,13	0,13
C18:1 n-9	1,67	1,65	1,62	1,63	1,58
C18:2 n-6	2,11	2,09	2,09	2,10	2,08
C20:2 n-6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
SFA ⁵	1,19	1,19	1,16	1,12	1,13
MUFA	2,05	2,05	2,04	2,02	1,98
PUFA	2,12	2,09	2,10	2,11	2,08
PUFA n-6	2,12	2,09	2,10	2,11	2,08
LC-PUFA n-6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
PUFA n-3	nd ⁶	nd	nd	nd	nd
LC-PUFA n-3	nd	nd	nd	nd	nd
Fitosterol	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Colesterol	0,04	0,30	0,58	0,81	1,05

¹ Farinha de arroz e Farelo de soja, adquiridos em CRAVIL (Palhoça, Brasil). Concentrado proteico de soja, fornecido por C.J. Selecta (Araguari, Brasil). Farinha de vísceras de frango fornecido por Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brasil). Óleo de milho fornecido por Bunge Brasil (Gaspar, Brasil). Butil-hidroxitolueno, produzido por

Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brasil). DL-metionina e DL-treonina, produzidos por Evonik Industries AG (Essen, Alemanha).

² Pureza = 92,5%, fornecido por Sigma (St. Louis, USA).

³ Premix vitamínico-micromineral (produzido por DSM, Jaguaré, São Paulo), composição por kg: ácido fólico 2,666,66 mg, ácido pantotênico 2,666,66 mg, biotina 333,33 mg, sulfato de cobalto 27 mg, cobre 3,333,33 mg, sulfato de ferro 20,000 mg, iodeto de cálcio 666,66 mg, sulfato de manganês 1,666,000 mg, niacina 8,333 mg, selenita 100 mg, vitamina (vit.) A 5,333,333 UI, vit. B₁ 6,666,66 mg, vit. B₁₂ 13,33 µg, vit. B₂ 10,000 mg, vit. B₆ 10,000 mg, ácido ascórbico equivalente 100,000 mg, vit. D₃ 1,000,000 UI, vit. E 6,666,66 UI, vit. K₃ 3,333,33 mg, sulfato de zinco 2,660,000 mg, inositol 50,000 g, propionato de cálcio 250,000 mg.

⁴ Ácidos graxos detectados e totalizados em todas as dietas, mas não incluídos na tabela: C8:0, C10:0, C14:0, C16:1 n-7, C17:0, C17:1 n-7, C 18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:0, C20:2 n-6, C22:0, C22:1 n-11.

⁵ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monoinsaturados, PUFA = poli-insaturados, LC-PUFA = poli-insaturados de cadeia longa (≥ 20 carbonos, ≥ 2 ligações duplas).

⁶ Não detectados ($< 0,01$ g 100 g⁻¹ peso seco).

2.2 CRESCIMENTO E AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO ALIMENTO

Os peixes foram pesados individualmente no início e no final do ensaio de alimentação (precisão de 0,01 g). Antes disso, todos os peixes foram mantidos em jejum por 24 h e anestesiados com 100 mg L⁻¹ de Eugenol[®] (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, Brasil). Para as análises de composição proximal de corpo inteiro, ácidos graxos e colesterol, três grupos de 30 peixes foram amostrados no início do ensaio de alimentação e três peixes por unidade experimental foram amostrados no final. Antes da amostragem, os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, eutanasiados por overdose (200 mg L⁻¹) com Eugenol[®].

Dados de biometria e consumo de ração foram usados para calcular as seguintes variáveis: ganho em peso (g) = peso final – peso inicial, ganho em peso diário (g dia⁻¹) = ganho em peso \times dia⁻¹, consumo total de ração (% vivo peso dia⁻¹) = $100 \times \{ [\text{consumo de ração} \times \text{dias}^{-1}] \times [(\text{peso final} + \text{peso inicial}) \times 2^{-1}]^{-1} \}$, eficiência alimentar = $[(\text{ganho em peso}) \times (\text{consumo total de ração})^{-1}]$, retenção de proteína (%) = $100 \times [(\text{proteína corporal final} - \text{proteína corporal inicial}) \times [(\text{ingestão de proteína})]^{-1}]$ e sobrevivência (%) = $100 \times (\text{número final de peixes}) \times (\text{número inicial de peixes})^{-1}$.

2.3 ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE

Para avaliar a digestibilidade da matéria seca, proteína bruta, lipídios, ácidos graxos e colesterol, foram selecionadas a dieta basal, sem colesterol, e a dieta com 0,25% de colesterol, que propiciou o maior ganho de peso numérico dentre todas as dietas. O óxido de ítrio foi adicionado na dieta seca como marcador inerte, substituindo 0,1% da farinha de arroz (Tabela 2). O teor de proteína bruta das dietas de digestibilidade foi maior do que no ensaio anterior, pois foi utilizado um lote diferente de farinha de vísceras de aves; no entanto, o conteúdo proteico e lipídico se manteve semelhante entre as dietas.

Parte dos peixes remanescentes do experimento dose-resposta de colesterol foram novamente aclimatados, sendo agrupados em tanques de 1000 L e alimentados com dieta basal sem colesterol por duas semanas a 28 °C. Estes peixes foram então submetidos ao mesmo protocolo de redução térmica descrito no ensaio de alimentação, em seis tanques cilíndrico-cônicos de 200 L (duas dietas x três repetições), conectados ao sistema de recirculação utilizado no ensaio de alimentação. Oito peixes, na densidade de 0,04 L⁻¹, foram distribuídos por unidade experimental (peso médio 230,47 ± 1,51 g), os quais foram alimentados com as respectivas dietas experimentais por duas semanas. Após esse período, iniciou-se a coleta das fezes por 60 dias.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 h) até a saciedade aparente. Uma hora após a alimentação, as paredes dos tanques foram limpas e aproximadamente 70% da água foi gradualmente renovada. Este procedimento foi realizado para evitar a contaminação das fezes com qualquer resto de ração ou alimento regurgitado pelos peixes, bem como remover qualquer biofilme das paredes dos tanques.

Para coleta, os tanques de 200 L foram equipados com um tubo Falcon de 50 mL, no fundo, para coleta das fezes por decantação. Esses tubos, por sua vez, foram imersos em recipientes isotérmicos com gelo para evitar a degradação microbiana das fezes. Os tubos e o gelo foram sendo trocados a cada 2 h. Feita a limpeza dos tanques, as fezes eram coletadas diariamente das 11h às 15h e das 19h às 7h, com duas e seis coletas por período, respectivamente. Ao final de cada período de coleta, os tubos de coleta com amostras de fezes eram centrifugados por 1 min a 1077 x g e as fezes eram liofilizadas, homogeneizadas e armazenadas a -20 °C até análises posteriores. Tais procedimentos foram anteriormente descritos por Rodrigues *et al* (2011).

Tabela 2 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio de digestibilidade de nutrientes^{1,2}.

Ingredientes, g 100 g ⁻¹ peso seco	Suplementação dietética de colesterol, %	
	0,00	0,25
Farelo de soja	38,00	38,00
Farinha de arroz	33,64	33,38
Concentrado proteico de soja	12,00	12,00
Farinha de vísceras de frango	10,00	10,00
Óleo de milho	3,30	3,30
Colesterol ³	-	0,26
Fosfato bicálcico	1,20	1,20
Premix ⁴	1,00	1,00
Butil-hidroxitolueno	0,10	0,10
DL-metionina	0,26	0,26
L-treonina	0,20	0,20
Sal	0,20	0,20
Óxido de ítrio	0,10	0,10
Composição analisada, g 100 g⁻¹ peso seco		
Matéria seca	92,62	91,73
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	4720	4796
Proteína bruta	37,12	37,33
Extrato etéreo	6,61	6,89
Cinzas	7,51	7,57
C16:0	1,00	1,01
C18:0	0,21	0,21
C18:1 n-9	1,75	1,76
C18:3 n-3	0,02	0,02
SFA ⁵	1,32	1,32
MUFA	2,00	2,01
PUFA	2,13	2,09
PUFA n-6	2,11	2,07
LC-PUFA n-6	0,02	0,02
PUFA n-3	0,01	0,01
LC-PUFA n-3	nd ⁶	nd
n-3 / n-6	0,01	0,01
Fitosterol	0,01	0,01
Colesterol	0,04	0,31

¹ Farinha de arroz e Farelo de soja, fornecidos por CRAVIL (Palhoça, Brasil). Concentrado proteico de soja, fornecido por C.J. Selecta (Araguari, Brasil). Farinha de vísceras de frango fornecido por Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brasil). Óleo de milho fornecido por Bunge Brasil (Gaspar, Brasil). Butil-hidroxitolueno, produzido pela Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brasil). DL-metionina e DL-treonina, produzidos pela Evonik Industries AG (Essen, Alemanha)

² Ácidos graxos detectados e totalizados em todas as dietas, mas não incluídas na tabela: C8:0, C10:0, C14:0, C16:1 n-7, C17:0, C17:1 n-7, C 18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:0, C20:1 n-9, C20:2 n-6, C22:0, C22:1 n-11.

³ Pureza = 92,5%, fornecido por Sigma (St. Louis, USA).

⁴ Premix vitamínico-micromineral (fornecido por DSM, Jaguaré, São Paulo), composição por kg: ácido fólico 2,666,66 mg, ácido pantotênico 2,666,66 mg, biotina 333,33 mg, sulfato de cobalto 27 mg, cobre 3,333,33 mg, sulfato de ferro 20,000 mg, iodeto de cálcio 666,66 mg, sulfato de manganês 1,666,000 mg, niacina 8,333 mg, selenita 100 mg, vitamina (vit.) A 5,333,333 UI, vit. B₁ 6,666,66 mg, vit. B₁₂ 13,33 µg, vit. B₂ 10,000 mg, vit. B₆ 10,000 mg, ácido ascórbico equivalente 100,000 mg, vit. D₃ 1,000,000 UI, vit. E 6,666,66 UI, vit. K₃ 3,333,33 mg, sulfato de zinco 2,660,000 mg, inositol 50,000 g, propionato de cálcio 250,000 mg.

⁵ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monoinsaturados, PUFA = poli-insaturados, LC-PUFA = poli-insaturados de cadeia longa (≥ 20 carbonos, ≥ 2 ligações duplas).

⁶ Não detectados ($< 0,01$ g 100 g⁻¹ peso seco).

O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA), foi calculado por meio da seguinte equação:

$$CDA, \% = 100 - \left[100x \left(\frac{\text{Marcador dieta}}{\text{Marcador fezes}} \right) x \left(\frac{\text{Nutriente fezes}}{\text{Nutriente dieta}} \right) \right]$$

As médias dos indicadores de qualidade da água (média \pm desvio padrão) foram: temperatura $22,04 \pm 0,13$ °C, oxigênio dissolvido $7,36 \pm 0,36$ mg L⁻¹, pH $7,32 \pm 0,40$, salinidade $1,21 \pm 0,13$ g L⁻¹, alcalinidade $87,34 \pm 1,13$ CaCO₃ mg L⁻¹; amônia total $0,07 \pm 0,04$ mg L⁻¹, nitrito $0,07 \pm 0,05$ mg L⁻¹ e nitrato $0,03 \pm 0,13$ mg L⁻¹. Os indicadores de qualidade da água estavam dentro dos níveis aceitos para a tilápia-do-nilo (EL-SAYED *et al*, 2006), exceto a temperatura da água. A vazão de entrada de água foi de 50 mL s⁻¹.

2.3 ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO PROXIMAL

As análises de composição proximal foram realizadas nos ingredientes, dietas experimentais e corpo inteiro, seguindo os procedimentos padronizados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1999): matéria seca, secagem a 105 °C até peso constante, método 950.01; cinzas, incineração a 550 °C, método 942.05; proteína bruta por LECO (método de DUMAS 990.03, fator de conversão de 6,25); análises lipídicas de ingredientes e dietas foram realizadas por Soxhlet, método 920.39C. A energia bruta foi determinada em calorímetro (PARR, modelo ASSY 6200), conforme instruções do fabricante. Nas fezes foram analisadas a matéria seca, proteína bruta, esteróis, ácidos graxos e óxido de ítrio.

2.4 ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS E ESTERÓIS

A quantificação de ácidos graxos nos ingredientes, dietas, corpo e fezes foram realizadas por cromatografia gasosa. Para as análises de ácidos graxos corporais e colesterol, as amostras coletadas foram liofilizadas, homogeneizadas e armazenadas a -20 °C, até a extração dos lipídios. O lipídio foi extraído a frio e quantificado pelo método de Bligh e Dyer

(1959). Os lipídios extraídos foram divididos em duas frações, uma para quantificação de ácidos graxos e outra para quantificação de esteróis.

Para análises de ácidos graxos, o extrato lipídico foi esterificado usando o método de O'Fallon *et al* (2007) e depois separado por um cromatógrafo a gás (AGILENT 7890B, Santa Clara, Califórnia, EUA) com um detector FID, usando uma coluna capilar CP-Sil 88 (AGILENT – 60 m, 0,25 mm, 0,20 µm). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do detector 300 °C; temperatura do injetor 240 °C; temperatura inicial da coluna 120 °C por 10 min, programada para aumentar a uma taxa de 3 °C min⁻¹ até 186 °C, mantida por 5 min e depois aumentada novamente a 3 °C min⁻¹ até a temperatura final de 231 °C. Hélio foi o gás de arraste, com vazão de coluna de 2,5 mL min⁻¹ e a injeção foi realizada no modo Split (1:40). Os ácidos graxos foram identificados com base no tempo de retenção de dois padrões: MIX 37 (37 Component FAME Mix e PUFA n-3, Sigma, Saint Louis, EUA) e óleo de menhaden (SUPELCO, Bellenfonte, Pensilvânia, EUA). As concentrações de ácidos graxos nas amostras foram calculadas de acordo com JOSEPH E ACKMAN (1992), utilizando C23:0 (ácido tricosanóico, Sigma, Saint Louis, EUA) como padrão interno.

A quantificação de esteróis nos ingredientes, dietas, corpo e fezes também foi realizada por cromatografia gasosa. A outra porção do extrato lipídico foi derivatizada conforme descrito por LAAKSO (2005) e separada por cromatógrafo a gás (AGILENT 7890B, Santa Clara, EUA) com detector FID, usando uma coluna capilar HP-5 (Agilent – 30 m, 0,32 mm, 0,25 µm). As condições cromatográficas foram as mesmas aplicadas para a determinação de ácidos graxos. Os esteróis foram identificados com base no tempo de retenção de dois padrões: colesterol (Sigma, Saint Louis, EUA) e estigmasterol (Sigma, Saint Louis, EUA). As concentrações de esteróis nas amostras foram calculadas de acordo com JOSEPH E ACKMAN (1992), utilizando o 5- α -colestan (Sigma, Saint Louis, EUA) como padrão interno.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do ensaio de dose-resposta foram analisados pelo teste de Levene para verificar a homoscedasticidade e pelo teste de *Shapiro-Wilk* para avaliar a normalidade. Foi aplicada análise de regressão para verificar o efeito do colesterol dietético sobre as variáveis de desempenho, utilização de nutrientes, composição proximal, ácidos graxos corporais e perfis de colesterol. Os dados de digestibilidade foram submetidos ao teste t de *Student*. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* 8.0.1 e foi considerado o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESEMPENHO, SOBREVIVÊNCIA E ÍNDICES CORPORAIS

Este é o primeiro estudo avaliando o efeito da suplementação de colesterol dietético sobre o crescimento de juvenis de tilápia-do-nilo em temperatura subótima de 22 °C. No presente estudo, todas as dietas foram prontamente aceitas pelos peixes. No final do ensaio de alimentação, os peixes aumentaram 6,4 vezes o seu peso inicial, apesar da temperatura da água estar abaixo da ideal. A suplementação com colesterol dietético não afetou o ganho em peso, o ganho em peso diário, o consumo de ração, a eficiência alimentar nem a sobrevivência de juvenis de tilápia-do-nilo criados a 22 °C (Tabela 3). Estudos avaliando a adição de colesterol dietético em peixes criados em temperaturas de água abaixo do ideal para tilápias são escassos e geralmente são realizados com espécies naturalmente adaptadas a estas condições. Aqueles conduzidos na faixa de temperatura ideal, são conflitantes, já que em alguns, a suplementação dietética com colesterol favoreceu o desempenho do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, TWIBELL e WILSON, 2004) e tilápia-do-nilo (XU *et al*, 2018), enquanto em outros trabalhos, foi demonstrado que a inclusão de colesterol purificado na dieta não afetou o desempenho de crescimento de truta arco-íris (NORAMBUENA *et al*, 2013), da garoupa gigante (*Epinephelus lanceolatus*, WU *et al*, 2019), do salmão do Atlântico (*Salmo salar*, BJERKENG e STOREBAKKEN, 1999; KORTNER *et al*, 2014) ou robalo listrado (*Morone chrysops x M. saxatilis*, SEALEY *et al*, 2000), quando criados em temperaturas ideais de crescimento.

Embora não tenha sido detectado efeito da inclusão dietética de colesterol sobre o ganho em peso, a eficiência alimentar (de 0,81 a 0,85) foi satisfatória e semelhante à relatada para juvenis de tilápia-do-nilo (0,76 a 0,84) mantidos a 22 °C e alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. dietética, uma fonte rica em DHA (NOBREGA *et al*, 2019).

Tabela 3 - Desempenho, eficiência alimentar, retenção proteica e sobrevivência de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com inclusões crescentes de colesterol por 91 dias, a 22 °C.

Variáveis de desempenho	Suplementação de colesterol na dieta, % ¹					SEM ³	Valor de P ⁴
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00		
	Ganho em peso ² , g	82,89	95,48	85,10	87,07		
Ganho em peso diário, g dia ⁻¹	2,01	2,15	2,03	2,06	1,97	0,03	0,217
Consumo alimentar, % peso vivo dia ⁻¹	2,33	2,28	2,13	2,17	2,28	0,16	0,189
Eficiência alimentar	0,81	0,82	0,84	0,82	0,85	0,01	0,425
Retenção proteica aparente, %	35,23	37,92	39,40	40,67	36,28	3,38	0,079
Sobrevivência, %	94,87	98,72	98,46	100,00	93,59	1,12	0,056

¹ Valores representam a média de seis tanques (13 peixes por tanque) por tratamento.

² Peso inicial = 29,24 g.

³ Erro padrão da média.

A composição corporal proximal (matéria seca, proteínas, lipídios e cinzas) não foi afetada pelas inclusões de colesterol na dieta em temperatura subótima (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição corporal proximal (expressa na matéria úmida) de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com inclusões crescentes de colesterol por 91 dias, a 22 °C.

Fração g 100 g ⁻¹ peso úmido ¹	Suplementação de colesterol na dieta, %						SEM ²	Valor de P
	Inicial	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00		
Matéria seca	3,33	32,64	33,13	31,92	33,68	33,28	0,73	0,412
Proteína	4,45	15,90	16,10	15,82	16,50	15,91	0,18	0,607
Extrato etéreo	5,38	13,19	13,77	12,64	13,76	13,95	0,68	0,167
Cinzas	3,34	3,43	3,47	3,53	3,50	3,53	0,34	0,615

¹ Resultados representam a média de três tanques por tratamento (3 peixes por tanque).

² Erro padrão da média.

Como esperado, o teor de colesterol corporal aumentou, de forma linear, à medida que aumentou a inclusão de colesterol na dieta. Similarmente, em outro estudo, níveis crescentes de colesterol no plasma e no hepatopâncreas também foram relatados para juvenis de linguado (*Scophthalmus maximus*), quando alimentados com níveis crescentes de colesterol na dieta (0,38 a 2,22%) (ZHU *et al*, 2014).

No entanto, a suplementação com colesterol não afetou a composição corporal em ácidos graxos (Tabela 5), mas foi afetada pela composição dietética em ácidos graxos. Os peixes foram capazes de modular seu perfil de ácidos graxos corporais, independentemente da quantidade de suplementação de colesterol.

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos e colesterol corporais (expresso em g 100 g⁻¹ peso seco) de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com inclusões crescentes de colesterol por 91 dias, a 22 °C^{1,2}.

Nutriente	Suplementação dietética de colesterol, %						SEM ³	Valor de P
	Inicial	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00		
C16:0	4,03	9,00	8,87	8,74	8,69	9,68	0,45	0,272
C18:0	0,95	2,54	2,56	2,26	2,28	2,56	0,20	0,604
C18:1 n-9	5,38	13,53	13,42	12,65	12,86	14,21	0,80	0,665
C18:2 n-6	2,03	4,65	5,00	4,79	4,51	4,87	0,24	0,926
C18:3 n-3	0,03	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,01	0,308
C20:4 n-6	0,10	0,34	0,34	0,37	0,30	0,34	0,02	0,640
C20:5 n-3	0,02	nd ⁶	nd	nd	nd	nd	-	-
C22:4 n-6	0,08	0,43	0,42	0,39	0,41	0,46	0,04	0,524
C22:5 n-3	0,01	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,00	0,007
C22:6 n-3	0,04	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,01	0,128
SFA ⁴	5,77	13,24	13,08	12,49	12,53	14,03	0,64	0,524
MUFA	6,71	16,78	16,70	15,81	16,04	17,80	0,88	0,509
PUFA	2,83	6,68	7,02	6,71	6,48	6,95	0,34	0,990
PUFA n-6	2,32	5,69	6,06	5,81	5,52	5,96	0,29	0,974
LC-PUFA n-6	0,29	1,05	1,07	1,01	1,01	1,09	0,08	0,838
PUFA n-3	0,18	0,14	0,14	0,13	0,14	0,15	0,01	0,437
LC-PUFA n-3	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,10	0,01	0,931
n-3/n-6	0,08	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,00	0,058
Colesterol ⁵	0,55	0,34	0,37	0,54	0,75	0,90	0,05	<0,001

¹ Resultados representam a média de três tanques por tratamento (3 peixes por tanque).

² Ácidos graxos detectados e totalizados mas não incluídos na tabela: C8:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:1 n-7, C16:2 n-4, C17:0, C17:1 n-7, C18:1 n-7, C16:3 n-4, C20:0, C20:1 n-9, C18:3 n-4, C20:1 n-11, C18:4 n-3, C20:2 n-6, C22:0, C20:3 n-6, C22:1 n-11, C22:2 n-6, C24:0, C24:1 n-9, C22:3 n-3.

³ Erro padrão da média.

⁴ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monoinsaturados, PUFA = poli-insaturados, LC-PUFA = poli-insaturados de cadeia longa (≥ 20 carbonos, ≥ 2 ligações duplas).

⁵ Equação da regressão linear significativa: colesterol corporal, $y = 0.572x + 0.262$, $R^2 = 0.96$.

⁶ Não detectado ($< 0,01$ g 100 g⁻¹ peso seco).

3.2 DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES

Este é o primeiro estudo avaliando o efeito da suplementação de colesterol dietético na digestibilidade de nutrientes para juvenis de tilápia-do-nylo, sendo que os resultados fornecem uma melhor compreensão do seu efeito na digestibilidade de diferentes nutrientes em temperatura subótima de 22 °C.

Não houve variação no consumo ($P > 0,05$) entre os peixes alimentados com a dieta de 0,25% de colesterol e os alimentados com a dieta controle (1,94 *versus* 1,96% de ganho em peso vivo dia⁻¹). A digestibilidade dos nutrientes selecionados foi negativamente afetada pela inclusão de colesterol na dieta (Tabela 6). Em geral, a digestibilidade da matéria seca total, proteína e lipídio diminuiu com a inclusão de colesterol na dieta. Neste estudo, os coeficientes

de digestibilidade aparente para proteína bruta foram inferiores ($P < 0,05$) quando comparados com os da dieta sem colesterol. Diferente destes resultados, Jin *et al* (2023), relataram maior digestibilidade da proteína bruta ($P < 0,05$) em peixes alimentados com dieta com colesterol (1,6%), mantidos de 21,2 a 32,8 °C. Entretanto, surpreendentemente os peixes alimentados com esta dieta apresentaram menor proteína corporal total e de aminoácidos livres no hepatopâncreas, em relação com os peixes alimentados sem a suplementação de colesterol. Segundo esses autores, este fato pode estar relacionado com o aumento de níveis de transcritos de genes envolvidos no catabolismo de aminoácidos demonstrada em peixes alimentados com dietas com colesterol e especulam ainda que o colesterol pode ter promovido a absorção de proteína, mas também promovendo o catabolismo de aminoácidos livres para fornecimento de energia.

Em relação aos grupos de ácidos graxos, a digestibilidade de SFA, MUFA e PUFA total foi também menor em peixes alimentados com a dieta de 0,25% (Tabela 6). As digestibilidades do ácido palmítico C16:0 e ácido esteárico C18:0 foram menores nos peixes alimentados com a dieta suplementada com colesterol, contribuindo para a menor digestibilidade do grupo SFA. Da mesma forma, a menor digestibilidade do ácido linoleico C18:2 e do ácido α -linolênico C18:3, com suplementação de colesterol dietético, contribuiu para a menor digestibilidade dos grupos n-6 PUFA e n-3 PUFA, respectivamente.

Tabela 6 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de nutrientes selecionados para juvenis de tilápia-do-nilo quando alimentados com rações com ou sem inclusão de colesterol, a 22 °C ^{1,2}.

Fração g 100 ⁻¹ g, peso seco	Suplementação dietética de colesterol, %		Valor de P
	0,00	0,25	
Matéria seca	80,01 ± 0,95	76,20 ± 1,45	0,030
Proteína	90,27 ± 0,76	87,72 ± 0,86	0,010
Lipídio	94,72 ± 0,35	92,56 ± 0,81	0,010
C16:0	93,83 ± 0,27	91,01 ± 0,71	0,003
C18:0	92,50 ± 0,44	89,30 ± 0,71	0,003
C18:1 n-9	97,15 ± 0,10	95,74 ± 0,10	<0,001
C18:2 n-6	98,38 ± 0,04	97,42 ± 0,12	<0,001
C18:3 n-3	96,76 ± 0,42	94,92 ± 0,26	0,003
SFA ³	93,67 ± 0,27	90,80 ± 0,69	0,003
MUFA	97,07 ± 0,11	95,66 ± 0,09	<0,001
PUFA	98,36 ± 0,04	97,41 ± 0,12	<0,001
PUFA n-6	98,38 ± 0,04	97,43 ± 0,12	<0,001
LC-PUFA n-6	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	0,100
PUFA n-3	96,76 ± 0,42	94,92 ± 0,26	0,003
Colesterol	90,21 ± 1,27	92,32 ± 0,86	0,076

¹ Resultados expressos por média de três tanques por tratamento (8 peixes por tanque), Peso inicial: (229.62 ± 0.44 g), média seguida de desvio padrão.

² Ácidos graxos detectados e totalizados, mas não incluídos na tabela: C8:0, C10:0, C14:0, C16:1 n-7, C17:0, C17:1 n-7, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:0, C20:2 n-6, C22:0, C22:1 n-11.

³ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monoinsaturados, PUFA = poli-insaturados, LC-PUFA = cadeia longa PUFA (≥ 20 carbonos, ≥ 2 ligações duplas).

As propriedades químicas e físicas dos lipídios, incluindo a fonte lipídica e a temperatura de fusão dos ácidos graxos, podem influenciar diretamente na digestibilidade dos lipídios em peixes (MENOYO *et al*, 2003; NG *et al*, 2004; TURCHINI, NG, TOCHER, 2010). A digestibilidade dos lipídios diminui com o comprimento da cadeia de ácidos graxos, mas aumenta com o grau de insaturação. A combinação desses fatores é crítica para a ordem preferencial específica de absorção de ácidos graxos em peixes. Dessa forma, a digestibilidade aparente dos ácidos graxos é maior para LC-PUFA, seguido por C18 PUFA, MUFA e SFA, sendo que os SFA são os ácidos graxos menos facilmente digeridos, especialmente em baixas temperaturas (TURCHINI, NG, TOCHER, 2010). De fato, em nosso estudo, o grupo PUFA mostrou maior digestibilidade quando comparado ao grupo SFA, independentemente da suplementação de colesterol. Na dieta com suplementação de colesterol a 0,25%, a digestibilidade de PUFA (97,41%) e MUFA (95,66%) foi maior que a digestibilidade de SFA (90,8%).

Outro aspecto importante a ser considerado são as diferentes temperaturas de fusão do colesterol e dos ácidos graxos. Quanto maior a temperatura de fusão de um lipídio, menor sua digestibilidade, conforme a seguinte ordem: colesterol, SFA, MUFA, PUFA, LC-PUFA, que é muito crítica para a digestibilidade destes lipídios, mais ainda em baixas temperaturas, conforme testado neste estudo. Ainda, a inclusão de colesterol na dieta pode ter aumentado a viscosidade da digesta (TURCHINI, TORTENSEN, NG, 2009; TURCHINI, NG, TOCHER, 2010), reduzindo a taxa de absorção de nutrientes no intestino, especialmente considerando a baixa temperatura e a ausência de ácidos graxos altamente insaturados, n-3 LC-PUFA na dieta.

Registramos que a inclusão de colesterol na dieta diminui a digestibilidade dos macronutrientes para tilápias-do-nilo mantidas em temperaturas abaixo do ideal. No entanto, tal diminuição na digestibilidade não foi suficiente para promover uma diminuição no crescimento dos peixes, considerando o período de crescimento de 91 dias. Ainda, foi observado que o colesterol reduziu a digestibilidade dos nutrientes para a tilápia-do-nilo em temperatura baixa, sendo sugerido alguns mecanismos de ação: (1) aumento da viscosidade da digesta, (2) aumento da rigidez das membranas, resultando em redução do transporte de nutrientes e (3) aumento da concentração de colesterol nas microvilosidades dos enterócitos, local de absorção de todos os nutrientes. Levando isso em consideração, sugere-se que, em condições de criação em temperatura subótima, a suplementação dietética de colesterol, aliada ao baixo teor dietético em n-3 LC-PUFA, contribui para a diminuição da digestibilidade dos macronutrientes e ácidos graxos, conforme demonstrado neste estudo.

Este é o primeiro relato sobre a suplementação dietética de colesterol em tilápia-do-nilo em condições subótimas de temperatura. Mais estudos são necessários para elucidar se a inclusão de colesterol na dieta, juntamente com n-3 LC-PUFA, ou se diferentes proporções de colesterol: n-3 LC-PUFA neutralizariam o efeito negativo do colesterol na digestibilidade dos nutrientes aqui evidenciado. Além disso, valeria a pena investigar como a inclusão de colesterol afeta as propriedades físicas da dieta, a absorção de nutrientes e o metabolismo do colesterol na tilápia-do-nilo quando criada em temperatura fria abaixo do ideal.

4 CONCLUSÕES

O colesterol da dieta não afetou o crescimento de juvenis de tilápia-do-nilo criados em temperatura subótima, apesar de reduzir a digestibilidade da matéria seca, proteína, lipídios e ácidos graxos, quando suplementado a 0,25% da dieta. Portanto, não é recomendada a suplementação de colesterol nas doses testadas no presente estudo, em dietas para a tilápia-do-

nilo criada em temperatura subótima, até que seu efeito na redução da digestibilidade dos nutrientes seja mais bem elucidado.

AGRADECIMENTOS

À Alltech Inc. (EUA) por financiar o presente estudo por meio de uma aliança de pesquisa com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC-Brasil). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), sob o programa TWAS (*The World Academy of Sciences*), pela concessão de bolsa (nº 24/2018) a Jorge F. Banze e de bolsa de produtividade em pesquisa à Débora M. Fracalossi.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, 1999.

AZAZA, M.S.; DHRAIEF, M.N.; KRIEM, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, 98–105, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.05.007>.

BATISTA, R.O.; RICHTER, B.L.; BANZE, J.F.; SCHLEDER, D.D.; SALHI, M.; NOBREGA, R.O.; da SILVA, M.F.O.; MATTIONI, B.; PETTIGREW, J.E.; FRACALOSSO, D.M. Soy Lecithin Supplementation Promotes Growth and Increases Lipid Digestibility in GIFT Nile Tilapia Raised at Suboptimal Temperature. **Fishes**, v. 8, 404, 2023. <https://doi.org/10.3390/fishes808040>.

BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, 181-191, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00103.x>.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, 911–917, 1959. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.

CHARO-KARISA, H.; REZK, M.A.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. **Aquaculture**, v. 249, 115–123, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.029>.

CHEN, C.; SUNA, B.; LI, X.; LI, P.; GUANA, W.; BI, Y., PANA, Q. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: quantification of optimum requirement of dietary

linolenic acid in juvenile fish. **Aquaculture**, v. 416–417, 99–104, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.003>.

CHRISTON, R.; MESLIN, J.C.; THEVENOUX, J.; LINARD, A.; LEGER, C.L.; DELPAL, S. Effects of a low dietary linoleic acid level on intestinal morphology and enterocyte brush border membrane lipid composition. **Reproduction Nutrition Development Journal**, v. 31, 691–701, 1991. <https://doi.org/10.1051/rnd:19910609>.

CNAANI, A.; GALL, G.A.E.; HULATA, G. Cold tolerance of tilapia species and hybrids. **Aquaculture International**, 8, 289–298, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1009299109614>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; MATTIONI, B.; BLOCK, J.M.; FRACALOSSO, D.M. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, 1016–1026, 2017. <https://doi.org/10.1111/anu.12469>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; MATTIONI, B.; FRACALOSSO, D.M. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 497, 82–90, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; MATTIONI, B.; TURCHINI, G.M.; FRACALOSSO, D.M. LC-PUFA endogenous biosynthesis is improved in Nile tilapia fed plant-oil sources at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 562, 738832, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738832>.

CRAB, R.; KOCHVA, M.; VERSTRAETE, W.; AVNIMELECH, Y. Bio-flocs technology application in over-wintering of tilapia. **Aquacultural Engineering**, v. 40, 105–112, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2008.12.004>.

CROCKETT, E.L.; HAZEL, J.R. Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, 1105–1113, 1995. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.5.1105>.

CROCKETT, E.L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**, v. 38, 291–304, 1998. <https://doi.org/10.1093/icb/38.2.291>.

DENG, J.; BI, B.; KANG, B.; KONG, L.; WANG, Q.; ZHANG, X. Improving the growth performance and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soyabean meal-based diets using dietary cholesterol supplementation. **British Journal of Nutrition**, v. 110, 29–39, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004680>.

DENG, J.; ZHANG, X.; LONG, X.; TAO, L.; WANG, Z.; NIU, G.; KANG, B. Effects of dietary cholesterol supplementation on growth and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with cottonseed meal or rapeseed meal. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, 1827–1838, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9971-2>.

EL-SAYED, A.-F.- M. **Tilapia Culture**, 1st ed. (p. 348). Elsevier/ Academic Press, 2006.

- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Towards Blue Transformation. Rome, FAO, 2022. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
- GILANNEJAD, N.; SILVA, T.; MARTÍNEZ- RODRÍGUEZ, G.; YÚFERA, M. Effect of feeding time and frequency on gut transit and feed digestibility in two fish species with different feeding behaviours, gilthead seabream and *Senegalese sole*. **Aquaculture**, v. 513, 734438, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734438>.
- JIN, G.; ZHANG, L.; MAI, K.; CHEN, X.; XU, S.; AI, Q. Effects of different dietary lipid sources on growth performance, hepatic lipid deposition and transcriptome response in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). **Aquaculture**, v. 739143, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739143>.
- JOSEPH, J.D.; ACKMAN, R.G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, 488–506, 1992. <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.3.488>.
- KAHLON, T.S.; CHOW, F.I.; IRVING, D.W., SAYRE, R.N. Cholesterol response and fatty streak formation in hamsters fed two levels of saturated fat and various levels of cholesterol. **Nutrition Research**, v. 17, 1693–1707, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(97\)00176-0](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00176-0).
- KORTNER, T. M., BJORKHEM, I., KRASNOV, A., TIMMERHAUS, G., KROGDAHL, A. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, v. 111, 2089–2103, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000373>.
- KUSUMI, A.; SUBCZYNSKI, W.K.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; HYDE, J.S.; MERKLE, H. Spin-label studies on phosphatidylcholine-cholesterol membranes: Effects of alkyl chain length and unsaturation in the fluid phase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 854:307-317, 1986.
- LAAKSO, P. Analysis of sterols from various food matrices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, 402–410, 2005. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200501134>.
- MA, X.Y.; QIANG, J.; He, J.; GABRIEL, N.N.; XU, P. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, 937–950, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0059-4>.
- MABDEL-AAL, M. Effects of over-wintering and water depth on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **8th International Symposium of Tilapia Aquaculture**, v. 297–306, 2008.
- MENOYO, D.; LOPEZ-BOTE, C.J.; BAUTISTA, J.M.; OBACH, A. Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. **Aquaculture**, v. 225, 295–307, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00297-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00297-7).

MERKLE, H.; SUBCZYNSKI, W. K.; KUSUMI, A. Dynamic fluorescence quenching studies on lipid mobilities in phosphatidylcholine-cholesterol membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 897:238- 248, 1987.

MOCK, T.S.; ALKHABBAZ, Z.H.R.; ROCKER, M.M.; LEWIS, M.J.; CUMMING, E.E.; SMULLEN, R. P.; TURCHINI, G. M.; FRANCIS, D. S. Gut transit rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to optimal and suboptimally high-water temperatures. **Aquaculture Research**, v. 00, 1–11, 2022. <https://doi.org/10.1111/are.15979>.

MUFATTO, L.M.; NOBREGA, R.O.; MENOYO, D.; FRACALLOSSI, D.M. Dietary ratios of n-3/ n-6 fatty acids do not affect growth of Nile tilapia at optimal temperatures (28 °C) nor at temperatures that simulate the onset of winter (22 °C). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, 646–661, 2019. <https://doi.org/10.1111/anu.12886>.

NAKANO, T.; INOUE, I.; MURAKOSHI, T. A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels – Review. **Nutrients**, v. 11, 310, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020310>.

NG, W.K.; SIGHOLT, T.; BELL, J.G. The influence of environmental temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed finishing diets containing different blends of fish oil, rapeseed oil and palm oil. **Aquaculture Research**, 35, 1228–1237, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01131.x>.

NG, W.K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, 220–254, 2013. <https://doi.org/10.1111/raq.12014>.

NOBREGA, R.O.; CORRÊA, C.F.; MATTIONI, B.; FRACALLOSSI, D.M. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 471, 66–71, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.026>.

NOBREGA, R.O.; BATISTA, R.O., CORRÊA, C.F.; MATTIONI, B.; FILER, K.; PETTIGREW, J.E.; FRACALLOSSI, D.M. Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. **Aquaculture**, v. 507, 500–509, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>.

NOBREGA, R.O.; BANZE J.F.; BATISTA, R.O.; FRACALLOSSI, D.M. Improving winter production of Nile tilapia: What can be done? **Aquaculture Reports**, v. 18, 100453, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100453>.

NORAMBUENA, F.; LEWIS, M.; HAMID, N.K.A.; HERMON, K.; DONALD, J.A.; TURCHINI, G.M. Fish oil replacement in current aquaculture feed: Is cholesterol a hidden treasure for fish nutrition? **PLoS One** 8, v. 12, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081705>.

NORDRUM, S.; OLLI, J.; RØSJØ, C.; HOLM, H.; KROGDAHL, Å. Effects of graded levels of medium chain triglycerides and cysteine on growth, digestive processes and nutrient utilization in sea water reared Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) under ad libitum feeding

regime. **Aquaculture Nutrition**, v. 9(4), 263–274, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00252.x>.

NRC. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. **National Academic Press**, Washington (National Research Council), 2011.

O'FALLON, J.V.; BUSBOOM, J.R.; NELSON, M.L.; GASKINS, C.T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, 1511–1521, 2007. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-491>.

PEIXE-BR. Associação Brasileira da Piscicultura. **ANUÁRIO Peixe-BR da piscicultura 2023**, Brasil.

PÉREZ-FUENTES, J.A.; PÉREZ-ROSTRO, C.I.; HERNÁNDEZ-VERGARA, M.P. Pond-reared Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* with the biofloc system. **Aquaculture**, v. 400:105–110, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.028>.

REDA, R. M.; EL ASELY, A.; SALAH, A.S.; MAHMOUD, M.A. Replacement of dietary fish oil with plant oils improves the immunological responses and the antioxidant status in *Oreochromis niloticus* exposed to suboptimal temperature. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, 2181–2196, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00867-9>.

RODRIGUES, A.P.O.; GOMINHO-ROSA, M.D.C.; CARGNIN-FERREIRA, E.; de FRANCISCO, A., FRACALOSSO, D.M. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, 65–72, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00877.x>.

RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: a molecular simulation study. **Biophysical Journal**, v. 81, 2190–2202, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75867-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75867-5).

SEALEY, W.M.; CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. Dietary cholesterol and lecithin have limited effects on growth and body composition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture Nutrition**, v. 7, 25-31, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2001.00159.x>.

SIFA, L.; CHENHONG, L.; DEY, M.; GAGALAC, F.; DUNHAM, R. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture**, v. 213, 123–129, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00068-6).

SILVA, B.C.; PEREIRA, A.; MARCHIORI, N. da C.; MARIGUELE, K.H.; MASSAGO, H.; KLABUNDE, G.H.F. Cold tolerance and performance of selected Nile tilapia for suboptimal temperatures. **Aquaculture Research**, v. 52, 1071–1077, 2020. <https://doi.org/10.1111/are.14962>.

SUBCZYNSKI, W.K.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; WIDOMSKA, J.; MAINALI, L.; RAGUZ, M. High cholesterol/low cholesterol: Effects in biological membranes Review. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 75, 369–385, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0792-7>.

TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; WATANABE, T. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 49, 127–134, 1983.

TOCHER, D.R.; BENDIKSEN, E.Å.; CAMPBELL, P.J.; BELL, J.G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, v. 280, 21–34, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>.

TURCHINI, G.M.; TORSTENSEN, B.E.; NG, W.K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, 10–59, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.

TURCHINI, G.M.; NG, W.-K.; TOCHER, D.R. Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds, 1st ed. **Taylor & Francis Group**, CRC Press, Boca Raton. 551 PP., 2010. ISBN: 9780429151033.

TWIBELL, R.G.; WILSON R.P. Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 236, 539–546, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.028>.

VALEN, R.; JORDAL, A.-E.; MURASHITA, K.; RØNNESTAD, I. Postprandial effects on appetite-related neuropeptide expression in the brain of Atlantic salmon, *Salmo salar*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, 359-66, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.02.027>.

VALENTINE, R. C.; VALENTINE, D.L. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. **Progress in Lipid Research**, v. 43, 383-402, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.05.004>.

WANG, X. Z.; JIANG, W. D.; FENG, L.; WU, P.; LIU, Y.; ZENG, Y. Y.; JIANG, J.; KUANG, S. Y.; TANG, L.; TANG, W. N.; ZHOU, X. Q. Low or excess levels of dietary cholesterol impaired immunity and aggravated inflammation response in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 78, 202-221, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.030>.

WU, T.-M.; JIANG, J.-J.; LU, R.-M.; LIN, Y.-H. Effects of dietary inclusion of Soybean meal and cholesterol on the growth, cholesterol status and metabolism of the Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 00, 1–7, 2019. <https://doi.org/10.1111/anu.12997>.

XU, C.; LI, E.; XU, Z.; SU, Y.; LU, M.; QIN, J.G.; WANG, X. Growth and stress axis responses to dietary cholesterol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 1–10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00254>.

ZHANG, W.; DONG X.; TAN, B.; ZHANG, S.; CHEN, X. Effects of dietary cholesterol content on growth performance, tissue biochemical indices and liver lipid metabolism related enzyme activities of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 28, 1945-1955, 2016.

ZHU, T.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; ZHOU, H.; LIUFU, Z. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal

diets with graded levels of cholesterol. **Aquaculture**, v. 428–429, 290-296, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.027>.

ZHU, T.; MAI, K.; XU, W.; AI, Q. Effect of dietary cholesterol and phospholipids on feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 495, 443-451, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.002>.

CAPÍTULO III: METABOLISMO LIPÍDICO EM TILÁPIAS-DO-NILO MANTIDAS A 22°C E ALIMENTADAS COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM COLESTEROL

Jorge Filipe Banze ^a, Katharinne Ingrid Moraes de Carvalho ^a, Jacó Joaquim Mattos ^b, Maria Risoleta Freire Marques ^b, Débora Machado Fracalossi ^{a*}

^a Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil

^b Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica - LABCAI, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

*Autor correspondente. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

Este artigo foi formatado de acordo com as normas da ABNT.

RESUMO

A temperatura desempenha um papel importante no metabolismo lipídico em peixes. Estudos relatam melhora no crescimento em peixes alimentados com suplementação moderada de colesterol em dietas pobres em ingredientes de origem animal, quando criados em temperatura ótima de crescimento. Entretanto, pouco ou quase nada se sabe sobre o efeito da suplementação de colesterol dietético no metabolismo lipídico em juvenis de tilápia-do-nilo. Assim, o presente trabalho avaliou o efeito da suplementação dietética crescente com colesterol (0,0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%) na nos índices viscerossomático e hepatossomático, composição proximal do hepatopâncreas, perfil plasmático de colesterol, triacilgliceróis, HDL, além de alterações morfológicas no hepatopâncreas e nível dos transcritos de genes envolvidos nos processos de absorção, síntese e degradação de colesterol em juvenis de tilápia-do-nilo, criados em temperatura subótima de 22 °C. A suplementação com colesterol proporcionou o aumento crescente dos índices viscerossomático e hepatossomático, favoreceu o acúmulo crescente de colesterol e triacilgliceróis no hepatopâncreas. No plasma, houve aumento linear do colesterol e das lipoproteínas não-HDL, mas diminuição linear de triacilgliceróis. A suplementação com colesterol dietético causou alterações morfológicas no hepatopâncreas dos peixes, causou congestão e dilatação nos sinusoides, intensificando a esteatose e a perda do núcleo dos hepatócitos a partir de 0,5% de colesterol dietético. Os níveis crescentes de suplementação de colesterol nas dietas não causaram necrose no hepatopâncreas. Ainda, a suplementação com colesterol a partir de 0,5% reduziu o nível de transcrição de *HMGCr*, gene codificante da enzima responsável pela síntese de colesterol no hepatopâncreas. Estes resultados indicam que a suplementação dietética com colesterol afetou a morfologia e composição proximal do hepatopâncreas, promovendo o acúmulo de colesterol e triacilgliceróis, além de afetar o metabolismo lipídico em juvenis de tilápia-do-nilo, quando criados em temperatura subótima de 22 °C.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*; Esteróis; Histologia; Nível de transcritos.

ABSTRACT

Temperature plays an important role in lipid metabolism in fish. Studies report improve of growth in fish fed moderate cholesterol supplementation on diets low in animal ingredients when raised at optimal growth temperatures. However, little or nothing is known about the effect of dietary cholesterol supplementation on lipid metabolism in Nile tilapia juveniles. Thus, the present study evaluated the effect of increasing dietary supplementation with cholesterol (0.0%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, and 1.0%) on viscerossomatic end hepatossomatic index, on the viscerossomatic and hepatossomatic indexes, proximal composition of the hepatopancreas, plasma cholesterol, triacylglycerols, and HDL contents, besides morphological alterations in the hepatopancreas and level of transcripts involved in the processes of absorption, synthesis, and degradation of cholesterol in Nile tilapia juveniles reared at a suboptimal temperature of 22 °C. Cholesterol supplementation increased viscerossomatic and hepatossomatic indexes, increased the cholesterol and triacylglycerols deposition in the hepatopancreas. In plasma, there was a linear increase in cholesterol and non-HDL lipoproteins but a linear decrease triacylglycerols. Supplementation with dietary cholesterol caused morphological changes in the hepatopancreas of fish, causing congestion and dilation in the sinusoids, intensifying macrosteatosis and loss of hepatocyte nucleus from 0.5% of dietary cholesterol. Increasing levels of dietary cholesterol supplementation did not cause hepatopancreas necrosis. Also, supplementation with cholesterol from 0.5% reduced the level of transcription of *HMGCr*, coding gene for the enzyme responsible for the synthesis of cholesterol in the hepatopancreas. These results indicate that dietary supplementation with cholesterol affected the morphology and proximal composition of the hepatopancreas, promoting the accumulation of cholesterol, triacylglycerols, in addition to affecting lipid metabolism in juvenile Nile tilapia when reared at a suboptimal temperature of 22 °C.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; Sterols; Histology; Transcript levels.

1 INTRODUÇÃO

Os lipídios são nutrientes com função estrutural e metabólica importantes nos peixes. As classes distintas de lipídios são compostas por triacilgliceróis, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis, eicosanoides e vitaminas lipossolúveis (GLENCROSS, 2009; GURR, HARWOOD, FRAYN, 2002). Representam um dos principais macronutrientes da dieta, necessários para o desenvolvimento e crescimento dos peixes, sendo importante fonte de energia, ácidos graxos essenciais e de componentes estruturais das membranas plasmáticas como fosfolipídios e colesterol (TURCHINI, TORTENSEN, NG, 2009).

A temperatura desempenha um papel importante no metabolismo lipídico de peixes como as tilápias. Os lipídios exercem função estrutural e funcional determinantes na manutenção da fluidez e permeabilidade das membranas, quando os peixes são mantidos em temperaturas subótimas frias (GLENCROSS, 2009). Neste aspecto, a nutrição pode melhorar a tolerância térmica dos peixes, como já demonstrado por meio da suplementação de ácidos graxos insaturados da série n-3 (BATISTA *et al*, 2021; CORRÊA *et al*, 2017; CORRÊA *et al*, 2018; NOBREGA *et al*, 2017; NOBREGA *et al*, 2019), bem como a suplementação de lecitina de soja como fonte de fosfolipídios (BATISTA *et al*, 2023). Entretanto, pouco ou quase nada se sabe sobre o efeito da suplementação de colesterol, outro elemento indispensável para o bom funcionamento das membranas plasmáticas, sob o ponto de vista nutricional (TOCHER, 2008). Entender como o colesterol pode modular positivamente o funcionamento da membrana celular da tilápia-do-nilo em condições térmicas subótimas de criação, pode contribuir para sua aplicação em formulações de dietas para uso em períodos de frio.

A tilápia-do-nilo é a terceira espécie de peixe comercial mais produzida mundialmente, com os maiores países produtores da espécie localizados nas regiões subtropicais, caracterizadas por grandes variações de temperatura durante o ano, o que limita a expansão da criação da espécie pelos prejuízos devido à mortalidade em massa (FAO, 2022; NOBREGA *et al*, 2020). O Brasil é o quarto maior produtor de tilápia-do-nilo e concentra os maiores estados produtores da espécie nas regiões subtropicais (PEIXE-BR, 2023). A temperatura ideal de crescimento da tilápia-do-nilo varia de 26 a 30 °C (AZAZA *et al*, 2008; MA *et al*, 2015). A temperatura na qual o consumo alimentar e crescimento cessam, assim como a temperatura letal, podem ser influenciados pela genética e nutrição da espécie (ABDEL-GHANY *et al*, 2019; NOBREGA *et al*, 2020). A 22 °C, temperatura adotada neste estudo, ocorre relativa redução na taxa metabólica e de crescimento em comparação com criação em temperatura ótima, entretanto sem cessar o consumo alimentar ou causar letalidade por baixa temperatura,

conforme já demonstrado em vários trabalhos (BATISTA *et al*, 2021; CORRÊA *et al*, 2017; CORRÊA *et al*, 2018; NOBREGA *et al*, 2017, 2019, 2020).

O colesterol é o esterol mais estudado em vertebrados, sendo precursor de vários compostos bioativos, incluindo hormônios esteroides e ácidos biliares, além de exercer papel estrutural importante em condições de estresse salino ou térmico (TURCHINI, TORTENSEN, NG, 2009). Os peixes são capazes de sintetizar o colesterol *per se*, principalmente no hepatopâncreas, por meio de um processo metabólico complexo que inclui pelo menos vinte reações, que visam garantir sua homeostase e dar resposta à demanda fisiológica (HENDERSON e TOCHER 1987; ZHU *et al*, 2020). Estudos demonstram que a suplementação moderada de colesterol em dietas pobres em ingredientes de origem animal, pode melhorar o crescimento de peixes, quando criados em temperatura ótima dentro da faixa de conforto térmico de criação, mas pouco se sabe sobre seu efeito em temperaturas subótimas (TOCHER *et al*, 2008; TWIBELL e WILLSON 2014; WU *et al*, 2019; XU *et al*, 2018).

Níveis de colesterol plasmático podem servir de ferramenta de previsão do estado de bem-estar em peixes. Estudos têm demonstrado que dietas suplementadas com colesterol induziram à aterosclerose em salmão-do-Atlântico. Altas concentrações de colesterol no plasma devido ao consumo de dietas com altas doses de colesterol dietético (1,526%), já foram associadas à disfunção do metabolismo lipídico e baixo crescimento de carpa capim. Por outro lado, o nível de colesterol plasmático pode estar associado com o melhor crescimento em peixes, como relatado para juvenis de linguado, que variou de 5.47 a 6.95 mmol L⁻¹ (WANG *et al*, 2018).

A histologia é uma ferramenta útil para a análise de tecidos envolvidos na digestão e metabolismo, sendo possível extrair informações importantes sobre possíveis efeitos tóxicos de substâncias as quais os peixes estão expostos, como aditivos alimentares (SCHWAIGER *et al*. 1997). O consumo de dietas com altas concentrações de colesterol, ou seja, acima de 1%, pode ocasionar disfunções hepáticas em peixes, como o acúmulo de gordura no hepatopâncreas e comprometimento no crescimento (LI *et al*, 2023). Desta forma, o monitoramento do bem-estar por meio da avaliação de alterações morfológicas em tecidos de peixes, torna-se importante para verificar o efeito da suplementação de colesterol em dietas para peixes.

Os processos e vias do metabolismo do colesterol em peixes são bastante semelhantes aos dos mamíferos. A mobilidade do colesterol na circulação consiste em duas vias: 1) exógena, que transporta o colesterol dietético absorvido para o enterócito, por meio de quilomícrons para o hepatócito e, 2) endógena, que se refere à síntese endógena de colesterol e seu transporte para os diferentes tecidos via lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL, *very low density*

lipoprotein), lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein*) e lipoproteína de alta densidade (HDL, *high density lipoprotein*) (YAN *et al*, 2015). A ingestão de dietas suplementadas com colesterol, exerce influência direta nos níveis de transcritos de genes codificadores de proteínas envolvidas na absorção, síntese e degradação do colesterol, como: (1) a NPC1L1 (*Niemann – Pick C1-like 1*), proteína presente no intestino e principal reguladora do processo de absorção do colesterol, via enterócitos (BETTERS e YU, 2010); (2) a HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase), enzima-chave reguladora da síntese de colesterol no hepatopâncreas (MAITA *et al*, 2006; ZHU *et al*, 2014); (3) e a 7- α -hidroxilase (CYP7A1), enzima responsável pela degradação ou conversão do colesterol em ácido biliar, sendo a enzima chave, atuando na primeira reação, da via clássica da síntese de ácido biliar (CHIANG e FERREEL, 2020; MATSUMOTO *et al*, 2005; YUN *et al*, 2011; ZHU *et al*, 2014).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietética crescente com colesterol nos índices hepatossomático e viscerossomático, na composição proximal e morfologia do hepatopâncreas, no lipidograma plasmático e no nível dos transcritos envolvidos nos processos proteico-enzimáticos de absorção, síntese e degradação de colesterol, em juvenis de tilápia-do-nilo, quando criados em temperatura subótima de 22 °C.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PEIXES, DELINEAMENTO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Juvenis de tilápia-do-nilo ($29,24 \pm 0,02$ g, média \pm desvio padrão) foram alimentados com dietas isonitrogenadas e isolipídicas com cinco níveis crescentes (0,0%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%) de colesterol de uma fonte 92,5% pura (Sigma, St. Louis, EUA), por 91 dias. Durante o período experimental, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 h) até à saciedade aparente. Tais doses foram suplementadas em uma dieta prática extrusada basal e foram testadas em seis repetições cada (Tabela 7), em delineamento completamente casualizado. Detalhes sobre os procedimentos experimentais relacionados com o ensaio de crescimento, preparação das dietas e composição corporal, podem ser encontrados no Capítulo II desta tese.

Os peixes foram inicialmente estocados em quatro tanques de 1.000 L, conectados a um sistema de recirculação de água doce, equipado com filtros mecânicos e biológicos, suprimento de ar e troca de calor. Após duas semanas, trinta grupos de treze peixes foram distribuídos aleatoriamente em tanques de 100 L (unidades experimentais) e aclimatados às

condições experimentais a 28 °C, por uma semana. Na segunda semana, a temperatura da água foi gradualmente reduzida para 22 °C (1 °C por dia) e, a partir da terceira semana de aclimação, a temperatura da água foi mantida a 22 °C. Durante o período de aclimação de três semanas, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, até saciedade aparente com a dieta basal (Tabela 7), sem suplementação de colesterol. O fotoperíodo foi ajustado para um ciclo claro-escuro de 12 h.

Os parâmetros indicadores da qualidade da água foram medidos semanalmente, exceto temperatura da água e oxigênio dissolvido, que foram medidos diariamente. Os valores médios (\pm desvio padrão) foram os seguintes: temperatura $22,08 \pm 0,19$ °C; oxigênio dissolvido $7,74 \pm 0,48$ mg L⁻¹; pH $7,25 \pm 0,08$; salinidade $0,98 \pm 0,09$ g L⁻¹; alcalinidade $41,97 \pm 6,03$ mg L⁻¹; amônia total $0,13 \pm 0,10$ mg L⁻¹; nitrito $0,06 \pm 0,01$ mg L⁻¹; nitrato $3,68 \pm 0,33$ mg L⁻¹. Estes indicadores estavam dentro dos níveis aceitos para a tilápia-do-nilo (EL-SAYED *et al*, 2006), exceto a temperatura da água, que foi mantida a 22 °C para simular condições de outono-primavera em regiões subtropicais.

O manejo dos peixes seguiu o protocolo número 5227201021, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

Tabela 7 - Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio de alimentação dose-resposta de colesterol (Capítulo II).

Ingredientes, g 100 g ⁻¹ peso seco	Suplementação de colesterol na dieta, %				
	0,00	0,25	0,5	0,75	1,00
Farinha de arroz	33,74	33,48	33,21	32,94	32,66
Colesterol ¹	0,00	0,26	0,53	0,80	1,07
Outros ²	66,26	66,26	66,26	66,26	66,27
Composição analisada⁴, g 100 g⁻¹ peso seco					
Matéria seca	92,65	91,41	93,07	93,35	91,57
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	4794	4846	4843	4779	4799
Proteína bruta	32,88	31,98	31,74	31,86	32,40
Extrato etéreo	7,65	8,30	8,40	8,39	8,47
Cinzas	6,82	6,83	6,86	6,81	6,90
SFA ⁵	1,19	1,19	1,16	1,12	1,13
MUFA	2,05	2,05	2,04	2,02	1,98
PUFA	2,12	2,09	2,10	2,11	2,08
Colesterol	0,04	0,30	0,58	0,81	1,05

¹ Pureza = 92,5%, fornecido por Sigma (St. Louis, USA).

² Farelo de soja, adquiridos em CRAVIL (Palhoça, Brasil), (38,0 g 100⁻¹g, peso seco). Concentrado proteico de soja, fornecido por C.J. Selecta (Araguari, Brasil) (12,0 g 100⁻¹g, peso seco). Farinha de vísceras de frango fornecido por Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brasil) (10,0 g 100⁻¹g, peso seco). Óleo de milho fornecido por Bunge

Brasil (Gaspar, Brasil) (3,30 g 100⁻¹g, peso seco). Butil-hidroxitolueno (0,10 g 100⁻¹g, peso seco), produzido pela Rhoister (Araçoiaba da Serra, Brasil). DL-metionina (0,26 g 100⁻¹g, peso seco) e DL-treonina (0,20 g 100⁻¹g, peso seco), produzidas por Evonik Industries AG (Essen, Alemanha). Sal (0,20 g 100⁻¹g, peso seco).

³ Premix vitamínico-micromineral (produzido por DSM, Jaguaré, São Paulo) (1,0 g.100⁻¹g, peso seco), composição por kg: ácido fólico 2,666,66 mg, ácido pantotênico 2,666,66 mg, biotina 333,33 mg, sulfato de cobalto 27 mg, cobre 3,333,33 mg, sulfato de ferro 20,000 mg, iodeto de cálcio 666,66 mg, sulfato de manganês 1,666,000 mg, niacina 8,333 mg, selenita 100 mg, vitamina (vit.) A 5,333,333 UI, vit. B₁ 6,666,66 mg, vit. B₁₂ 13,33 µg, vit. B₂ 10,000 mg, vit. B₆ 10,000 mg, ácido ascórbico equivalente 100,000 mg, vit. D₃ 1,000,000 UI, vit. E 6,666,66 UI, vit. K₃ 3,333,33 mg, sulfato de zinco 2,660,000 mg, inositol 50,000 g, propionato de cálcio 250,000 mg.

⁴ Ácidos graxos detectados e totalizados em todas as dietas, mas não incluídos na tabela: C8:0, C10:0, C14:0, C16:1 n-7, C17:0, C17:1 n-7, C 18:1 n-7, C18:2 n-6, C20:0, C20:2 n-6, C22:0, C22:1 n-11.

⁵ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monoinsaturados, PUFA = poli-insaturados, LC-PUFA = poli-insaturados de cadeia longa (≥ 20 carbonos, ≥ 2 ligações duplas).

2.2 ÍNDICES SOMÁTICOS

No final de 91 dias de ensaio alimentar, foram coletados e imediatamente pesados, as vísceras e hepatopâncreas de 12 peixes por tratamento (dois peixes por unidade experimental), para o cálculo do índice viscerossomático (IVS) e índice hepatossomático (IHS), conforme as equações seguintes: índice viscerossomático (%) = 100 x (peso das vísceras) x (peso corporal)⁻¹ e índice hepatossomático (%) = 100 x (peso do hepatopâncreas) x (peso corporal)⁻¹ e, (NUTRIAQUA, 2012).

2.3 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO HEPATOPÂNCREAS

As análises de composição proximal nos hepatopâncreas foram realizadas seguindo os procedimentos padronizados pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1999): matéria seca, secagem a 105 °C até peso constante, método 950.01; proteína bruta por LECO (método de DUMAS 990.03, fator de conversão de 6,25). Já a fração lipídica foi extraída a frio e quantificada pelo método de Bligh e Dyer (1959).

2.4 DETERMINAÇÃO DE LIPIDOGRAMA

Ao final de 91 dias de alimentação, três peixes por unidade experimental foram anestesiados com Eugenol[®] (100 mg L⁻¹) e o sangue coletado por punção caudal, com seringas cobertas contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-cético à 10% (EDTA) (Hemstab[®], Lagoa Santa, Brasil). Posteriormente o sangue foi centrifugado a 15000 x g, por 15 min, e o plasma sanguíneo coletado e armazenado a -20° C até realização das análises.

A concentração plasmática de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG), e lipoproteína de alta densidade (HDL), que foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, utilizando *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil), de

acordo com as recomendações do fabricante. Já o não-HDL foi determinada por cálculo e representa a fração correspondente ao conjunto formado por lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Os valores de não-HDL, foram calculados por meio da subtração do colesterol total do HDL.

2.5 ALTERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS DO HEPATOPÂNCREAS

Ao final de 91 dias de alimentação com doses crescentes de colesterol dietético, dois peixes por unidade experimental (seis por tratamento) foram anestesiados com Eugenol[®] (100 mg L⁻¹) e eutanasiados para coleta de hepatopâncreas. Os tecidos foram imediatamente fixados em formol a 10% por 24 h, desidratados em séries crescentes de álcool etílico (70%), clarificados em xilol e incluídos em parafina a 60 °C. Cortes de 4 µm de espessura (micrótomo PAT – 54 MR10), foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Posteriormente à coloração, as lâminas foram montadas em meio *Etellan*[®] e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) *Axio Imager A.2* com o programa *Zen Pro* (*Zeiss, Gottingen, Alemanha*).

No hepatopâncreas, foram consideradas como alterações histopatológicas conforme Brum *et al* (2018), as seguintes: o aspecto balonoso, congestão do pâncreas, congestão nos sinusoides, deslocamento do núcleo dos hepatócitos, dilatação dos sinusoides, esteatose, necrose, núcleo com cariólise, núcleo com cariorrexe, perda do aspecto cordonal, perda do núcleo dos hepatócitos, e hipertrofia dos hepatócitos.

Para análise do tecido, atribuíram-se valores às alterações histológicas, conforme o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração moderada, 25% a 50%) e 3 (alteração severa, acima de 50% da área do tecido), de acordo com o método descrito por Schwaiger *et al* (1997), ligeiramente modificado por Brum *et al* (2018).

2.6 ANÁLISES MOLECULARES

No final do ensaio alimentar, foram amostrados intestinos e hepatopâncreas de 12 peixes por tratamento (dois peixes por unidade experimental), para isolamento de RNA total (RNA_t). Os tecidos coletados foram imediatamente conservados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até realização das análises. No intestino, foram quantificados os transcritos de gene codificador da proteína NPC1-like1 (NPCL1), principal reguladora de absorção do colesterol nos enterócitos. No hepatopâncreas, foram quantificados os transcritos de genes codificadores da enzima *HMG-CoA redutase* e *CYP7A1*, reguladoras da síntese e degradação

do colesterol, respectivamente. Foi adotado o mesmo procedimento de extração de RNA_t para intestino e hepatopâncreas.

2.6.1 Extração de RNA_t e síntese de cDNA por transcrição reversa

O RNA_t foi extraído utilizando-se o reagente Qiazol (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Amostras congeladas de intestino (100 mg) e hepatopâncreas (30 mg) foram adicionadas a 1 mL do reagente e rapidamente homogeneizados. Na etapa final de precipitação de RNA_t do hepatopâncreas, foram adicionados 400 µL da fração sobrenadante, 250 µL de uma solução de NaCl (1.2 M) e citrato de sódio (0.8 M), além de 250 µL de isopropanol para evitar coprecipitação de glicogênio.

No final, as amostras foram eluídas em 20 µL de água ultrapura e armazenadas a -80 °C. A concentração total e pureza das amostras de RNA_t foram avaliadas em Nano Drop[®] One (*Nano-Drop Technologies*, Wilmington, DE, EUA). Para cada amostra, 1 µg de RNA_t foi tratado com DNase e submetido à reação de transcrição reversa com o uso do *kit Quantitech Reverse transcription* (Qiagen, Hilden, Alemanha) para a síntese do DNA complementar (cDNA), que então foi diluído e armazenado a -20 °C, para uso posterior.

2.6.2 Desenho de iniciadores e reações de qPCR

A sequência dos iniciadores foi delineada a partir das sequências nucleotídicas dos genes de interesse para tilápia-do-nilo. Os iniciadores usados nas reações de qPCR foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Quest*, disponível em <https://www.idtdna.com> (IDT), seguindo os seguintes parâmetros: (a) tamanho do iniciador: mínimo (mín) 18, ótimo (opt) 24 e máximo (máx) 28; (b) temperatura: 55 (mín), 60 (opt), 65 (máx); (c) iniciador GC%: 45 (mín), 50 (opt), e 55 (máx); (d) tamanho do produto amplificado: 80 (mín), 130 (opt), 200 (máx); aceitando como máximo de diferença de temperatura de 1 °C. Os genes selecionados, códigos de acesso no *Genebank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e seus respectivos pares de iniciadores estão mostrados no Quadro 2.

Quadro 2 - Genes de interesse, suas respectivas funções e sequências de iniciadores.

Símbolo	Nome do gene (código de acesso)	Sequência dos iniciadores 5'- 3'¹	Função biológica
<i>Genes de interesse</i>			
<i>NPC1L1</i>	<i>Niemann–Pick C1-like 1</i> (XM_013271592.3)	F - TGC TCA TTC TCC TGA TAC TTT CC R - TGC CTT TAC CTC TGT GTA TTC C	Gene codificador de proteína reguladora da absorção de colesterol nos enterócitos.
<i>HMGCr</i>	<i>3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A</i> (XM_003437610.5)	F - TCT TTG AAC AGG CTG AGA TGG R - GAT GGA GGA TTT AGG GTG TGG	Gene codificador de enzima reguladora da síntese de colesterol no hepatopâncreas.
<i>CYP7A1</i>	<i>7α hidroxilase</i> (XM_003456729.5)	F - CTA CAT CTG TCA AGG CGT TTG G R - TCT CAA TAA GGG AGG GAA GAGC	Gene codificador de enzima chave na degradação do colesterol no hepatopâncreas.

Os níveis de transcritos dos genes selecionados foram analisados por qPCR em um termociclador Rotor Gene (Qiagen, Hilden, Alemanha), utilizando-se o *kit* Quantiova *Sybr Green* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para cada gene foi produzida uma curva padrão do cDNA, contendo de 400 ng/reação até 25 ng/reação. A eficiência da curva para cada gene de interesse foi determinada com base na regressão linear, usando o ciclo em que cada ponto da curva padrão de cDNA cruza o ciclo limiar (Cq). Todas as curvas apresentaram R² maior ou igual a 0,99 e eficiência entre 98 e 100%. Para análise comparativa e escolha dos genes de referência, bem como dos genes de interesse, foi utilizado o método 2^{-Cq} (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008). Todos os dados foram relativizados com grupo 0% colesterol.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi aplicada análise de regressão para verificar o efeito do colesterol dietético nos índices viscero e hepatossomático. Os dados de composição proximal do hepatopâncreas, perfis de colesterol total, triacilgliceróis, HDL e não-HDL, foram submetidos à análise de regressão. Para a análise dos dados de intensidade das alterações histológicas, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn para comparação de médias. Para os níveis de transcritos, foi aplicado o teste de Grubb para de detectar os *outliers*, sendo que a

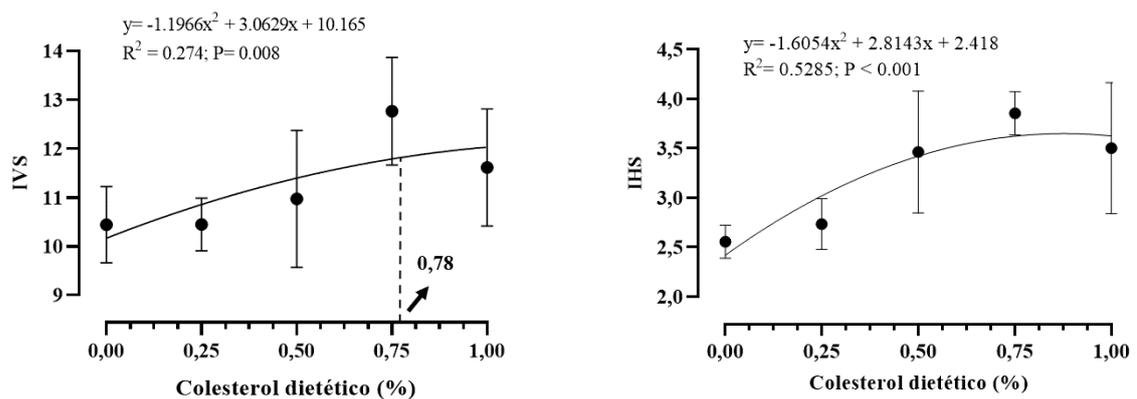
normalidade e homoscedasticidade dos dados foram avaliadas através dos testes de D'Agostino-Pearson e Levene, respectivamente. Para a comparação de médias entre a dieta controle e as demais com as diferentes doses de colesterol, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* 8.0.1. e foi considerado o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÍNDICES SOMÁTICOS

Houve aumento dos índices viscerossomático e hepatossomático (Figura 3) com a suplementação de colesterol ($P < 0,05$). Resultados semelhantes para o índice hepatossomático foram relatados em peixes (salmão do Atlântico, BJERKENG e STOREBAKKEN, 1999) e mamíferos (*hamsters* dourados, KAHLON *et al*, 1997), o que pode indicar comprometimento do metabolismo lipídico do hepatopâncreas associado a dietas com alto teor de colesterol. Por outro lado, este aspecto pode estar relacionado com a inibição de genes responsáveis pela lipólise hepática e aumento da expressão de genes relacionados com a lipogênese no hepatopâncreas, já relatado para juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com 1,6% de colesterol na dieta (LI *et al*, 2023).

Figura 3 - Suplementação dietética com colesterol e índices viscerossomático (IVS) e hepatossomático (IHS) em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados por 91 dias, a 22 °C.



No presente estudo, a suplementação dietética com colesterol pode ter gerado efeito similar. No entanto, o mecanismo molecular específico da deposição de lipídios em peixes causado por esteróis dietéticos permanece desconhecido. Além disso, em outro estudo, a inclusão de colesterol na dieta causou o aumento de triglicerídeos no hepatopâncreas da garoupa-pintada-de-laranja (*Epinephelus coioides*, ZHANG *et al*, 2016).

No presente estudo, a inclusão de colesterol dietético a 0,78 % promoveu o maior índice corporal viscerosomático (Figura 3).

4.2 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO HEPATOPÂNCREAS

Após 91 dias de alimentação, os juvenis de tilápia-do-nilo apresentaram acúmulo de colesterol e lipídio total no hepatopâncreas ($P < 0,05$), quando alimentados com suplementação crescente de colesterol nas dietas (Tabela 8). A deposição lipídica é um processo complexo, resultante de um desequilíbrio entre absorção, oxidação, síntese e secreção lipídica (JIN *et al*, 2023; YAN *et al*, 2015; ZHENG *et al*, 2014). Este resultado corrobora com o encontrado em juvenis de truta arco-íris quando alimentados com 1,2% de colesterol dietético (DENG *et al*, 2013). Similarmente, a suplementação de colesterol dietético causou o aumento de triacilgliceróis no hepatopâncreas de garoupa-verdadeira (*Epinephelus coioides*, ZHANG *et al*, 2016) e robalo híbrido (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*, SEALEY *et al*, 2001). Esses resultados podem ser explicados pela (1) inibição da β -oxidação de ácidos graxos; (2) diminuição da expressão de genes relacionados com a lipólise (*atgl* e *hsl*) e (3) aumento da expressão de genes relacionados com a lipogênese (*dgat*, *fasn*, *acly*, *acca* e *srebpl*), tal como relatado em juvenis de tilápia-do-nilo, quando alimentados com 1,6% de colesterol dietético a 28 °C (LI *et al*, 2023). Neste último trabalho, com tilápia, houve ainda a diminuição nos níveis de carnitina, acetilcarnitina, malonilcarnitina e ácido β -hidroxibutírico, que são marcadores da β -oxidação. Isto sugere que a suplementação dietética com colesterol promoveu a deposição lipídica, inibindo a lipólise, lipofagia e β -oxidação de ácidos graxos. Tais achados corroboram com os do presente estudo, onde também foi registrado o aumento de triacilgliceróis e colesterol no hepatopâncreas, com o aumento da suplementação dietética.

Tabela 8 - Composição proximal do hepatopâncreas de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético, por 91 dias, à 22 °C.

Composição na matéria úmida, %	Suplementação de colesterol na dieta ¹ , %					SEM ²	Valor de P ³
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00		
Matéria seca	94,09	93,33	95,44	95,15	95,21	0,44	0,010
Lipídio	17,30	16,29	33,41	33,69	35,99	2,11	<0,001
Proteína bruta	33,07	30,01	23,45	23,43	22,68	1,31	<0,001
Colesterol total	0,39	0,50	2,17	2,85	3,05	0,16	<0,001

¹ Valores expressos em média de três repetições por tratamento (n=9 peixes por tratamento).

² Erro padrão da média.

³ Para regressões significativas ($P < 0,05$), as seguintes equações foram geradas: matéria seca, $y = 1,624x + 93,831$ ($R^2 = 0,41$); lipídio; $y = 22,716x + 17,449$ ($R^2 = 0,76$); proteína bruta, $y = -10,947x + 32,001$ ($R^2 = 0,78$); colesterol total, $y = 3,2133x + 0,2767$ ($R^2 = 0,89$).

Estudos que abordam o efeito do consumo de colesterol dietético no conteúdo de proteína bruta no hepatopâncreas são limitados. No presente estudo, houve diminuição da proteína bruta no hepatopâncreas com a suplementação dietética com colesterol. O acúmulo linear de lipídio no hepatopâncreas pode ter contribuído para redução progressiva da proteína bruta neste tecido, já que o consumo de colesterol parece promover lipogênese hepática e, por conseguinte, o aumento de gotículas de lipídio nos hepatócitos dos juvenis de tilápia-de-nilo, conforme relatado por Li e colaboradores (2023). Além disso, este mesmo estudo recente relata aumento no nível de transcritos dos genes relacionados com o catabolismo de aminoácidos em tilápia alimentada com dietas suplementadas com colesterol dietético (1,6%), o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo.

Houve acúmulo de colesterol total no hepatopâncreas, corroborando com o consumo das dietas com suplementação crescente de colesterol. O acúmulo de colesterol no hepatopâncreas, no corpo inteiro e no músculo foi também relatado em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com colesterol a 28 °C (LI *et al*, 2023), bem como em juvenis de linguado (*Scophthalmus maximus*) mantidos de 19 a 22 °C, onde a alimentação com dietas contendo colesterol proporcionou maior acúmulo de colesterol no corpo ($P < 0,05$), quando comparado com peixes alimentados sem tal suplementação (YUN *et. al.*, 2011). No presente estudo, o acúmulo de colesterol no hepatopâncreas pode estar relacionado à homeostase de colesterol, já que este é o órgão responsável pela excreção de colesterol, quando em excesso nos hepatócitos (NAKANO, INOUE, MURAKOSHI, 2019). Segundo Li *et al* (2023), o acúmulo de colesterol no hepatopâncreas também está associado ao aumento de colesterol nas vesículas biliares e nas fezes, sugerindo que a dose de 1,6 % provoca alteração na homeostase de colesterol nos hepatócitos. Este fato corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, já que o acúmulo linear de colesterol no hepatopâncreas esteve também associado ao acúmulo crescente de colesterol no plasma e no corpo (Capítulo II). Resultados similares relacionados ao acúmulo de colesterol no hepatopâncreas foram relatados em juvenis de truta arco-íris, com 0,9 e 1,5 % de colesterol dietético (DENG *et al*, 2013), em juvenis de linguado, com 1,5% (YUN *et al*, 2011) e 1,8% de colesterol dietético (ZHU *et al*, 2014), bem como em tilápia-do-nilo, com 0,8% de colesterol dietético (XU *et al*, 2018).

4.3 LIPIDOGRAMA

No presente estudo, houve aumento linear crescente de colesterol no plasma com a suplementação dietética do colesterol (Tabela 9). O colesterol é prontamente absorvido no intestino para o interior dos enterócitos e, em seguida, transportado para os diferentes tecidos

através da corrente sanguínea (GURR, HARWOOD, FRAYN, 2002). Como os lipídios são insolúveis no plasma sanguíneo, estes precisam ser transportados por meio de lipoproteínas. Portanto, o colesterol sanguíneo geralmente aumenta com o aumento do colesterol dietético (DENG *et al*, 2014; SCHOKNECHT *et al*, 1994). Neste estudo, o aumento do colesterol no plasma confirma a absorção do colesterol dietético pelos juvenis de tilápia-do-nilo. O consumo de colesterol dietético foi suficiente para elevar os seus níveis no plasma, mesmo com a inibição da síntese endógena de colesterol, conforme demonstrada neste estudo. Estes resultados corroboram aqueles relatados em juvenis de linguado, quando alimentados com 1,5% de colesterol na dieta (YUN *et. al*, 2011). Ainda, juvenis de truta arco-íris apresentaram maiores níveis de colesterol plasmáticos quando alimentados com dietas suplementadas com colesterol em comparação aos peixes que não receberam suplementação (DENG *et al*, 2014). Os resultados do presente estudo corroboram ainda com o relato de Zhu *et al* (2018) em juvenis de linguado, quando alimentados com 1 e 2% de colesterol na dieta.

No presente estudo, houve diminuição de triacilgliceróis no plasma com a suplementação crescente de colesterol (Tabela 9). Segundo Gurr, Harwood e Frayn (2002), a diminuição de triacilgliceróis na circulação pode estar relacionada à ação da enzima lipoproteína lipase, responsável por clivar moléculas de triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas como quilomícrons, VLDL e LDL. Com a ação da lipoproteína lipase são gerados ácidos graxos livres, os quais podem ser destinados à produção de energia (KUMAR *et al*, 2018). Portanto, sugere-se que a diminuição de triacilgliceróis no plasma com a suplementação crescente de colesterol, observada no presente estudo, bem como relatada na revisão realizada por Mead e colaboradores (2002), se deva a sua utilização para produção de energia ou armazenamento. Salienta-se que os juvenis de tilápia apresentaram acúmulo crescente de gordura hepática e visceral (Figura 3) com a suplementação crescente de colesterol, mesmo sendo alimentados com dietas isolípídicas e isoenergéticas. Entretanto, a redução de triacilgliceróis no plasma pode ser explicada pela baixa digestibilidade de lipídios e ácidos graxos relatada no Capítulo II, quando juvenis de tilápia-do-nilo são alimentados com dieta suplementada com colesterol.

Tabela 9 - Perfil de colesterol total, triacilgliceróis e lipoproteínas no plasma de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético, por 91 dias, em temperatura subótima de 22°C¹.

Perfil plasmático, mmol/L	Suplementação de colesterol na dieta, %					SEM ²	Valor de P ⁵
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00		
Colesterol total ³	6,73	6,03	11,75	17,92	23,93	0,73	<0,001
Triacilgliceróis	4,54	3,67	1,76	2,61	1,57	0,22	0,020
Lipoproteína HDL	1,46	1,50	2,13	1,68	1,98	0,03	0,070
Lipoproteínas não-HDL ⁴	5,44	4,17	9,62	16,23	22,22	0,73	<0,001

¹ Valores expressos em média de três repetições por tratamento (n=9 peixes por tratamento).

² Erro padrão da média.

³ Colesterol total expressa pela soma das lipoproteínas HDL e não-HDL.

⁴ Não-HDL: representa a fração correspondente ao conjunto formado por lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Os valores foram calculados por meio da subtração do colesterol total do HDL.

⁵ Para regressões polinomiais significativas ($P < 0,05$), as seguintes equações foram geradas: colesterol total, $y = 24,505x^2 - 2,9573x + 6,316$ ($R^2 = 0,98$); triacilgliceróis, $y = 24,505x^2 - 2,9573x + 6,316$ ($R^2 = 0,50$); lipoproteínas não-HDL, $y = 24,505x^2 - 2,9573x + 6,316$ ($R^2 = 0,95$).

Por outro lado, o acúmulo de colesterol no hepatopâncreas pode ter causado disfunção hepática por meio da inibição da β -oxidação de ácidos graxos, conforme já demonstrado em tilápia-do-nylo por Li *et al* (2023). Sugere-se que este fato pode ter ativado a lipoproteína lipase circular, clivando as moléculas de triacilgliceróis, de forma a suprir uma suposta demanda por ácidos graxos, devido à baixa oxidação destes no hepatopâncreas. Embora este mecanismo de ação não tenha sido suficientemente esclarecido em peixes, a diminuição de triacilgliceróis no plasma já foi relatada também para juvenis de truta-arco-íris, quando alimentados com dietas suplementadas com colesterol (DENG *et al*, 2014).

Como os lipídios são pouco solúveis no plasma sanguíneo, estes precisam ser transportados por meio de lipoproteínas. Os juvenis de tilápia-do-nylo apresentaram aumento linear crescente das lipoproteínas não-HDL plasmáticas com o consumo de dietas com suplementação crescente de colesterol (Tabela 9). As não-HDL são lipoproteínas constituídas por quilomícrons, VLDL e LDL, ricas em triacilgliceróis e colesterol (LUO, YANG, SONG, 2020). Estas lipoproteínas respondem à homeostase celular de colesterol, fazendo o transporte deste do hepatopâncreas para os diferentes tecidos (ALVES-BEZERRA e COHEN, 2018). Segundo Yun *et al* (2011), a suplementação crescente de colesterol (0 a 1,5%) em dietas para juvenis de linguado favoreceu o aumento da lipoproteína LDL, principal transportadora de colesterol no plasma, o que corrobora os resultados encontrados no presente estudo. Um aumento significativo de LDL no plasma também foi relatado para juvenis de linguado, quando alimentados com dietas com 1 e 2% de colesterol (ZHU *et al*, 2018). Portanto, ficou demonstrado que a suplementação crescente com colesterol dietético favoreceu o seu aumento

linear no corpo e hepatopâncreas da tilápia, o que reflete ao teor igualmente crescente das proteínas não-HDL na circulação.

4.4 ALTERAÇÕES MORFO-HISTOLÓGICAS NO HEPATOPÂNCREAS

A suplementação com colesterol promoveu diferentes alterações morfológicas no hepatopâncreas dos juvenis de tilápia-do-nilo, indicando limitação sobre a capacidade do organismo lidar com o consumo de dietas com suplementação crescente de colesterol dietético. Após 91 dias de alimentação, os peixes apresentaram diferença significativa na congestão dos sinusoides, que se mostrou significativamente menos intensa nos peixes alimentados com a dieta 0,75% de colesterol dietético, quando comparado com os tratamentos controle e 0,5%. A esteatose foi significativamente mais intensa nos peixes alimentados com a dietas 0,5% de colesterol dietético, em comparação aos que receberam a dieta 0,25% e controle (Tabela 10). Neste caso, a partir de 0,5% de colesterol dietético se mostrou excessiva, causando áreas de acúmulo de gordura no hepatopâncreas de juvenis de tilápia-do-nilo criados a 22 °C (Figura 4 – A e B).

Tabela 10 - Intensidade das alterações histológicas no hepatopâncreas de juvenis de tilápia-do nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético, por 91 dias, à 22 °C.¹

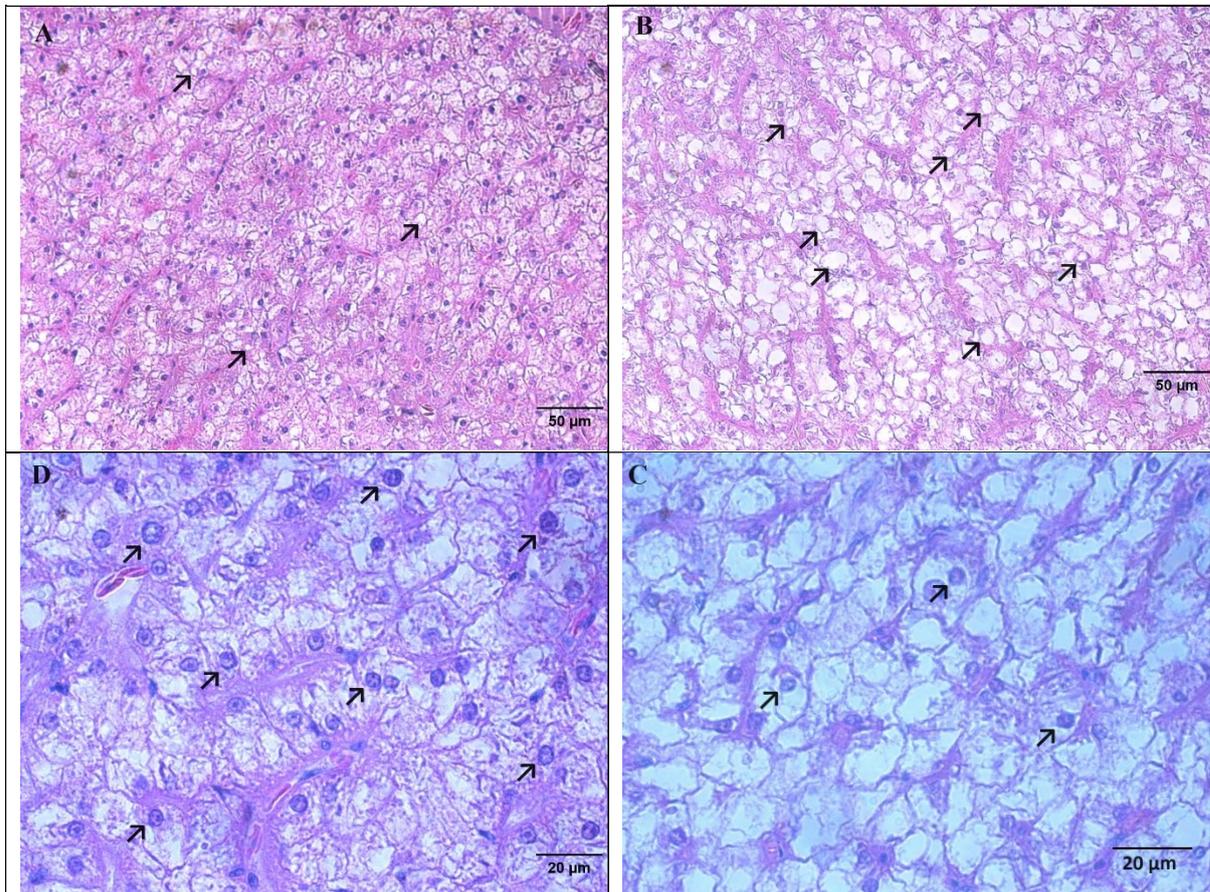
Alterações morfológicas ²	Suplementação de colesterol na dieta, %					Valor de P
	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	
Aspecto balonoso ^{NS}	1,83 ± 0,41	2,00 ± 0,63	2,00 ± 0,00	2,17 ± 0,75	2,00 ± 0,63	0,877
Congestão do pâncreas ^{NS}	1,83 ± 0,41	1,67 ± 0,82	1,83 ± 1,17	1,50 ± 1,23	1,83 ± 0,75	0,926
Congestão nos sinusoides	2,83 ± 0,41 ^a	2,00 ± 0,63 ^{ab}	2,50 ± 0,55 ^a	1,17 ± 0,41 ^b	2,17 ± 0,75 ^{ab}	0,004
Deslocamento do núcleo dos hepatócitos ^{NS}	1,83 ± 0,41	2,17 ± 0,41	2,33 ± 0,82	2,33 ± 0,52	2,33 ± 0,52	0,427
Dilatação dos sinusoides	2,17 ± 0,41 ^a	1,50 ± 0,55 ^{ab}	1,33 ± 0,52 ^{ab}	1,00 ± 0,00 ^b	1,17 ± 0,41 ^b	0,005
Esteatose	1,50 ± 0,55 ^b	1,67 ± 0,52 ^b	3,00 ± 0,00 ^a	2,17 ± 0,98 ^{ab}	2,33 ± 0,82 ^{ab}	0,027
Necrose ^{NS}	2,00 ± 0,00	1,50 ± 0,55	2,33 ± 0,52	2,00 ± 0,89	2,17 ± 0,75	0,228
Núcleo com cariólise ^{NS}	2,00 ± 0,63	1,67 ± 0,52	1,50 ± 0,55	1,67 ± 0,82	1,67 ± 0,52	0,711
Núcleo com cariorrexe ^{NS}	1,67 ± 0,82	1,67 ± 0,82	1,33 ± 0,52	1,83 ± 0,75	1,17 ± 0,41	0,432
Perda do aspecto cordonal ^{NS}	0,17 ± 0,52	1,17 ± 0,41	1,50 ± 0,52	1,33 ± 0,55	1,33 ± 0,75	0,074
Perda do núcleo dos hepatócitos	0,17 ± 0,41 ^b	1,17 ± 0,75 ^{ab}	1,50 ± 0,80 ^a	1,33 ± 0,52 ^a	1,33 ± 0,52 ^a	0,015
Hipertrofia dos hepatócitos ^{NS}	1,67 ± 0,41	1,83 ± 0,75	2,33 ± 0,84	2,50 ± 0,52	2,17 ± 0,52	0,098

¹ As alterações histológicas foram avaliadas semi-quantitativamente por grau de severidade das lesões no tecido. Os graus foram: 0 (ausência de alteração), 1 (leve alteração, o correspondente até 25% do tecido), 2 (alteração moderada, de 25% até 50% do tecido) e 3 (alteração severa, de 50% até 75% do tecido). Resultados foram obtidos com base na análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn e expressos em média e desvio padrão, de três tanques por tratamento (n=2 peixes por tanque).

² Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0,05).

NS Não significativo

Figura 4 - Alterações histológicas de tecidos hepáticos em juvenis de tilápia-do nilo alimentados com doses crescentes de colesterol dietético a 22 °C. Em “A”, tratamento 0% observa-se esteatose em menor intensidade, (setas), escala 50 µm; Em “B”, tratamento 0,5%, têm-se esteatose em maior intensidade (setas), barra 50 µm; Em “C” tratamento 0%, observa-se menor intensidade de perda do núcleo dos hepatócitos (setas), barra 20 µm; Em “D” Tratamento 0,5%, observa-se maior intensidade de perda do núcleo dos hepatócitos (setas), barra 20 µm. Coloração: H&E.



Entretanto, a perda do núcleo dos hepatócitos foi significativamente mais intensa nos peixes alimentados com as dietas 0,5%, 0,75% e 1% de colesterol dietético (Figura 4-C), quando comparado com os que receberam a dieta 0,25%, ou aos que foram alimentados sem suplementação de colesterol. Estes resultados podem indicar um comprometimento do funcionamento normal do hepatopâncreas quando os peixes são alimentados com dietas suplementadas a partir de 0,5% de colesterol, em temperatura subótima de 22 °C. Ainda, são limitados os relatos do efeito da suplementação de colesterol na morfologia hepática de peixes, ainda assim, o presente estudo demonstra possíveis efeitos deletérios da suplementação dietética do colesterol principalmente no hepatopâncreas dos peixes.

4.5 RESPOSTAS TRANSCRICIONAIS

Os peixes obtêm colesterol por meio da dieta ou da síntese *de novo* e sua homeostase é alcançada por meio da regulação da biossíntese, absorção, transporte, efluxo e esterificação, de forma a evitar a excessiva acumulação (LUO, YANG, SONG, 2020).

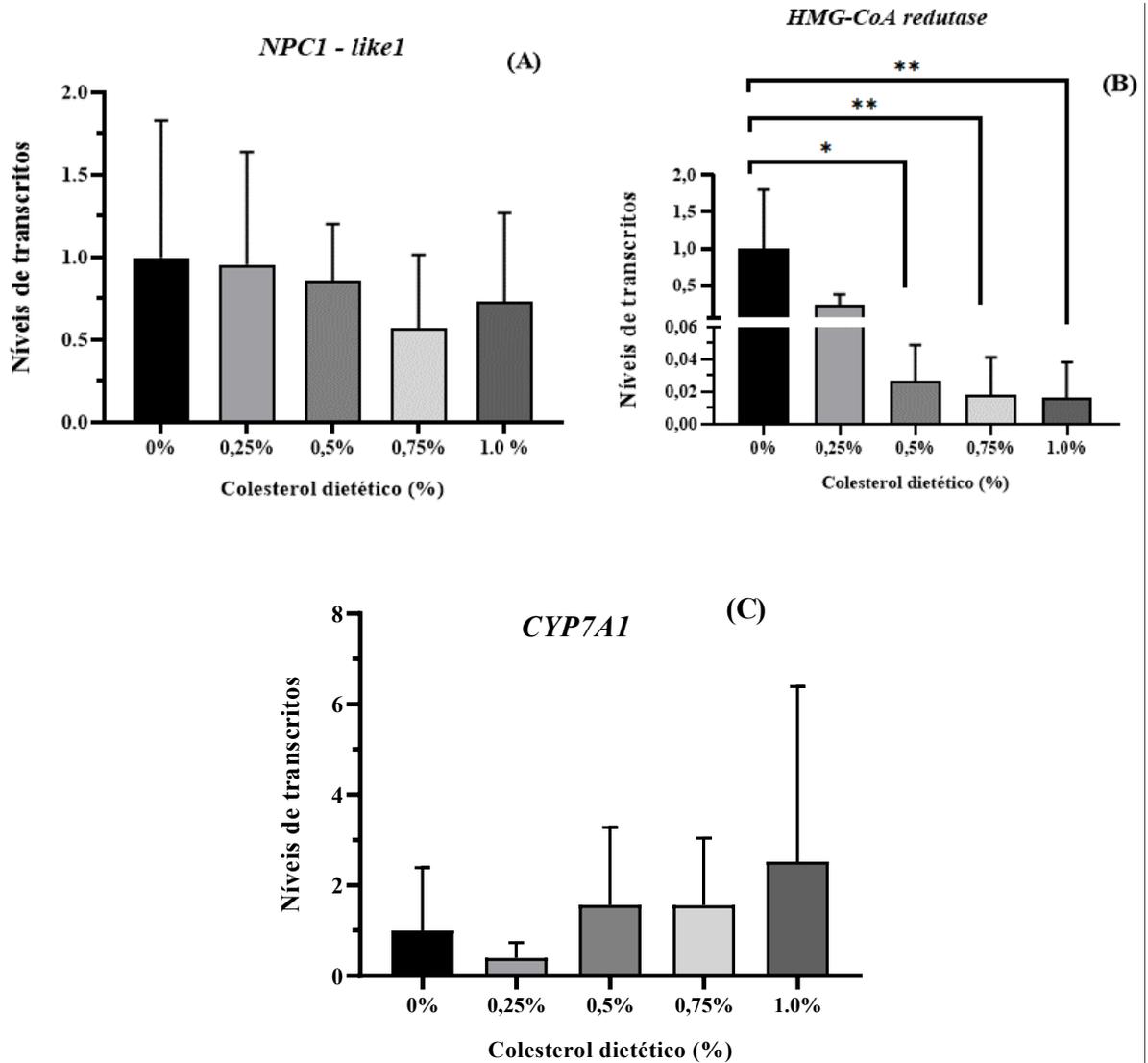
São limitados os trabalhos com a suplementação dietética de colesterol em peixes que avaliam os níveis de transcritos, quando comparados com àqueles que avaliam atividade proteica ou enzimática (DENG *et al*, 2014; ZHU *et al*, 2018). Este é o primeiro estudo sobre o efeito da suplementação de colesterol dietético nos níveis de transcritos de genes envolvidos no metabolismo de colesterol em juvenis de tilápia-do-nilo criados em temperatura subótima de 22 °C. Os níveis de transcritos de três genes-chave relacionados com o metabolismo do colesterol foram analisados neste estudo: *Niemann – Pick C1-like 1 (NPC1L1)*, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (*HMGCr*) e colesterol 7 α -hidroxilase (*CYP7A1*).

O nível de transcritos de *HMGCr* reduziu significativamente com a suplementação crescente de colesterol na dieta (Figura 5-B), o que significa que a suplementação reduziu o nível de transcritos do gene codificante da proteína HMGCr, responsável pela síntese de colesterol no hepatopâncreas. Resultados similares já foram relatados para juvenis de linguado (ZHU *et al* 2018), bem como em mamíferos (LINN, 1967; SHAPIRO e RODWELL, 1969; SIPERSTEIN e FAGAN, 1966). Baixos níveis de colesterol dietético suplementar (0,3 a 0,9%) foram suficientes para reduzir significativamente a atividade da HMGCr, em juvenis de truta-arco-íris (DENG *et al*, 2013). Isto sugere que, no presente estudo, a inibição da síntese de colesterol - registrada principalmente nas tilápias alimentadas com dietas suplementadas com 0,5%, 0,75% e 1% de colesterol - seja um mecanismo adaptativo para contrapor as altas concentrações de colesterol fornecidas na dieta. Esta fato é esperado e resultados semelhantes foram relatados em estudo recente com juvenis de tilápia-do-nilo criados a 28 °C e alimentados com dieta suplementada com colesterol, variando de 0,8 a 3,2% (LI *et al*, 2023), bem como em outro estudo com juvenis de truta criados a 14 a 18 °C, quando alimentados com 0,9% de colesterol (DENG *et al*, 2014). A inibição da síntese endógena de colesterol demonstrada neste estudo a temperatura subótima de 22 °C, se mostra similar aos relatados em outros estudos conduzidos em temperatura ótima de crescimento de outras espécies, incluindo a própria tilápia-do-nilo (DENG *et al*, 2013; LI *et al*, 2023; ZHU *et al*, 2018). Este fato pode estar relacionado com a eficiência na absorção de colesterol dietético em peixes alimentados com dietas suplementadas com fontes sintéticas de colesterol, independentemente da temperatura de criação ou de conforto para a espécie.

A absorção do colesterol é regulada pela proteína NPC1L1, presente no lúmen do intestino (LUO, YANG, SONG, 2020). No presente estudo, observaram-se perfis aparentemente diferentes em níveis de transcritos de *NPC1L1*, mas sem diferença estatística (Figura 5-A). Diferentemente do presente estudo, outros estudos conseguiram detectar alterações nos níveis de transcritos de *NPC1L1*. Houve redução da expressão da *NPC1L1* em juvenis de *Takifugu rubripes* e juvenis de salmão do Atlântico quando alimentados com dietas contendo 1% e 1,5% de colesterol, respectivamente (SONG *et al*, 2023; KORTNER *et al*, 2014). Nesses estudos, a redução na expressão da *NPC1L1*, pode estar relacionada a uma resposta regulatória típica dos peixes de forma a reduzir a absorção do colesterol, com vista a prevenir uma influência potencialmente negativa de excesso de colesterol.

Uma resposta ao excesso de colesterol nos hepatócitos é a degradação deste pela proteína CYP7A1 para a síntese de ácidos biliares, importantes na digestão de lipídios. Neste estudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre níveis de transcritos da *CYP7A1* (Figura 5-C).

Figura 5 - Níveis de transcritos dos genes (A) *NPC1L1*, (B) *HMGCr* e (C) *CYP7A1*, relacionados à absorção, síntese e degradação de colesterol, respectivamente, em juvenis de tilápia-do-nylo, quando alimentados com níveis crescentes de colesterol e criados em temperatura subótima de 22 °C. Valores expressos em média de seis repetições por tratamento (n=12).



Em outro estudo, foi possível detectar diferenças estatísticas para níveis de transcritos da *CYP7A1*, conforme relatado por Zhu *et al* (2018). Nesse estudo, realizado em temperatura ótima de crescimento para juvenis de linguado, a suplementação de 1 e 2% de colesterol dietético favoreceu a degradação de colesterol no hepatopâncreas ($P < 0,05$). Ainda, em outro estudo, juvenis de tilápia-do-nylo criadas a 28 °C, apresentaram acúmulo significativo de colesterol e de sais biliares no hepatopâncreas bem como aumento dos níveis de transcritos da *CYP7A1*, quando alimentados com dietas suplementadas com e alimentados com 1,6% de colesterol dietético (LI *et al*, 2023). Ainda nesse estudo, os juvenis que receberam a suplementação apresentaram maior conteúdo de colesterol nas vesículas biliares e fezes,

quando comparados àqueles alimentados com dieta sem suplementação. Entretanto, salienta-se que no estudo de Li e colaboradores (2023) foram ofertadas dietas contendo 1,6% a 3,2% de colesterol, doses superiores ao máximo utilizado no presente estudo.

Os resultados do presente estudo sugerem que a inibição da síntese de colesterol no hepatopâncreas pode ter contribuído para a sua homeostase nos hepatócitos, frente a suplementação de doses crescentes de colesterol dietético. Entretanto, mais trabalhos visando esclarecer os mecanismos metabólicos de modulação do colesterol, principalmente em condições de temperatura subótima de 22 °C para tilápias-do-nilo, se tornam necessários.

5 CONCLUSÕES

A suplementação de colesterol dietético em juvenis de tilápia - criados em temperatura de 22 °C - refletiu no seu acúmulo crescente no hepatopâncreas e plasma. A suplementação favoreceu ainda o aumento de lipídio no hepatopâncreas e diminuição no plasma, o que corrobora com o aumento crescente da gordura visceral e hepática, além das alterações morfológicas observadas no hepatopâncreas. O aumento da intensidade de esteatose no hepatopâncreas e a perda de núcleos dos hepatócitos sugere efeito direto da suplementação no acúmulo de gordura nos peixes. A suplementação crescente não afetou a absorção e degradação de colesterol pelos peixes, mas contribuiu para alterações metabólicas importantes. Houve redução da síntese de colesterol no hepatopâncreas, favorecendo principalmente o acúmulo de gordura e dano hepático, o que pode afetar o funcionamento normal deste tecido e bem-estar dos peixes. Sugere-se, desta forma, que a suplementação dietética de colesterol não ultrapasse 0,5%, para tilápias criadas em condições de temperatura subótima de 22 °C.

AGRADECIMENTOS

À Alltech Inc. (EUA) por financiar o presente estudo por meio de uma aliança de pesquisa com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC-Brasil). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil) pela concessão de bolsa (nº 24/2018) a Jorge F. Banze, sob o programa TWAS (*The World Academy of Sciences*), e de bolsa de produtividade em pesquisa à Débora M. Fracalossi.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, 1999.

ABDEL-GHANY, H.M.; EL-SAYED, A.F.M.; EZZAT, A.A.; ESSA, M.A.; HELAL, A.M. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of thermal Biology**, 79, 50–55, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.009>.

AZAZA, M.S.; DHRAIEF, M.N.; KRIEM, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, 98–105, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.05.007>.

BATISTA, R.O.; NOBREGA, R.O.; SCHLEDER, D.D.; PETTIGREW, J.E.; FRACALLOSSI, D.M. *Aurantiochytrium* sp. meal improved body fatty acid profile and morphophysiology in Nile tilapia reared at low temperature. **Fishes**, v. 6, 45, 2021. <https://doi.org/10.3390/fishes6040045>.

BLIGH, E. G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, 911–917, 1959. <https://doi.org/10.1139/O59-099>.

BRUM, A.; CARDOSO, L.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. A. M.; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490: 98-107, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040>.

CHARO-KARISA, H.; REZK, M. A.; BOVENHUIS, H.; & KOMENH. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. **Aquaculture**, v. 249, 115–123, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.029>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; BLOCK, J.M.; FRACALLOSSI, D.M. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture** v. 497, 82–90, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; MATTIONI, B.; BLOCK, J.M.; FRACALLOSSI, D.M. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, 1016–1026, 2017. <https://doi.org/10.1111/anu.12469>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; MATTIONI, B.; TURCHINI, G.M.; FRACALLOSSI, D.M. LC-PUFA endogenous biosynthesis is improved in Nile tilapia fed plant-oil sources at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 562, 738832, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738832>.

DENG, J.; BI, B.; KANG, B.; KONG, L.; WANG, Q.; ZHANG, X. Improving the growth performance and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soyabean meal-based diets using dietary cholesterol supplementation. **British Journal of Nutrition**, v. 110, 29–39, 2013.

DENG, J.; ZHANG, X.; LONG, X.; TAO, L.; WANG, Z.; NIU, G.; KANG, B. Effects of dietary cholesterol supplementation on growth and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with cottonseed meal or rapeseed meal. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, 1827–1838, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9971-2>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation**. FAO, Rome, IT. 2022.

GLENCROSS, B.D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, 71–124, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. Lipid Biochemistry – An Introduction. 5th Edition. **Blackwell Science Ltd**, a Blackwell Publishing Company Editorial Office, 2002.

HENDERSON, R.J.; TOCHER, D.R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progress in Lipid Research**, v. 26: 281–347, 1987. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(87\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0163-7827(87)90002-6).

JIN, G.; ZHANG, L.; MAI, K.; CHEN, X.; XU, S.; AI, Q. Effects of different dietary lipid sources on growth performance, hepatic lipid deposition and transcriptome response in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). **Aquaculture**, v. 566:739143, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739143>.

KORTNER, T. M.; BJORKHEM, I.; TIMMERHAUS, G.; KROGDAHL, A. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, v. 111, 2089–2103, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000373>.

LI, *et al.* High cholesterol intake remodels cholesterol turnover and energy homeostasis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Life Science & Technology**, v. 5:56–74, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00158-7>.

LINN, T.C., 1967. The effect of cholesterol feeding and fasting upon β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, 990–993.

LUO, J.; YANG, H.; SONG, B.-L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology**, v. 21, 225–245, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>.

MA, X.Y.; QIANG, J.; HE, J.; GABRIEL, N.N.; XU, P. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, 937–950, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0059-4>.

MAITA, M.; MAEKAWA, J.; SATOH, K. I.; FUTAMI, K.; SATOH, S. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. **Fisheries Science**, v. 72(3), 513–519, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01179.x>

MATSUMOTO, J.; ERAMI, K.; OGAWA, H.; DOI, M.; KISHIDA, T.; EBIHARA, K. The protease-resistant fraction of smoked, dried bonito lowers serum cholesterol in ovariectomized rats fed cholesterol-free diets. **Journal of Food Science**, v. 70, 467–474, 2005.

NAKANO, T., INOUE, I., MURAKOSHI, T. A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels – Review. **Nutrients**, v. 11, 310, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020310>.

NOBREGA, R.O.; BANZE J.F.; BATISTA, R.O.; FRACALOSI, D.M. Improving winter production of Nile tilapia: What can be done? **Aquaculture Reports**, v. 18, 100453, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100453>.

PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe BR 2023. **Associação Brasileira da Piscicultura**, 2023.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, 1101–1108, 2008. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

SCHWAIGER, J.; WANDE, R.; ADM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, 75–86, 1997.

SEALEY, W.M.; CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. Dietary cholesterol and lecithin have limited effects on growth and body composition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture Nutrition**, v. 7, 25–31, 2001.

SHAPIRO, D.J.; Rodwell, V.W. Diurnal variation and cholesterol regulation of hepatic HMG-CoA reductase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 37, 867–872, 1969.

SIPERSTEIN, M.D.; FAGAN, V.M. Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, 602–609, 1966.

SONG, Z. *et al.* Dietary Cholesterol Supplementation Inhibits the Steroid Biosynthesis but Does Not Affect the Cholesterol Transport in Two Marine Teleosts: A Hepatic Transcriptome Study. **Aquaculture Nutrition**, v. 2023, Article ID 2308669, 14 pages, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/2308669>

TOCHER, D.R.; BENDIKSEN, E.Å.; CAMPBELL, P.J.; BELL, J.G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, v. 280, 21–34, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>.

TURCHINI, G.M.; TORSTENSEN, B.E.; NG, W.K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, 10–57, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.

TWIBELL, R.G.; WILSON R.P. Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish,

Ictalurus punctatus. **Aquaculture**, v. 236, 539–546, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.028>.

WU, T.-M.; JIANG, J.-J.; LU, R.-M.; LIN, Y.-H. Effects of dietary inclusion of soybean meal and cholesterol on the growth, cholesterol status and metabolism of the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 00:1–7, 2019. <https://doi.org/10.1111/anu.12997>.

XU, C.; LI, E.; XU, Z.; SU, Y.; LU, M.; QIN, J. G.; Wang, X. Growth, and stress axis responses to dietary cholesterol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 1–10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00254>.

YAN, J.; LIAO, K.; WANG, T.; MAI, K.; XU, W.; AI, Q. Dietary Lipid Levels Influence Lipid Deposition in the Liver of Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) by Regulating Lipoprotein Receptors, Fatty Acid Uptake and Triacylglycerol Synthesis and Catabolism at the Transcriptional Level. **PLoS ONE**, v. 10(6): e0129937, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129937>.

YUN, B.; MAI, K.; ZHANG, W.; XU, W. Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) fed high plant protein diets. **Aquaculture**, v. 319(1–2), 105–110, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.028>.

ZHANG, W.; DONG X.; TAN, B.; ZHANG, S.; CHEN, X. Effects of dietary cholesterol content on growth performance, tissue biochemical indices and liver lipid metabolism related enzyme activities of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 28, 1945-1955, 2016.

ZHENG, J.L.; LUO, Z.; ZHUO, M.Q.; PAN, Y.X.; SONG, Y.F.; HU, W.; CHEN, Q. L. Dietary L-carnitine supplementation increases lipid deposition in the liver and muscle of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) through changes in lipid metabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 112 (5), 698–708, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001378>.

ZHU, T.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; ZHOU, H.; LIUFU, Z. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. **Aquaculture**, v. 428–429, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.027>.

ZHU, T.; CORRAZE, G.; PLAGNES-JUAN, E.; SKIBA-CASSY, S. Cholesterol metabolism regulation mediated by SREBP-2, LXR α and miR-33a in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) both in vivo and in vitro. **PLoS ONE**, v. 15(2): e0223813, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223813>.

ZHU, T.; MAI, K.; XU, W.; AI, Q. Effect of dietary cholesterol and phospholipids on feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **Aquaculture**, v. 495, 443-451, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.002>.

CONCLUSÕES GERAIS

Este é o primeiro estudo sobre a suplementação dietética com colesterol para juvenis de tilápia-do-nilo criados em temperatura subótima de 22 °C.

A suplementação dietética com colesterol em dietas para juvenis de tilápias-do-nilo criados em temperatura de 22 °C, mostrou-se importante para elucidar o seu efeito no desempenho, digestibilidade de nutrientes, histologia e aspectos do metabolismo. Dentre os efeitos positivos, pode se destacar a não redução do crescimento com a suplementação. Destaca-se o efeito negativo da suplementação de colesterol sobre a digestibilidade da proteína bruta, extrato etéreo, e ácidos graxos, em juvenis de tilápia-do-nilo criados a 22 °C.

Este estudo, demonstrou que em condições de temperatura baixa as propriedades dos lipídios dietéticos como: temperatura de fusão, comprimento da cadeia acil e grau de insaturação são determinantes na digestibilidade de nutrientes e eficiência alimentar.

As alterações morfológicas no hepatopâncreas demonstradas no presente estudo, contribuem com resultados importantes sobre possível limite na capacidade dos peixes de lidar com o consumo de colesterol dietético, a partir de 0,5%.

Em relação a expressão de genes, este estudo demonstrou que a suplementação com colesterol influencia a homeostase celular de colesterol, reduzindo a síntese de colesterol.

Mais estudos com juvenis de tilápia-do-nilo em temperatura subótima de 22 °C, com dietas contendo doses de colesterol dietético inferiores às testadas no presente estudo, são necessários para elucidar sua importância no desempenho das tilápias. Ainda, estudos com diferentes relações de colesterol: LC-PUFA, são interessantes para a elucidação o possível efeito deste esterol no crescimento da tilápia-do-nilo em temperatura abaixo do seu conforto térmico, sem comprometer o metabolismo e bem-estar da espécie.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABDEL-GHANY, H.M.; EL-SAYED, A.F.M.; EZZAT, A.A.; ESSA, M.A., HELAL, A.M. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Thermal Biology**, v. 79, 50–55, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.009>.
- ATWOOD, H.L.; TOMASSO, J.R.; WEBB, K.; GATLIN, D.M. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of environmental and dietary factors. **Aquaculture Research**, v. 34, 241–251, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00811.x>.
- AZAZA, M.S.; DHRAÏEF, M.N.; KRAÏEM, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, 98–105, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.05.007>.
- BACH, D.; WACHTEL, E. Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1610 (2), 187–197, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00017-8).
- BALARIN, J.D; HALLER, R.D. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways, and cages. In: *Muir, J.F. and Roberts, R.J. (eds) Recent Advances in Aquaculture*, Croom Helm, London and Canberra, and Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 267–355, 1982.
- BATISTA, R.O.; RICHTER, B.L.; BANZE, J.F.; SCHLEDER, D.D.; SALHI, M.; NOBREGA, R.O.; da SILVA, M.F.O.; MATTIONI, B.; PETTIGREW, J.E.; FRACALOSSI, D.M. Soy Lecithin Supplementation Promotes Growth and Increases Lipid Digestibility in GIFT Nile Tilapia Raised at Suboptimal Temperature. **Fishes**, v. 8, 404, 2023. <https://doi.org/10.3390/fishes808040>.
- BETTERS, J. L.; YU, L. NPC1L1 and Cholesterol Transport. **FEBS Letters**, v. 23(1), 1–7, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.030>.
- BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; WATHNE, E. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, 181–191, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00103.x>.
- CHEN, J.Y.; CHEN, J.C.; WU, J.L. Molecular cloning, and functional analysis of zebrafish high-density lipoprotein-binding protein. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 136B, 117–130, 2003.
- CHERVINSKI, J. Environmental physiology of tilapias. In: *Pullin, R.V.S. and Lowe-McConnell, R.H. (eds) The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings No. 7*, ICLARM, Manila, Philippines, pp. 119–128, 1982.
- CHRISTON, R.; MESLIN, J.C.; THÉVENOUX, J.; LINARD, A.; LÉGER, C.L.; DELPAL, S. Effects of a low dietary linoleic acid level on intestinal morphology and enterocyte brush border membrane lipid composition. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 31(6):691-701, 1991. <https://doi.org/10.1051/rnd:19910609>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; BLOCK, J.M.; FRACALOSSO, D.M. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 497, 82–90, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.

CORRÊA, C.F.; NOBREGA, R.O.; MATTIONI, B.; BLOCK, J.M.; FRACALOSSO, D.M. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, 1016–1026, 2017. <https://doi.org/10.1111/anu.12469>.

COSSIN, A. R.; SINENSKY, M. Adaptation of membranes to temperature, pressure, and exogenous lipids. *In* **Physiology of Membrane Fluidity**, Boca Raton: CRC (ed. M. Shinitzky). v. 2, 1–20, 1984.

CRAIG, S. R.; NEILL, W. H.; GATLIN, D. M. Effects of dietary lipid and environmental salinity on growth, body composition, and cold tolerance of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 14, 49–61, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00004290>.

CROCKETT, E.L.; HAZEL, J.R. Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, 1105–1113, 1995. <https://jeb.biologists.org/content/198/5/1105>. Accessed on 11 Oct. 2019.

DA SILVA, B.C.; PEREIRA, A.; MARCHIORI, N.d.C.; MARIGUELE, K.H.; MASSAGO, H., KLABUNDE, G. H.F. Cold Tolerance and Performance of Selected Nile tilapia for Suboptimal Temperatures. **Aquaculture Research**, v. 52:1071–1077, 2020. <https://doi.org/10.1111/are.14962>

DAN, N.C.; LITTLE, D.C. Overwintering performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) broodfish and seed at ambient temperatures in northern Vietnam. **Aquaculture Research**, v. 31, 485–493, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00466.x>.

DE SILVA S.S.; ANDERSON, T.A Fish Nutrition in Aquaculture (Book). **Chapman & Hall**, London. , 1995.

DENG, J.; BI, B.; KANG, B.; KONG, L.; WANG, Q.; ZHANG, X. Improving the growth performance and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soyabean meal-based diets using dietary cholesterol supplementation. **British Journal of Nutrition**, v. 110, 29–39, 2013a. <https://doi.org/10.1017/S0007114512004680>.

DENG, J.; KANG, B.; TAO L.; RONG, H.; ZHANG, X. Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, 1, 324–331, 2013b. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.008>.

DENG, J.; MAI, K.; AI, Q.; ZHANG, W.; WANG, X.; TAN, B.; MA, H. Interactive effects of dietary cholesterol and protein sources on growth performance and cholesterol metabolism of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 16(4), 419–429, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00681.x>.

DIETSCHY, J.M., TURLEY, S.D., SPADY, D.K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low-density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. **Journal of Lipid Research**, v. 34, 1637–1659, 1993.

DOLGANIUC A. Role of lipid rafts in liver health and disease. **World J Gastroenterol**, v. 17(20): 2520-2535, 2011. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i20.2520>.

DONALDSON, M.R.; COOKE, S.J.; PATTERSON, D.A.; MACDONALD, J.S. Cold shock and fish, **Journal of Fish Biology**, v. 73, 1491–1530, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x>.

EL ASELY, A.M.; REDA, R.M.; SALAH, A.S.; MAHMOUD, M.E.; DAWOOD, M.A.O. Overall performances of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) associated with using vegetable oil sources under suboptimal temperature. **Aquaculture Nutrition**, v. 26:1154-1163, 2020. <https://doi.org/10.1111/anu.13072>.

EL-SAYED, A.F. Tilapia culture. *In: American Fisheries Society Symposium*. (Book) **CABI Publishing**, 2006

EL-SAYED, A-F. M.; EL-GHOBOSHI, A.; AL-AMOUDI, M. Effects of pond depth and water temperature on growth, mortality and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v. 27, 681-687, 1996. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1996.00776.x>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation**. FAO, Rome, IT. 2022.

FRACALOSSO, D.M.; LOVELL, R.T. Growth and liver polar fatty acid composition of year-1 channel catfish fed various lipid sources at two water temperatures. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 57, 107–113, 1995. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1995\)057<0107:GALPFA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1995)057<0107:GALPFA>2.3.CO;2).

FRANCIS D.S.; TURCHINI G.M.; JONES P.L.; DE SILVA, S.S. Growth performance, feed efficiency and fatty acid composition of juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*, fed graded levels of canola and linseed oil. **Aquaculture Nutrition**, v. 13:335–350, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00480.x>

GONG, H.; LAWRENCE, A. L.; JIANG, D. H.; CASTILLE, F. L.; GATLIN, D. M. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. **Aquaculture**, v. 190(3–4), 305–324, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00414-2).

HAZEL, J.R.; WILLIAMS, E.E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. **Progress in Lipid Research**, v. 29, 167–227, 1990.

HEPHER, B.; PRUGININ, Y. Commercial Fish Farming with Special Reference to Fish Culture in Israel. Book. **Wiley-Interscience**, New York, 261 pp, 1981.

HERTRAMPF, J.W.; PIEDAD-PASCUAL, F. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds (Book). **Springer-Science Business Media, B.V.**, 2000

JUN, Q.; JIE, H.; HONG, Y.; HUI, W.; KPUNDEHB, M.D.; PAO, XU., ZHIXIANG, Z. 2014. Temperature modulates hepatic carbohydrate metabolic enzyme activity and gene expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed a carbohydrate-enriched diet. **Journal of Thermal Biology**, v. 40, 25–31, 2014.

KORTNER, T. M.; BJORKHEM, I.; TIMMERHAUS, G.; KROGDAHL, A. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, v. 111, 2089–2103, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000373>.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; KRISTY, N.R.; BENJAMIN, M.A.; BOWMAN, A.; THOMPSON, K.R. H.; TIDWELL, J. Metabolism and Nutritive Role of Cholesterol in the Growth, Gonadal Development, and Reproduction of Crustaceans, **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, 26:2, 254-273, 2018. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1429384>.

LI, *et al.* High cholesterol intake remodels cholesterol turnover and energy homeostasis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Life Science & Technology**, v. 5:56–74, 2023 <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00158-7>.

LILAND, N. S.; ESPE, M.; ROSENLUND, G.; WAAGBØ, R.; HJELLE, J. I.; LIE, Ø.; FONTANILLAS, R.; TORSTENSEN B. E. High levels of dietary phytosterols affect lipid metabolism and increase liver and plasma TAG in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, v. 110, 1958–1967, 2013. doi:10.1017/S0007114513001347.

LIN, Z. Pond Fisheries in China. **International Academic Publishers**, Oxford, 260, 1991.

LU, D. L.; MA, Q.; WANG, J.; LI, L. Y.; HAN, S. L.; LIMBU, S. M.; ... DU, Z. Y. Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid catabolism and autophagy. **The Journal of Physiology**, v. 597(6), 1585–1603, 2019. <https://doi.org/10.1113/JP277091>.

LUO, J.; YANG, H.; SONG, B.-L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology**, v. 21, 225-245, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>.

MA, X.Y.; QIANG, J.; He, J.; GABRIEL, N.N.; XU, P. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, 937–950, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0059-4>.

MABDEL-AAL, M. Effects of over-wintering and water depth on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 8Th Int. **Tilapia Aquaculture Symposium**, 297–306, 2008.

MAITA, M.; MAEKAWA, J.; SATOH, K. I.; FUTAMI, K.; SATOH, S. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. **Fisheries Science**, v. 72(3), 513–519, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01179.x>.

MATSUMOTO, J.; ERAMI, K.; OGAWA, H.; DOI, M.; KISHIDA, T.; EBIHARA, K. The protease-resistant fraction of smoked, dried bonito lowers serum cholesterol in ovariectomized rats fed cholesterol-free diets. **Journal of Food Science**, v. 70, 467–474, 2005.

NAKANO, T.; INOUE, I.; MURAKOSHI, T. A Newly Integrated Model for Intestinal Cholesterol Absorption and Efflux Reappraises How Plant Sterol Intake Reduces Circulating Cholesterol Levels – Review. **Nutrients**, v. 11, 310, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11020310>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Fish. **National Academy Press**, Washington, DC, 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Fish. **National Academy Press**, Washington, DC, 360pp, 2011.

NELSON, D.L., COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger; (Livro) 6. ed. **Porto Alegre: Artmed**, 2014, p. 1250, 2014.

NOBREGA, R. O.; BATISTA, R. O.; CORRÊA, C. F.; MATTIONI, B.; FILER, K.; PETTIGREW, J. E.; FRACALOSSO, D. M. Dietary supplementation of *Aurantiochytrium sp.* meal, a docosahexaenoic-acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. **Aquaculture**, v. 507 (February), 500–509, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>.

NOBREGA, R.O.; BANZE J.F.; BATISTA, R.O.; FRACALOSSO, D.M. Improving winter production of Nile tilapia: What can be done? **Aquaculture Reports**, v. 18, 100453, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100453>.

NOBREGA, R.O.; CORRÊA, C.F.; MATTIONI, B.; FRACALOSSO, D.M. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 471, 66–71, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.026>.

OHVO-REKILÄ H.; RAMSTEDT, B.; LEPPIMÄKI, P.; SLOTTE, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes - Review. **Progress in Lipid Research**, v. 41, 66–97, 2002.

PEIXE-BR DA PISCICULTURA. Associação Brasileira da Piscicultura. *In: Anuário 2023. Texto Comunicação Corporativa*, 14-20p, 2023.

PIKE, L.J. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. **Journal of Lipid Research**, v. 47, 1597–1598, 2006. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>.

PULLIN, R.S.V. Cichlids in aquaculture. *In: Cichlid fishes, Behaviour, Ecology and Evolution* (ed. **M.H.A. Keenleyside**) Chapman & Hall, London, England. pp. 280–309, 1991.

SAUCEDO, P.E.; OCAMPO, L.; MONTEFORTE M., BERVERA, H. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), **Aquaculture**, 229 (1–4) 377–387, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00327-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00327-2)

SEALEY, W.M.; CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. III. Dietary cholesterol and lecithin have limited effects on growth and body composition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture Nutrition**, v. 7, 25–31, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2001.00159.x>.

SHAIKH, S.R.; EDIDIN, M.A. Membranes are not just rafts. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 144(1):1-3, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.06.017>.

SISSENER, N.H.; LILAND, N.S.; HOLEN, E.; STUBHAUG, I.; TORSTENSEN, B.E.; ROSENBLUND, G. Phytosterols are not involved in the development of fatty liver in plant oil fed Atlantic salmon (*Salmo salar*) at high or low water temperature. **Aquaculture**, v. 480, 123–134, 2017a. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.007>.

SISSENER, N.H.; TORSTENSEN, B.E.; LILAND, N.S.; STUBHAUG, I.; ROSENBLUND, G. Temperature modulates liver lipid accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed low dietary levels of n–3 long-chain fatty acids. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, 865-878, 2017b. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12453>.

TOCHER, D. R.; BENDIKSEN, E. Å.; CAMPBELL, P. J.; BELL, J. G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, v. 280 (1–4), 21–34, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>.

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

TURCHINI, G.M.; KEONG-NG, W.; TOCHER, D.R. Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. **Ed. 1. New York.**, CRC Press, 522p., 2010.

TURCHINI, G.M.; TORSTENSEN, B.E.; NG, W.K. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v. 1, 10–57, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.

TWIBELL, R.G.; WILSON, R.P. Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 236, 539–546, 2004.

WALLAERT, C.; BABIN, P.J. Thermal adaptation affects the fatty acid composition of plasma phospholipids in trout. **Lipids**, v. 29, 373–376, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF02537193>.

WANG, X.; JIANG, W.; FENG, L.; WU, P.; LIU, Y.; ZENG, Y.; JIANG, J.; KUANG, S.; TANG L.; TANG, W.; ZHOU, X. Low or excess levels of dietary cholesterol impaired immunity and aggravated inflammation response in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 78, 202-221, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.030>.

WU, T.-M.; JIANG, J.-J.; LU, R.-M.; LIN, Y.-H. Effects of dietary inclusion of Soybean meal and cholesterol on the growth, cholesterol status and metabolism of the Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 00, 1–7, 2019. <https://doi.org/10.1111/anu.12997>.

XU, C.; LI, E.; XU, Z.; SU, Y.; LU, M.; QIN, J. G.; Wang, X. Growth, and stress axis responses to dietary cholesterol in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in brackish water. **Frontiers in Physiology**, 9 (MAR), 1–10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00254>.

YUN, B.; MAI, K.; ZHANG, W.; XU, W. Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) fed high plant protein diets. **Aquaculture**, v. 319(1–2), 105–110, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.028>.

ZHU, T.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; ZHOU, H.; LIUFU, Z. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. **Aquaculture**, v. 428–429, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.027>.

ZHU, T.; MAI, K.; XU, W.; AI, Q. Effect of dietary cholesterol and phospholipids on feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **Aquaculture**, 495(June), v. 443–451, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.002>.