

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Mediação de respostas imunes e do sistema  
de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*)**

**Iuri Moraes Neyrão**

Jaboticabal, São Paulo  
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Mediação de respostas imunes e do sistema  
de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*)**

**Iuri Moraes Neyrão**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Criscuolo Urbinati**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jaqueline Dalbello Biller Takahashi**

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

Jaboticabal, São Paulo  
2017

N415m Neyrão, Iuri Moraes  
Mediação de respostas imunes e do sistema de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Iuri Moraes Neyrão.  
-- Jaboticabal, 2017  
viii, 58 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2017

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientadora: Jaqueline Dalbello Biller Takahashi

Banca examinadora: Luis Henrique Montrezor, Marisa Narciso Fernandes

Bibliografia

1. Pacu - cortisol. 2. *Piaractus mesopotamicus* – defesa antioxidante. 3. Estresse oxidativo - imunologia I. Título. II. Jaboticabal - Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Mediação de respostas imunes e do sistema de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

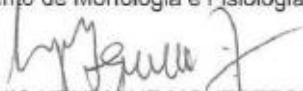
**AUTOR:** IURI MORAES NEYRÃO

**ORIENTADORA:** ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

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



Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR  
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde - Medicina / Universidade de Araraquara - UNIARA



Profa. Dra. MARISA NARCISO FERNANDES  
Departamento de Ciências Fisiológicas / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS

Jaboticabal, 07 de abril de 2017

## Sumário

DEDICATÓRIA .....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
APOIO FINANCEIRO .....	iv
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	vii
CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Produção aquícola.....	1
1.2 Estresse - Conceito geral .....	1
1.3 Papel do cortisol na imunidade .....	3
1.4 Sistema celular de defesa antioxidante e estresse oxidativo .....	7
1.5 Papel do estresse e do cortisol no estresse oxidativo.....	11
1.6 Baço.....	132
1.6 Modelo experimental.....	13
2. JUSTIFICATIVA .....	14
2.1 Hipótese.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Geral.....	15
3.2 Específicos .....	15
4. REFERÊNCIAS .....	16
CAPÍTULO 2 - Mediação de respostas imunes e do sistema hepático de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ).....	16
7	
RESUMO .....	27
ABSTRACT .....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29

<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Animais, protocolo e delineamento experimental .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Preparo das rações.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3 Amostragens e análises.....</b>	<b>33</b>
2.3.1 <i>Análise de indicadores de estresse .....</i>	<i>33</i>
2.3.2 <i>Análise de indicadores imunológicas.....</i>	<i>33</i>
2.3.3 <i>Análise de indicadores de defesa antioxidante hepática .....</i>	<i>33</i>
2.3.4 <i>Análise histológica .....</i>	<i>34</i>
<b>2.4 Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Concentração plasmática de cortisol e glicose (Figura 1A e 1B).....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Atividade respiratória de leucócitos (ARL), atividade hemolítica do sistema complemento (ACH) e concentração sérica de lisozima (CLS) (Figura 2A, 2B e 2C).....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Atividade hepática da glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Figura 3A e 3B) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4 Indicadores de danos teciduais no baço.....</b>	<b>39</b>
3.4.1 <i>Índice esplenossomático (IES) (Figura 4).....</i>	<i>39</i>
3.4.2 <i>Polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV) (Figura 5A e 5B; Figura 7)...</i>	<i>39</i>
3.4.3 <i>Melanomacrófagos (MMs) e Centro de melanomacrófagos (CMMs) (Figura 6A e 6B; Figura 7).....</i>	<i>40</i>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

Dedico esta dissertação à minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em minhas ideias. Mamãe, teu cuidado e dedicação foi o que me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Papai, tua presença significou segurança e certeza que não estou sozinho nessa caminhada. Mana, pelo teu incentivo e apoio constante sempre nos momentos mais cruciais. E, vó, obrigado pelos seus ensinamentos e conselhos, sei que onde eu estiver a senhora sempre estará ao meu lado (☆12/10/1926 †03/11/2016)

Obrigado família...

## **AGRADECIMENTOS**

O espaço limitado desta seção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu mestrado me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação acadêmica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecimento e agradecimento.

Aos meus familiares tantos os Moraes quanto os Neyrão, em especial mamãe, pelo amor e apoio de forma incondicional mesmo distante fisicamente, mas em ligações e conversas, mana, sempre sorridente e atenciosa, e papai, mantendo o equilíbrio dessa família, que me deram suporte financeiro, e principalmente, suporte psicológico/emocional, para mais uma caminhada rumo a uma nova fase da minha vida.

À professora Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela confiança adquirida, orientações devidas nos pontos mais críticos e amizade.

Aos professores Dr. Leonardo Susumo Takahashi e Dra. Jaqueline Dalbello Biller Takahashi, pelo auxílio nas análises, suporte acadêmico e paciência nos ensinamentos repassados.

À professora Dra. Marcia Rita Fernandes Machado, pela disponibilização do micrótomo e disponibilização do espaço para o processamento histológico, assim como à Dr. Taís Harumi de Castro Sasahara, pelos ensinamentos e suporte na avaliação histológica das minhas amostras.

À professora Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pela disponibilização do Laboratório de Processamento de Imagens, e à Regiane e Fernanda pela paciência nos horários e dividir o microscópio em turnos.

Aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação, Dr. Luis Henrique Montrezor e Dra. Mônica Serra, pelas valiosas sugestões fornecidas ao meu trabalho, foi um momento de grande aprendizado.

Aos professores membros da minha banca de defesa, Dra. Marisa Narciso Fernandes e Dr. Luis Henrique Montrezor, pelos conselhos e análises críticas em na dissertação.

À Veralice Cappato e David Oliveira Lorente, pela colaboração nos assuntos administrativos e solução de intermináveis dúvidas.



À Silvinha, pela ajuda nas análises das amostras de água, ao Valdecir e ao Márcio pelo auxílio na obtenção das rações experimentais e empréstimos de equipamentos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes, pelos momentos de horas de trabalho, auxílio nas análises e atividades, mas principalmente, horas de risadas incansáveis.

Aos colegas feitos em Dracena, ao pessoal do GAUD, que deu todo o apoio logístico para a realização dos testes, e em especial aos amigos da República EterNaMent, por todo o suporte no período ao qual estava na cidade, bem como os bons momentos vividos no período em que estive.

Aos amigos da pensão da Tia Sônia, pelos melhores momentos vividos no período ao qual estive em Jabuka, sempre sendo parceiros nas melhores e piores horas, com ideias mirabolantes que tornaram minha estadia na cidade menos cansativa, os agradeço pela amizade que será sem fim.

Aos pesquisadores e professores que conheci durante meu mestrado, pelos ensinamentos e o compartilhamento de experiências pessoais e profissionais.

## **APOIO FINANCEIRO**

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo

“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw (1856-1950)

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

**Figura 1.** Concentrações plasmáticas de cortisol (A) e glicose (B) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamentos ao longo do tempo.....46

**Figura 2.** Atividade respiratória de leucócitos (A), atividade hemolítica do sistema complemento (B) e concentração de lisozima sérica (C) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.....47

**Figura 3.** Atividade hepática da glutathiona peroxidase (A) e catalase (B) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.....48

**Figura 4.** Índice esplenossomático de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos ao longo do tempo.....49

**Figura 5.** Polpa branca (A) e polpa vermelha (B) no baço de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.....50

**Figura 6.** Melanomacrófagos (A) e centros de melanomacrófagos (B) no baço de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.....51

**Figura 7.** Fotomicrografias de polpa vermelha (a), polpa branca (b), melanomacrófagos (cabeça de seta) e centros de melanomacrófagos (seta) no baço de juvenis de pacus submetidos a diferentes protocolos de manejo. (A) peixes controle C e (B) peixes submetidos a estresse E após 1 hora. 40x, Hematoxilina e Eosina. ....52

## RESUMO

Este trabalho avaliou se o sistema imunológico e o sistema antioxidativo hepático de pacu são mediados pelo cortisol circulante, em condições de elevação exógena e endógena do hormônio. Os peixes foram separados em três tratamentos: alimentados com ração comercial controle RC (C); alimentados com RC contendo 400 mg de hidrocortisona / kg (HC); alimentados com RC e captura por 2 minutos seguida de exposição aérea por 4 minutos (E). Os grupos C e HC foram amostrados 1, 3, 6, 24 e 72 horas depois da alimentação (n=9 em cada grupo), enquanto o grupo E foi amostrado 1, 3, 6, 24 e 72 horas após o manejo de exposição aérea. Os peixes tiveram sangue, fígado e baço coletados. No sangue foram determinadas: concentração de cortisol, glicose, atividade respiratória de leucócitos ARL, concentração sérica de lisozima (CLS) e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC); no fígado foram determinadas as atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); e no baço foi realizado o cálculo do índice esplenossomático e análise histológica para avaliação da polpa branca (PB), polpa vermelha (PV), melanomacrófagos (MMs) e centros de melanomacrófagos (CMMs). Os resultados demonstram, de maneira abrangente, aumento das concentrações sanguíneas de cortisol e glicose quando os peixes foram submetidos ao estresse (exógeno e endógeno), assim como elevação da ARL, porém devido ao aumento do cortisol houve diminuição da ARL e AHC, e atividade das enzimas CAT e GPx. E de maneira adicional, o estresse exógeno causou aparecimento de MMs e CMMs no baço, sugerindo possíveis problemas celulares no órgão.

**Palavras-chave:** Estresse, oxidação, cortisol, exógeno, endógeno, baço,

## **ABSTRACT**

This work investigated whether the immune system and the liver antioxidant system are mediated by circulating cortisol, under conditions of exogenous and endogenous elevation of the hormone in pacu. The fish were separated into three treatments: fed with a control commercial diet CD (C); fed with CD containing 400 mg hydrocortisone / kg (HC); fed with CD and exposed to capture for 2 minutes followed by air exposure for 4 minutes (E). The C and HC fish were sampled 1, 3, 6, 24 and 72 hours after feeding (n=9 in each group), while group E was sampled 1, 3, 6, 24 and 72 hours after air exposure. The fish had blood, liver and spleen collected. In the blood it were determined: cortisol concentration, glucose, respiratory activity of leukocytes ARL, concentration of lysozyme (CLS) and hemolytic activity of the complement system (AHC); in the liver it were determined the activities of enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx); and, in the spleen the splenosomatic index and histological analysis for the evaluation of white pulp (PB), red pulp (PV), melanomacrophages (MMs) and melanomacrophagous centers (CMMs). The results demonstrate an increase in blood cortisol and glucose concentrations when fish were submitted to stress (exogenous and endogenous), as well as elevation of ARL. Increased cortisol was associated to a decrease in ARL and AHC, and CAT and GPx enzymes. Additionally, exogenous stress caused the appearance of MMs and CMMs in the spleen, suggesting possible cellular problems in the organ.

**Key-word:** Stress, oxidation, cortisol, exogenous, endogenous, spleen,

---

## **CAPÍTULO 1**

### **1. INTRODUÇÃO GERAL**

#### **1.1 Produção aquícola**

Em 2014, a produção aquícola mundial foi de 73,8 milhões de toneladas, com valores estimados de US\$ 160,2 bilhões (FAO, 2016), com aumento de 18,1 milhões de toneladas nos últimos cinco anos, em comparação à pesca extrativa que estagnou.

O Brasil é o segundo maior produtor de organismos aquáticos no continente americano após o Chile, produzindo 562,5 toneladas, o que representa 26,02% da produção entre as três Américas (FAO, 2016). As perspectivas para aquicultura são boas, com um crescimento esperado na produção acima do nível médio até 2024, impulsionado pelo aumento da demanda interna e pelas políticas nacionais que apoiam o crescimento sustentável do setor (Caisan, 2014). Esse crescimento deve-se, em parte, a um aumento da demanda de produção que acompanha o aumento da população humana (FAO, 2012). Entretanto, o aumento da produção impõe técnicas de cultivo que expõem os peixes à manejos estressantes, além de mudanças naturais das condições do ambiente que afetam negativamente a atividade produtiva (Inoue; Santos Neto; Moraes, 2004).

#### **1.2 Estresse - Conceito geral**

Os agentes estressores ameaçam ou perturbam o equilíbrio homeostático do organismo e provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas de maneira compensatória e/ou adaptativa, habilitando o animal a superar as ameaças (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 1997; Barton, 2002; Tort, 2011). Entretanto, se um animal é submetido a estresse prolongado, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, acarretando danos permanentes à sua saúde e bem-estar. Na fase adaptativa, ocorre a realocação de energia para atividades de alta demanda energética, prioritárias para a sobrevivência, e tal dinâmica, a longo prazo, prejudica atividades, como crescimento, reprodução e imunidade (Pankhursts e Kraak, 1997; Tort, 2011).

A exposição dos peixes a um estressor inicia as respostas fisiológicas pela percepção e reconhecimento da ameaça pelo sistema nervoso central. Inicialmente, fibras nervosas simpáticas, através de receptores colinérgicos, estimulam as células cromafins do rim cefálico que liberam catecolaminas (Reid et al., 1998). Em seguida, ocorre a ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-interrenal (HPI). A liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo controla a síntese e liberação do hormônio corticotrópico (ACTH) pela pituitária, que vai através da circulação até as células interrenais estimular a síntese e secreção de hormônios glicocorticoides, como o cortisol em teleósteos. Em conjunto, catecolaminas e os glicocorticoides iniciam as respostas secundárias e terciárias do estresse.

As respostas de estresse são classificadas como primária, secundária e terciária (Barton, 1997; Barton, 2002) e dependem do caráter agudo ou crônico do estressor. A resposta primária se refere à rápida elevação plasmática de catecolaminas e corticosteroides. A resposta secundária é definida por alteração de parâmetros fisiológicos e bioquímicos sanguíneos e teciduais em resposta às alterações hormonais. Na condição aguda, ocorre aumento nos batimentos cardíacos, maior disponibilidade de oxigênio aos tecidos, mobilização de substratos de energia, além de alterações iônicas e hematológicas, nas células vermelhas e brancas. A resposta terciária, de caráter crônico, compromete o desempenho do animal, aumento da suscetibilidade a doenças e mudanças no comportamento. Esta ocorre em nível de indivíduo e de população e limita a capacidade do animal de tolerar estressores futuros ou adicionais (Barton, 2002).

A resposta aguda ocorre, por exemplo, em manejos de rotina na criação de peixes como captura e transporte (Fagundes e Urbinati, 2008). Já a crônica, ocorre quando os peixes são mantidos em situações adversas, como baixa qualidade da água, alto adensamento populacional (Rowland et al., 2006), por um tempo longo. Em relação às alterações do sistema imune associadas a extensão do estresse, segundo Tort (2011), se o estressor é agudo, as respostas são estimulatórias, e o sistema imune dos peixes mostra uma fase de ativação. Entretanto, se o estressor for crônico, a resposta imune tem um padrão de inibição, situação em que os peixes estão predispostos às doenças.



### 1.3 Papel do cortisol na imunidade

Peixes criados em condições intensivas, em geral, estão sob prolongado estresse que afeta os processos fisiológicos dependentes de energia como reprodução, crescimento e resistência a doenças.

Doenças de peixes são os principais fatores de mortalidade na piscicultura e a imunidade natural tem papel fundamental na resistência a doenças. A ligação entre estresse e susceptibilidade a doenças em animais de criação já é conhecida (Wedemeyer, 1996; Roed et al., 2002; Cnaani et al., 2004; Hoeger et al., 2005).

Organismos que causam infecções estão presentes em todos os ambientes de criação. Peixes, em condições normais de sanidade, podem alojar alguns organismos potencialmente patogênicos, no entanto, sintomas clínicos da doença não ocorrem enquanto o peixe está livre de estresse. O processo infeccioso da doença requer uma condição anormal do peixe reduzindo sua resistência natural à invasão do hospedeiro.

O sistema imune dos peixes divide-se em dois componentes: o específico ou de memória, e o inato, ou não específico, sendo este a primeira barreira que protege o organismo contra agentes infecciosos, sem uma pré-dependência de um agente etiológico específico (Bols et al., 2001; Magnadottir, 2006; Rauta et al., 2012; Secombes e Wang, 2012).

O sistema imune inato, por sua vez, divide-se em dois tipos, celular e humoral. As células do sistema imune em peixes são hábeis em fagocitar e destruir corpos infecciosos (Kantari et al., 2008), sendo os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), monócitos e macrófagos (MMs) responsáveis por iniciar o combate aos patógenos. Os monócitos são células que circulam no sangue periférico (Lorenzi, 1999), e que se transformam em macrófagos quando migram para os tecidos (Griffin, 1984). Monócitos e neutrófilos possuem habilidade citotóxica não-específica (Cuesta et al., 1999). Os PMNs são leucócitos de alta atividade migratória (Griffin, 1984), e são as primeiras células de defesa a deixar os vasos sanguíneos e atuar no sítio de inflamação (Roitt et al., 1998). A destruição dos agentes infecciosos também pode ser causada pelas células citotóxicas não-específicas (NKC), ou ainda através da produção de agentes bactericidas, como proteínas e enzimas líticas (Magnadottir, 2006).

Desta forma, os PMNs e os MMs são as principais células de defesa do organismo contra os agentes infecciosos, possuindo também a capacidade de combater danos teciduais. Segundo Kantari et al. (2008), o papel dessas células não se restringe apenas à fagocitose e destruição do patógeno, mas são células muito importantes para a imunidade, pois atuam na construção e modulação de resposta inata e adquirida.

Um importante mecanismo de defesa dos peixes é a fagocitose, e algumas células são capazes de destruir as partículas invasoras além de processar e introduzir células específicas que irão promover a produção de imunoglobulinas (Neumann et al., 2000). Monócitos, macrófagos e neutrófilos são fagócitos responsáveis por atuar na defesa dos peixes, no entanto outras células podem realizar a fagocitose, de modo que as mesmas precisam realizar a detecção da partícula estranha através de receptores de membrana. As citocinas são liberadas pelos fagócitos no local da inflamação do tecido lesado e promovem a quimiotaxia e a mobilização de fagócitos (Stuart e Ezekowitz, 2005).

Durante a fagocitose de patógenos, os leucócitos aumentam o consumo de oxigênio através da oxidase de NADPH e geram várias Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), tais como: o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), o oxigênio “*singlet*” ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroperóxil ( $HO_2^{\cdot}$ ), em um processo denominado de atividade respiratória. Superóxido e peróxido de hidrogênio são EROs altamente tóxicas e formam a base de um potente sistema antibacteriano (Klebanoff, 1999). A quantidade de EROs pode diferir durante os períodos do ano, bem como o dia, de modo que é influenciado e regulado pela temperatura, assim como os ritmos circadianos (Kaplan et al., 2008; Buchtíková et al., 2011).

Além das células, outros elementos envolvidos na defesa inata são mediadores químicos solúveis. Estas substâncias encontram-se no soro, na forma ativa ou de precursores, e suas concentrações aumentam durante o estágio infeccioso (Verlhac et al., 1996). Dentre os mediadores, o sistema complemento é um importante efetor da resposta imune inata, sendo um conjunto de proteínas envolvidas em uma cascata de reações enzimáticas que, quando ativas, agem em respostas inespecíficas, pela via alternativa, e/ou adquiridas, pela via clássica. O sistema complemento elimina os patógenos através da formação de poros na

parte superficial de sua membrana celular, além de desempenhar papel importante em reações de inflamação, por quimiotaxia, atraindo células fagocitárias para o local da lesão. As proteínas do sistema complemento estimulam a fagocitose, processo mediado por receptores para proteínas do complemento (Holland e Lambris, 2002; Nikoskelainen et al., 2002; Boshra et al., 2006; Nakao et al., 2011). Nos peixes, a atividade de uma das vias do sistema complemento é a alternativa, sendo esta via a mais rápida e mais comum que em mamíferos (Yano, 1996).

A lisozima é outro importante componente não específico do sistema imune, presente em várias espécies de peixes (Grinde et al., 1988). Esta enzima lítica atua contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, está presente no muco, tecidos linfoides, plasma e outros fluídos do corpo (Fast et al., 2002; Palaksha et al., 2008) e, como outros indicadores de atividade imunológica, varia conforme idade e sexo dos animais, estação do ano, temperatura e pH da água, infecção, grau de estresse, agentes químicos e imunoestimulantes (Saurabh e Sahoo, 2008).

Nos peixes ósseos, os tecidos linfoides encontram-se no timo, rim cefálico, baço, mucosas e tecidos associados com o intestino (Powell, 2000). Esses órgãos, em especial, são responsáveis pela geração de linfócitos, monócitos e granulócitos, além dos eritrócitos, porém a intensidade de sua atividade hematopoiética difere entre os teleósteos (Tavares-Dias et al., 2004).

Todos os tipos de estressores podem afetar a capacidade de resposta imune dos peixes, desde que afetem os mecanismos envolvidos no suprimento de energia ou vias metabólicas relacionadas às moléculas chave do sistema imune (Yada e Tort, 2016).

A relação dos sistemas endócrino e imune dos peixes, durante a resposta de estresse, é mediada por uma interação entre hormônios e citocinas. O estresse pode, em geral, afetar negativamente componentes do sistema imune e tornar o peixe vulnerável às infecções e doenças. Basicamente, estresse de baixa intensidade pode aumentar a imunocompetência, enquanto níveis mais severos desta resposta tornam-se imunossupressores.

Em peixes, na resposta aguda, ativadora, participam, além do cortisol, as catecolaminas, o CRH, o ACTH, o hormônio estimulador de melanócitos (MSH),

enquanto na resposta crônica, supressora, participam o cortisol, a prolactina, o hormônio de crescimento (GH) e os hormônios tireoidianos T3/T4 (Tort, 2011; Yada e Tort, 2016).

Respostas agudas são caracterizadas por mecanismos de ativação, tais como, produção e mobilização de células do rim cefálico, e respostas pró-inflamatórias a partir de linfócitos T helper1 (Th1), enquanto as respostas crônicas tem caráter supressivo, diminuindo a resposta inata, a diferenciação celular e a resposta pró-inflamatória, com participação de linfócitos T helper2 (Th2) (Tort, 2011; Yada e Tort, 2016).

Em mamíferos, durante uma resposta imune inflamatória, a ativação dos hormônios do estresse inibiu sistemicamente as respostas de células Th1 / pró-inflamatórias, mas potencializou a mudança de Th2, suprimindo a produção de citocinas Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-12) e induzindo a produção de citocinas pertencentes a outros subconjuntos de Th (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) (Elenkov e Chrousos, 1999).

Em peixes, o estresse agudo promoveu níveis aumentados de lisozima e proteínas C3 ou o aumento do número de leucócitos de tipo mielóide no peritônio após injeção bacteriana intraperitoneal (Demers e Bayne, 1997; Sunyer e Tort, 1995). Além disso, foi relatado aumento dos receptores de glicocorticóides de leucócitos no rim cranial após estresse agudo de manejo (Maule e Schreck, 1991).

A longo prazo, efeitos supressores foram observados em *Dicentrarchus labrax* sujeitos à estresse de adensamento, que apresentaram imunocompetência reduzida (Vazzana et al., 2002). Já, uma diminuição da atividade do sistema complemento e dos níveis de lisozima foi observada após três dias de estresse repetido em *Sparus aurata* (Sunyer e Tort, 1995). O estresse reduziu o número de linfócitos B e diminuiu a resposta dos anticorpos após imunização in vivo (Verburg-Van Kemenade et al., 2009). O estresse induzido por variação na temperatura da água desencadeou alterações no cortisol plasmático, na osmolalidade e no peso corporal em *Dicentrarchus labrax*, sugerindo ativação prolongada do eixo HPI, além de reduzir a concentração de imunoglobulina M e aumentar a suscetibilidade dos peixes a Nodavirus (Varsamos et al., 2005).

#### 1.4 Sistema celular de defesa antioxidante e estresse oxidativo

O oxigênio ( $O_2$ ) é uma molécula muito reativa e pode ser reduzido de maneira parcial, o que resulta na formação de vários agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons ou a absorção de energia por esta molécula pode produzir espécies reativas de oxigênio (Oga, 2003) ou radicais livres. As EROs são átomos, moléculas ou íons que possuem um ou mais elétrons não-pareados nos orbitais mais externos, o que os tornam extremamente reativos, podendo combinar-se de maneira inespecífica com moléculas que integram estruturas celulares, como açúcares, proteínas, lipídios, DNA entre outros e, então ocorrem reações em cadeia que podem culminar em lesão, e até mesmo morte celular (Slater, 1984; Halliwell, 1987; Jordão Junior et al., 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000; Nordberg e Arner, 2001). As EROs, em geral, são formadas por absorção da radiação, por reações redox ou por processos de catálise enzimática (Slater, 1984) e incluem também espécies que não são radicais livres, como algumas moléculas que derivam do  $O_2$ , sendo capazes de gerar radicais livres, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2000).

A geração contínua das EROs é um processo fisiológico característico do ciclo respiratório celular (Sies, 1991; Storey, 1996). Os organismos sintetizam ATP por meio da redução completa do  $O_2$  na membrana mitocondrial. Em torno de 95 a 98% de todo o  $O_2$  utilizado pelas mitocôndrias é reduzido, formando água. Durante o processo de fosforilação oxidativa, o sistema enzimático citocromo oxidase é o responsável pela redução de maneira tetravalente do  $O_2$ , fornecendo simultaneamente quatro elétrons ao oxigênio, que se reduz diretamente à água. No entanto, esse  $O_2$  pode ser reduzido de forma incompleta, recebendo menos de quatro elétrons, originando os intermediários reativos e danosos às células, as EROs (Floyd, 1984). Em mamíferos, estima-se que de 1 a 4% do  $O_2$  consumido seja convertido a  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  devido às falhas fisiológicas mitocondriais, que permitem que os elétrons possam escapar sem que sejam transferidos para o oxigênio (Boveris e Chance, 1973).

O radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$  é o mais comum e abundante na célula (Boveris, 1998), é um radical moderadamente reativo devido à pequena capacidade de atravessar as membranas celulares e é gerado no transporte de elétrons que

ocorre em mitocôndrias e microsossomos do retículo endoplasmático ou por reações de auto-oxidação do oxigênio molecular (Halliwell e Gutteridge, 1986). É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (Nordberg e Arnér, 2001). As reações desencadeadas pelo radical superóxido podem gerar os radicais hidroxil e peroxil (Ramos et al., 2005).

O  $O_2^{\cdot -}$  forma-se após a primeira redução do  $O_2$ , na cadeia de transporte de elétrons ou por ação de fagócitos, sendo eles neutrófilos, monócitos e macrófagos, para defesa bactericida (Halliwell e Gutteridge, 1989). Estas células produzem quantidades significativas de radical superóxido durante a fagocitose, devido à ativação da enzima NADPH oxidase presente na membrana dessas células (Diaz et al., 1998).

O  $O_2^{\cdot -}$  e o  $H_2O_2$  são menos reativos, no entanto, sua transformação em radicais hidroxil os torna altamente danosos para os sistemas biológicos (Halliwell, 1996).

O radical hidroxil  $OH^{\cdot}$  é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos. Uma vez formado, possui uma meia-vida extremamente curta, reagindo rápido e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001). Este radical possui pequena capacidade de difusão e um alto potencial na indução de lesões nas moléculas celulares, sendo capaz de causar mais danos que qualquer outra espécie reativa de oxigênio, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra ele (Halliwell e Gutteridge, 2000).

As EROs estão implicadas na etiologia de muitas doenças, alterações degenerativas, lesões teciduais e toxicidade decorrente da exposição a xenobióticos (Pollack e Leeuwenburg, 1999; Bray, 2000), sendo continuamente produzidas pelo organismo como resultado de um processo metabólico normal, ou como resultado de estímulos ambientais (Feillet-Coudray et al., 1999), entretanto sua formação nem sempre é danosa, sendo fundamental para a manutenção de vários processos fisiológicos (Pompella, 1997). Por exemplo, na defesa contra a infecção, os neutrófilos produzem EROs para destruir microorganismos invasores (Filho e Novelli, 2005).

Se por um lado, a produção de EROs nos processos metabólicos é contínua, o organismo é dotado de mecanismos de defesa para limitar seus níveis intracelulares e impedir a indução de danos (Sies, 1993). A produção fisiológica de EROs está em equilíbrio com a ação destes sistemas de defesa antioxidante para a manutenção do equilíbrio redox, essencial para a integridade e saúde do organismo (Sies, 1986; Cadenas, 1989; Storey, 1996; Scandalios, 2005; Valavanidis et al, 2005).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e/ou redução das lesões celulares causadas pelas EROs (Cerutti, 1991; 1994). O estresse oxidativo ocorre na falha do equilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes (Biesalski, 2000).

De acordo com Abdalla (1993), os antioxidantes podem ser classificados, de acordo com sua função biológica, em duas categorias: a) Sistema primário - inibe de maneira preventiva e retarda a geração de EROs ou rouba estas espécies, impedindo proximidade com os alvos celulares; b) Sistema secundário - bloqueia a etapa de propagação da cadeia radicalar e remove, de maneira efetiva, radicais como o peróxil ou alcóxil. São exemplos de inibidores preventivos: os tióis, a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e as glutatona peroxidase (GPx) e S-transferase (GST), entre outros (Bonorden e Pariza, 1994). Os antioxidantes do sistema secundário bloqueiam a propagação da cadeia radicalar, interrompendo a sequência de auto-oxidação em cadeia; reagem com os radicais livres para produzir produtos estáveis. Destacam-se como bloqueadores deste sistema as vitaminas E e A e a glutatona reduzida.

Os peixes também são susceptíveis ao ataque das EROs produzidas pelo metabolismo aeróbio e apresentam sistemas antioxidantes de defesa. Os mesmos podem ser classificados conforme sua estrutura biológica, como: a) sistema enzimático, com as enzimas SOD, CAT, GPx e GST, e b) sistema não-enzimático, com a glutatona reduzida (GSH), selênio (Se), vitaminas A, C e E, metalotioneína, entre outros (Schlenk et al., 1999).

O estresse oxidativo em peixes tem sido avaliado por meio da quantificação da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx e GSH (Oruc e Uner, 2000; Almeida et al., 2002; Basha e Rani, 2003; Ferreira et al., 2005).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e é um componente da defesa primária de antioxidantes (Gaetani et al., 1989). Além de atuar como espécie reativa de oxigênio, o  $H_2O_2$ , em excesso, causa oxidação da hemoglobina e diminui as concentrações de oxigênio circulante (Wieacker et al., 1980), o que evidencia a importância da CAT.

A CAT encontra-se principalmente nos peroxissomos de eritrócitos, de células do fígado e rins dos animais. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contêm pequenas quantidades da CAT (Halliwell e Gutteridge, 1989). Todavia, a atividade desta enzima não foi encontrada em eritrócitos de diversos peixes (Rabie et al., 1972; Smith, 1976; Wilhelm-Filho et al., 1993; Wilhelm-Filho e Marcon, 1996).

A GPx é a enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos, e é um dos meios do organismo controlar os níveis de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos produzidos pelas EROs (Cohen e Hochstein, 1963; Meister e Anderson, 1983). Sua atividade depende da glutatona reduzida como cofator, que é oxidada em glutatona oxidada, durante a degradação de peróxidos (Van Der Oost; Beyer; Vermeulen, 2003).

Em humanos, a GPx possui atividade elevada no fígado, moderada no coração, pulmão e cérebro, e atividade reduzida nos músculos (Halliwell e Gutteridge, 1989).

As células animais contêm dois tipos de GPx, uma é Se-dependente e a outra não. A primeira é capaz de reduzir  $H_2O_2$  e qualquer hidroperóxido orgânico, sendo uma proteína tetramérica e apresenta um átomo de selênio em cada subunidade em formato de selenocisteína (Liebler e Reed, 1997). O segundo tipo, não depende de selênio, chamado GPx5, sendo uma proteína dimérica e é capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos o  $H_2O_2$  (Ciriolo et al., 1991; Willians et al., 1998).

Na maioria dos animais, a principal enzima é a selênio dependente, responsável pela maior parte da atividade da GPx, mas a proporção entre as duas formas varia muito entre espécies, e mesmo entre tecidos numa mesma espécie. Estudos recentes sugerem que o Se desempenha papel importante na prevenção da ação imunossupressora do estresse oxidativo. Assim, os níveis adequados de selenoproteínas para GPx são especialmente importantes para a manutenção



adequada da resposta imune, principalmente porque quando ativado, os fagócitos tais como macrófagos e neutrófilos, liberam rapidamente uma grande quantidade de EROs (Takahashi et al., 2017).

A SOD em conjunto com a CAT e GPx atuam como umas das principais formas de defesa que atuam nos organismos (Halliwell e Gutteridge, 1989). Beckman e Ames (1998) afirmam que a SOD contribui para efeitos de anti-envelhecimento, atuando de maneira somatória sobre os processos degenerativos.

A atuação da SOD é de grande importância na defesa do organismo contra EROs, desempenhando a função de retirada do radical superóxido que são gerados nos peroxissomos e mitocôndrias (McCord e Fridovich, 1969). Estudos demonstram a atuação da SOD como co-fator, e que depende do metal ao qual seu sítio catalítico se liga sendo o mesmo altamente reativo, e como fator, a poluição do ambiente pode aumentar a atividade da enzima e assim desequilibrar o sistema antioxidante natural (Mather-Mihaich e Diguilio, 1986; Radi e Marcovics, 1988).

Desta forma, como outros organismos, os peixes possuem exigências específicas químicas e físicas, que, quando não atendidas, promovem um estado de desequilíbrio que afetam o bem-estar e sobrevivência dos animais. Sendo condescendente com a ideia que peixes em cativeiro tem uma inerente desvantagem frente aos selvagens, decorrente do confinamento e, portanto, e recomendável aos produtores que façam o reconhecimento de sinais de estresse e utilizem protocolos adequados de manejo para reduzir seus efeitos, pois a dependência do sucesso econômico depende desse fator (Conte, 2014).

### **1.5 Papel do estresse e do cortisol no estresse oxidativo**

O estresse, de uma forma generalizada, é uma condição de alta demanda aeróbica de energia para suprir os mecanismos de manutenção do organismo durante a ativação para a adaptação e resistência do corpo às condições estressoras (Barton, 2002). Desta forma a ativação do sistema imune como resposta de defesa aos patógenos nos peixes é um processo energeticamente caro (Gimbo et al., 2015), ocorrendo, em ambas as situações a ativação de mecanismos celulares como o sistema de oxirredução, que ocorre para a síntese

de ATP. Desta forma, uma condição de estresse, com ativação imunológica, pode exigir mais intensamente dos mecanismos celulares produtores de energia, afetando a capacidade oxidante da célula. Na defesa contra a infecção, os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio como bactericida para destruir microorganismos invasores (Filho e Novelli, 2005).

Estressores ambientais são bem conhecidos por induzir estresse e alterações no equilíbrio redox da célula em peixes (Birnie-Gauvin et al., 2017). Os peixes são um modelo biológico de interesse por experimentar um grande número de estressores no ambiente, como flutuações na temperatura, disponibilidade de oxigênio, poluição e outros impactos antropogênicos que podem afetar a química dos radicais livres (Lushchak, 2011).

Entretanto, pouco se sabe sobre a associação do estresse com o equilíbrio redox da célula. Estudos realizados em humanos associam o cortisol à ativação ou redução da atividade de mitocôndrias e da função e apoptose celular, dependendo das concentrações do hormônio e do tempo de exposição ao mesmo (Du et al., 2009; Aschbacher et al., 2013).

## **1.6 Baço**

O baço é, segundo Banks (1992), a maior massa de tecido linfático do corpo de mamíferos, exercendo diversas funções como formação de células sanguíneas, metabolismo de hemoglobina e ferro, distribuição de hemácias, filtração e armazenamento de sangue. O baço é uma mistura de seios fagocitários, estroma de fibras reticulares e parênquima celular, não ocorrendo a diferenciação de córtex e medula. O parênquima é formado por polpa vermelha e polpa branca.

Em peixes, o baço apresenta forma corpuscular plana, elipsoide, com uma coloração vermelha escuro e justaposta ao fígado. Constitui-se internamente por células do retículo endotelial dos quais seus processos formam lóbulos contendo grupos de células brancas e vermelhas (Fishelson, 2006).

Citologicamente, o baço em peixes teleósteos é muito similar aos outros vertebrados (Quesada et al., 1990), apresentando separação pronunciada muito menor na polpa vermelha, contendo uma rede de cordões e polpa branca com tecido linfático (Iwama e Nakanishi, 1996). O baço de teleósteos possui

macrófagos que podem funcionar não apenas como sistema de defesa, mas também produzindo hidrolases lisossomais, proteínas do sistema complemento e parcialmente interferon, superóxido e radicais hidróxidos. O órgão contém, também, numerosos neutrófilos e eosinófilos, que tornam a glândula um local de fagocitose de matéria particulada e células sanguíneas, bem como de atividade hematopoiética (Fishelson, 2006).

Melanomacrófagos foram observados no tecido hematopoiético de baço de *Trichogaster leeri* e *Xiphophorus maculatus* e compunham grupos de células normalmente encapsulados por uma camada celular fina, também se apresentando como células dispersas. Essas células contêm grandes quantidades de pigmentos de ferro livre, provavelmente lipofucsina, podendo ter um significativo papel como depósito e desnaturação de lipoproteínas, não parecendo desempenhar nenhum papel significativo no manejo de ferro (Leknes, 2004, 2007).

Funções do tecido linfóide esplênico de teleósteos permanecem controversas, embora seu papel no processamento antigênico pareça certo. A esplenectomia não tem efeito em respostas humorais em alguns teleósteos, apesar de, em outras espécies, o baço aparentemente representar um importante órgão linfóide (Yu et al., 1996).

### 1.7 Modelo experimental

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é um peixe importante na piscicultura brasileira, destacando-se principalmente pela rusticidade no manejo, crescimento rápido, carne de excelente qualidade, com uma produção de 20 mil toneladas no ano de 2014 (IBGE, 2014). Além disso, é uma espécie popular nos “pesque-pagues” por sua esportividade na pesca (Fernandes et al., 2000; Abimorad et al., 2007). É uma espécie da ordem dos Characiformes, da família Characidae, naturalmente é encontrado nas Bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975; Machado-Allison, 1987), com sua maior distribuição nas planícies alagadas da região Centro-Oeste do Mato Grosso (Petrere, 1989). É um dos peixes mais estudados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e recebe os nomes de caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu (Urbinati et al., 2013).

É um peixe de grande porte, atingindo de 50 a 100 cm de comprimento e até 20 kg. Os adultos são castanho escuros, com ventre amarelo-dourado. Possuem corpo alto, discoidal, lateralmente comprimido, com escamas ventrais em forma de quilha serrilhada, formada por espinhos. Suas nadadeiras são escuras, a boca é terminal, com seis a oito dentes molariformes (Shibatt e Dias, 2006). Seu hábito alimentar é onívoro, alimentando-se, principalmente, de folhas, caules, flores, frutos e sementes e, quando necessário, de insetos, aracnídeos, moluscos e peixes (Urbinati et al., 2013). Segundo Shibatt e Dias (2006), a espécie alimenta-se na grande maioria das vezes durante o período diurno, buscando frutos que caem da vegetação ciliar, restos de vegetais, crustáceos e insetos. A dentição dessa espécie é especializada em quebrar e triturar os alimentos duros, especialmente frutos e sementes (Silva, 1985; Mentón, 1989). No ambiente natural, o pacu não tem comportamento alimentar contínuo e seu ciclo de vida está estreitamente relacionado a períodos de alta ingestão de alimento, sofrendo alterações conforme a disponibilidade do alimento, e consequentemente sob variações ambientais e da migração reprodutiva (Urbinati et al., 2013).

O pacu apresenta desova total e fecundação externa. As desovas ocorrem principalmente em novembro, com menor ocorrência em outubro e dezembro (estação chuvosa). O tamanho médio da primeira maturação gonadal, na fêmea é de 34 cm e a idade média de 3 anos. A partir de 42 cm, 100 % da população estão aptos à reprodução, com cerca de 5 anos (Ferraz de Lima et al., 1984).

## **2 JUSTIFICATIVA**

O sucesso da aquicultura intensiva depende de informações sobre a identificação e controle de situações de estresse e/ou de enfermidades com o objetivo de assegurar a sanidade dos peixes. Assim, o conhecimento dos mecanismos de estresse, incluindo sua interação com o sistema imune inato e os sistemas de defesa antioxidante, ativados por estressores presentes no ambiente de criação, permitirá se estabelecer estratégias de manejo ou criar ferramentas que interfiram neste processo para reduzir os efeitos negativos do

---

estresse/supressão imunológica/danos oxidativos, e consequentemente melhorar as condições de saúde e bem-estar dos peixes.

## **2.1 Hipótese**

Em vista do exposto, as hipóteses desta pesquisa foram:

1. A elevação do cortisol afeta negativamente a resposta imunológica do pacu
2. A elevação do cortisol altera a condição de defesa antioxidante no pacu

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar se os sistemas imune inato e antioxidante hepático do pacu são mediados pelo cortisol circulante, em condições de elevação exógena (administração oral do hormônio) e elevação endógena (exposição dos peixes a captura e exposição aérea) do hormônio.

### **3.2 Específicos**

Avaliar indicadores de estresse: concentrações sanguíneas de cortisol e glicose nas duas condições experimentais;

Avaliar indicadores de imunidade inata: atividade respiratória de leucócitos; concentração sérica de lisozima e a atividade sérica hemolítica do sistema complemento (via alternativa);

Avaliar indicadores de defesa antioxidante: atividade da catalase e glutathione peroxidase;

Avaliar alterações esplênicas dos peixes que possam ser relacionadas às respostas imunes e danos oxidativos.

---

## 4. REFERÊNCIAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes. Conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. ARS CVRANDI – A Revista da Clínica Médica, v. 26, p. 141-164, 1993.

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

ALMEIDA, J.A., et al. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environment International, v. 27, p. 673-679, 2002.

ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, O.M.; DHABHAR, F. S.; SU, Y.; EPEL, E. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity, Psychoneuroendocrinology, n. 38, v. 9, p. 1698-1708, 2013.

BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. 2.ed. São Paulo Editora Monole Ltda, 629p.,1992.

BARTON, B. A. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: IWAMA, G. K., PICKERING, A. D., SUMPTER, J. P. & SCHRECK, C. B. (eds). Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

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

BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 56, p. 218-221, 2003.

BECKMAN, K. B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. Physiology Review, v. 78 n. 2, p. 547-581, 1998.

BIRNIE-GAUVIN, K.; COSTANTINI, D.; COOKE, S.J.; WILLMORE, W.G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. Fish and Fisheries, in press. DOI: 10.1111/faf.12215, 2017.

BIESALSKI, H.K. The role of antioxidants in nutritional support. Nutrition, v. 16, p. 593-596, 2000.

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J.; Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology v. 25, p. 853-873, 2001.

BONORDEN, W.R.; PARIZA, N.W. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: KOTSONIS, F.N. et al. (Eds.). Nutritional Toxicology. New York: Raven Press, p.19-48, 1994.

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

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

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, v. 34, p. 707-717, 1973.

BRAY, T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. *Nutrition*, v. 16, p. 578-581, 2000.

BUCHTÍKOVÁ, S.; SIMKOVÁ, A.; ROHLENOVÁ, K.; FLAJSHANS, M.; LOJEK, A.; LILIUS, E.M.; HYRS, P. The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, v. 318, n. 1-2, p. 169-175. 2011.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review Biochemistry*, v. 58, p. 79-110, 1989.

CAISAN. Câmara Interministerial de Segurança Alimentar e Nutricional. 2014. Balanço das Ações do Plano Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – Plansam 2012/2015, Brasília. <<http://www4.planalto.gov.br/consea/publicacoes/balanco-plansan>> Acesso em: 15 de setembro de 2016.

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 21, p. 1-5, 1991.

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

CIRIOLO, M.R. et al. Age-related changes in Cu, Zn superoxide dismutase, Se-dependent and Se-independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 61, p. 287-297, 1991.

CNAANI, A.; TINMAN, S.; AVIDAR, Y.; RON M.; HULATA, G. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oeochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research*, v. 35, p. 1434-1440, 2004.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, v. 2, p. 1420-1428, 1963.

CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied and Animal Behavior Science*, v. 86, p. 205-223, 2014.

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

DEMERS, N.E.; BAYNE, C.J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 21, p. 363-373, 1997.

DIAZ, J. et al. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clinical Chemistry*, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DU, J.; WANG, Y.; HUNTER, R.; WEI, Y.; BLUMENTHAL, R.; FALKE, C.; KHAIROVA, R.; ZHOU, R.; YUAN, P.; MACHADO-VIEIRA, R.; Mc EWEN, B.S.; MANJI, H.K. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *PNAS*, v. 106, p. 3543-3548, 2009.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 10, n. 9, p. 359-368, 1999.

FAGUNDES, M., URBINATI, E.C. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*, v. 276, p. 112-119, 2008.

FAO <[www.fao.org/3/a-i4040e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i4040e.pdf)>. Acesso em: 15 de setembro. 2016.

FAO. State of World Fisheries and Aquaculture. 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 15 de Setembro. 2016.

FAO. The State of Food and Agriculture. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/i3028e/i3028e.pdf>>. Acesso em: 15 de Setembro. 2016.

FAST, M.D.; HOSOYA, S.; JOHNSON, S.C.; AFONSO, L.O.B. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 24, p. 194-204, 2008.

FEILLET-COUDRAY, C. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clinica Chimica Acta*, v. 284, p. 31-43, 1999.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, p.646-653, 2000.



FERRAZ de LIMA et al. Período de reprodução, tamanho e idade de primeira maturação gonadal do pacu, *Colossoma mitri*, em ambiente natural (Rio Cuiabá, Pantanal do Mato Grosso). In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 3,1984, São Paulo. Anais... p.477-497.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, M.; MORADAS-FERREIRA, P.; REIS-HENRIQUE, M.A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. Aquatic Toxicology. v.1, n.71, p.39-48, 2005.

FILHO, J.L.B.N.; NOVELLI, E.L.B. Estresse oxidativo e inflamação: o efeito de anti-inflamatórios. In: NOVELLI, E.L.B. (Ed.). Nutrição e vida saudável. Estresse oxidativo e metabolismo energético. Ribeirão Preto: Tecmedd Editora, p. 123-135, 2005.

FISHELSON, L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. Journal of Morphology, v. 267, p. 57–69, 2006.

FLOYD, R. A. Free radicals in molecular biology. Aging and disease. New York: Raven, 416 p., 1984.

GAETANI, G.F. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood, v. 73, p. 334-339, 1989.

GIMBO, R.Y.; FÁVERO, G.C.; FRANCO MONTOYA, L.N.; URBINATI, E.C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fish and Shellfish Immunology, v. 43, p. 295-300, 2015.

GODOY, M. P. Peixes do Brasil, subordem Characoidei – Bacia do rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, 1975.

GRIFFIN, B.R. Random and Directed Migration of Trout (*Salmo gairdneri*) Leukocytes - Activation by Antibody, Complement, and Normal Serum Components. Developmental and Comparative Immunology, v. 8, p. 589-597, 1984.

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

HALLIWELL, B. FASEB Journal, v.1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, v. 25, p. 25-57, 1996.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.246, p. 501-514, 1986.

HOEGER, B.; HITZFELD, B.; KOLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; VAN DEN HEUVEL, M.R. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquatic Toxicology*, v. 173, n. 1, p. 79-90, 2005.

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

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2014\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf)>. Acesso em: 20 de Setembro. 2016.

INOUE, L. A. K.; SANTOS NETO, C.; MORAES, G. Standardization of 2-phenoxyethanol as anesthetic for juvenile *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): the use in Field procedures. *Ciência Rural*, v. 4, n. 2, p. 563-565, 2004.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. *Fish Physiology Series*, v. 15, 380 p., 1996.

JORDÃO JÚNIOR, A.A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina*, v. 31, p. 434-449, 1998.

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

KAPLAN, J.E.; CHRENEK, R.D.; MORASH, J.G.; CATARINA, M.; RUKSZNIS, L.; HANNUM, G. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes. *Comparative and Biochemistry Physiology. A: Molecular and Integrative Physiology*, v. 151, n. 4, p. 726-730. 2008.

KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. In: GALLIN, J.I.; SNYDERMAN, R. (Eds.). *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. p. 721-768, 1999.

- LEKNES, I. L. Endocytosis of horse-spleen ferritin in the black tetra, *Gymnocorymbus ternetzi*, (Characidae: Teleostei). *Acta Anatomica*, v. 106, p. 195-198, 2004.
- LEKNES, I. L. Melano-macrophage centers and endocytosis cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta Histochemica*, v. 109, p. 164-168, 2007.
- LIEBLER, D.C.; REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K.B. (Ed.). *Free Radical Toxicology*. USA: Taylor & Francis, p. 141-171, 1997.
- LORENZI, T.F. *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. São Paulo, MDSI, 641p., 1999.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v. 101, p. 13 - 30. 2011.
- MACHADO-ALLISON, A. *Los peces de los llanos de Venezuela: un ensayo sobre su historia natural*. Caracas: Universidad Central de Venezuela, 1987.
- MAGNADOTTIR, B.; Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 20, p. 137-151. 2006.
- MATHER-MIHAICH, E., DIGUILIO, R.T. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentration in channel cat fish exposed to DFF and N-butylmercaptan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 85, p. 427-432, 1986.
- MAULE, A.G.; SCHRECK, C.B. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. *General and Comparative Endocrinology*, v. 84, p. 83-93, 1991.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. *Annual Review Biochemistry*, v. 52, p. 711-760, 1983.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, n.22, p. 6049-6055, 1969.
- MENTÓN, D.J. Research considerations into the nutrition of *Colossoma* and *Piaractus* in relation to culture conditions. In: *Cultivo de Colossoma*, p. 75-84, Red Regional de Entidades y Centros de Acuicultura de America Latina, Editora Guadalupe Ltda, Bogotá, Colombia, 1989.
- NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T.K.; SOMAMOTO, T. The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 35, p. 1296-1308, 2011.

NEUMANN, N.F.; STAFFORD, J.L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A.J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 25, n. 8-9, p. 807-825, 2000.

NIKOSKELAINEN, S.; LEHTINEN, J.; LILIUS, E.M. Bacteriolytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 26, p. 797-804, 2002.

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

OGA, Z. Fundamentos de toxicologia. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 530 p., 2003.

ORUC, E.O.; UNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 127C, p. 291-296, 2000.

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

PANKHURSKS, N.; KRAAK, G. Effects of stress on reproduction and growth of fish. In: IWAMA G, PICKERING A, SUMPTER C, SCHRECK C. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: Cambridge University Press, p. 278. (Society for Experimental Biology Seminar Series; 62), 1997.

PETREIRE, M. JR. River Fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management*, v. 4, p. 1-16, 1989.

POLLACK, M.; LEEUWENBURG, C. Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease. In: SEN, C.K.; PACKER, L.; HÄNNINEN, O. (Eds.). Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier Science, p. 881-923, 1999.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. I. *Journal for Vitamin Nutrition Research*, v.67, p. 289-297, 1997.

POWELL, D.B. Blood and lymphatic vessels In: Ostrand G.K. (Ed.), *The Laboratory Fish*. Academic Press, San Diego, p. 441-448, 2000.

QUESADA, J.; VILLEVA, M. I.; ANGULLEIRO, B. Structure of the spleen in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopy study. *Journal of Morphology*, v. 206, p.273-281, 1990.

RABIE, F. O. et al. Evolution of catalase in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 43A, p. 1053-1055, 1972.

RADI, A.A.R.; MARCOVICS, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 90, p. 69-72, 1988.

RAMOS, D. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, p. 60-68, 2005.

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

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

ROED, K.H.; FERDDEN, S.E.; FJALESTAD K.T. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. *Aquaculture*, v. 209, p. 91-1001, 2002.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. Mosby 5<sup>a</sup> ed. London, UK, 1998.

ROWLAND, S.J.; MIFSUD, C.; NIXON, M.; BOYD, P. Effects of stocking density on the performance of the Australian freshwater silver perch (*Bidyanus bidyanus*) in cages. *Aquaculture*, v. 253, p. 301-308, 2006.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 223-239, 2008.

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

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

SECOMBES, C.J., WANG, T.; *The innate and adaptive immune system of fish*. Woodhead Publishing Series in Food Science, p. 3-68, 2012.

SHIBATT, O. A.; DIAS, J. H. P. 40 peixes do Brasil: CESP 40 anos. Rio de Janeiro: Doiis, p. 78-79, 2006.

SIES, H. *Biochemistry of oxidative stress*. Angewandte Chemie International Edition in English, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. *Oxidative stress: from basic research to clinical applications*. American Journal of Medicine, v. 91, p.315-338, 1991.

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

SILVA, A. J. Regime alimentar do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) no Pantanal de Mato Grosso em relação à flutuação do nível da água. In: 12º Congresso Brasileiro de Zoologia, 1985, Campinas. Anais... Campinas: Sociedade Brasileira de Zoologia, 1985.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*, v. 222, p. 1-15, 1984.

SMITH, A. C. Catalase and fish red blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 54B, p. 331-332, 1976.

SUNYER, J.O.; TORT, L. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 45, p. 333-345, 1995.

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

STUART, L.M.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phagocytosis: elegant complexity *Immunity*, v. 22, n. 5, p. 539-550, 2005.

TAKAHASHI, L.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; MANSANO, C.F.M.; URBINATI, E.C.; GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V.; Long-term organic selenium supplementation overcomes the trade-off between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 60, p. 311-317, 2017.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress, 144p., 2004.

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

URBINATI, E. C.; GONCALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.) *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. 2ª edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, cap. 8, 2013.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 178-189, 2005.

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

VARSAMOS, S.; NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 141, p. 401-429, 2005.

VAZZANA, M.; CAMMARATA, M.; PARRINELLO, N. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, v. 210, p. 231-243, 2002.

VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L.; STOLTE, E.H.; METZ, J.R.; CHADZINSKA, M. Neuroendocrine immune interactions in teleost fish. In: Bernier N.J., van Der Kraak G., Farrell A.P., Brauner C.J., editors. *Neuroendocrinology (Fish Physiology)* Academic Press; London, UK, p. 313-364, 2009.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 143, p. 123-133, 1996.

WEDEMEYER, G.A. *Physiology of fish in intensive culture system*. Chapman e Hall (ed). 232p., 1996.

WENDEELAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WIEACKER, P.; MUELLER, C.R.; MAYEROVA, A.; GRZESCHIK, K.H.; ROPERS, H.H. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. *Annales de Génétique*, v. 23, p. 73-77, 1980.

WILHELM-FILHO, D.; GIULIVI, C.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in marine fish – I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 106, p. 409-413, 1993.

WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). *Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, p. 299-312, 1996.

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

YADA, T.; NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune system in fish. *International Review of Cytology*, v. 220, p. 35-92, 2002.

YADA, T.; TORT, L. Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions. In: Schreck, C.B.; Tort, L.; Farrel, A. P.; Brauner, C.J. *Fish Physiology – Biology of Stress in Fish*, Sand Diego, CA: Academic Pres, 2016.

YANO, T. The nonspecific immune system: humoral defense. In: IWAMA G. and NAKANISHI, T. The Fish Immune System, Academic Press, San Diego, p. 106-157, 1996.

YU, M. L.; SAROT, D. A.; FILAZZOLA, R. J.; PERLMUTTER, A. 1970. Effects of splenectomy on the immune response of the blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, to infections pancreatic necrosis (IPN) virus. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The fish immune system: Organism, Pathogen and Environment, v. 15, 380p., 1996.

ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C.; Effect of *Aloe vera* extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxa during the transport stress. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 41, p. 2299-2302, 2012.



---

## CAPÍTULO 2

### **Mediação de respostas imunes e do sistema hepático de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar se o sistema imune inato e o sistema antioxidante hepático são mediados pelo cortisol circulante, em condições de elevação exógena e endógena do hormônio em pacu. Os peixes foram submetidos aos tratamentos: alimentados com ração comercial RC controle (C); alimentados com RC contendo 400 mg de hidrocortisona / kg (HC); expostos a captura por 2 minutos seguida de exposição aérea por 4 minutos (E). No dia da amostragem, os grupos C e HC foram alimentados com a respectiva ração e amostrados 1, 3, 6, 24 e 72 horas depois (n=9), enquanto o grupo E foi alimentado com RC, no mesmo horário dos outros grupos, em seguida exposto ao estressor e amostrado 1, 3, 6, 24 e 72 horas depois. Os peixes tiveram sangue, fígado e baço coletados. No sangue foram determinadas: a concentração de cortisol, glicose, atividade respiratória de leucócitos ARL, concentração sérica de lisozima (CSL) e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC). O fígado foi utilizado para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O baço foi utilizado para cálculo do índice esplenoossomático e análise histológica para observação de polpa branca, polpa vermelha, melanomacrófagos e centros de melanomacrófagos. Os resultados obtidos demonstraram que o estresse exógeno e endógeno, de modo geral, elevaram as concentrações sanguíneas de cortisol e glicose. Inicialmente (3 horas), o estresse de manejo aumentou a ARL, mas de modo geral a elevação do cortisol foi associada a redução da ARL e da AHC, bem como da atividade das enzimas GPx e CAT. O estresse de manejo, adicionalmente, causou o aparecimento de melanomacrófagos e centros de melanomacrófagos no baço, sugerindo danos celulares neste órgão linfoide.

**Palavras-chave:** Estresse, oxidação, imunologia, baço, peixe

---

**CHAPTER 2****Mediation of immune responses and hepatic antioxidant defense system by cortisol in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)****ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate if the innate immune system and the hepatic antioxidant system are mediated by circulating cortisol, under conditions of exogenous and endogenous elevation of the hormone in pacu. The fish were submitted to the treatments: fed with commercial RC fed control (C); fed with RC containing 400 mg hydrocortisone / kg feed (HC); exposed to capture for 2 minutes followed by air exposure for 4 minutes (E). On the sampling day, the groups C and HC were fed with the respective feed and sampled 1, 3, 6, 24 and 72 hours later (n= 9), while group E was fed as the other groups, then exposed to the stressor and sampled 1, 3, 6, 24 and 72 hours later. The fish had blood, liver and spleen collected. In the blood it were determined: the concentration of cortisol, glucose, respiratory activity of leukocytes ARL, serum concentration of lysozyme (CLS) and complement haemolytic activity (ACH). The liver was used to determine the activity of the enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The spleen was used to calculate the splenosomatic index and histological analysis for observation of white pulp, red pulp, melanomacrophages and melanomacrophage centers. The results obtained demonstrated that exogenous and endogenous stress, in general, increased blood concentrations of cortisol and glucose. Initially (3 hours), the stressful handling increased ARL, but in general the elevation of cortisol was associated with a reduction of ARL and AHC, as well as the activity of the GPx and CAT enzymes. The stressful handling additionally caused the appearance of melanomacrophages and melanomacrophage centers in the spleen, suggesting cellular damage in this lymphoid organ.

**Key-words:** Stress, oxidation, immunology, spleen, fish

## 1. INTRODUÇÃO

Em sistemas de criação intensiva de peixes, situações estressantes são decorrentes do manejo diário e das variações ambientais e são inevitáveis, expondo os animais a condições que afetam sua homeostase fisiológica. O estresse é definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, é ameaçado ou desorganizado em decorrência da presença de estressores intrínsecos ou extrínsecos, situação em que ocorre realocação de energia entre sistemas. Deste modo, o organismo é induzido a respostas fisiológicas e comportamentais adaptativas, que protegem o animal e asseguram sua sobrevivência na situação adversa (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002; Yada e Tort, 2016; Schreck e Tort, 2016).

No conjunto de alterações desencadeadas pelo estressor, ocorrem inicialmente produção e liberação de hormônios (catecolaminas e glicocorticoides), responsáveis por mediar alterações sanguíneas metabólicas (glicose, lactato, perfil de células vermelhas), iônicas (cloreto, sódio, potássio, amônia) e imunes (células brancas), além de aumento do débito cardíaco, captação e transferência de oxigênio (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002).

O estresse é categorizado como agudo ou crônico, severo ou moderado (Barton, 2002). O efeito do estresse nos peixes é determinado em grande parte devido à severidade do estresse, duração e condição de saúde do animal. No caso de estresse crônico intenso, as respostas de estresse perdem seu valor adaptativo e tornam-se disfuncionais. Uma resposta bastante afetada, nesta condição, é a resposta do sistema imune (Yada e Tort, 2016), que leva a maior vulnerabilidade dos peixes e ocorrência de doenças e mortalidade.

Os peixes, de modo geral, dispõem de um mecanismo de defesa inato que envolve um componente celular, os leucócitos, responsáveis por ações de fagocitose e inflamação e um componente humoral, representado por várias substâncias como as lisozimas, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina, comumente encontradas no muco, soro e ovo dos peixes e que atuam no combate aos microrganismos infecciosos (Secombes, 1996).

Os efeitos do estresse sobre o sistema imune envolvem a mediação do cortisol, entre outros sistemas hormonais, e se caracterizam por apresentar

respostas bifásicas, de ativação inicial e de supressão em condições mais prolongadas (Yada e Tort, 2016).

Tanto os mecanismos desencadeados na resposta clássica de estresse, quanto as respostas específicas do sistema imune, envolvem um custo energético elevado (Wendelaar Bonga, 1997; Gimbo et al., 2015). Do ponto de vista metabólico, a ativação das vias responsáveis pela produção e mobilização de energia levam a alteração na condição redox mitocondrial (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Desta forma, uma condição de estresse, com ativação imunológica, pode exigir mais intensamente dos mecanismos celulares produtores de energia, afetando a capacidade oxidante da célula e desenvolvendo uma condição de estresse oxidativo. Espécies reativas do oxigênio (EROs) formam-se a partir da redução do oxigênio nos tecidos (Belló et al., 2000) e são produzidos em maior quantidade quando um organismo é exposto a situações de estresse excessivo (Dos Santos et al., 2016). EROs são responsáveis por causar danos a proteínas celulares, lipídios, ácidos nucleicos, entre outras estruturas, levando a danos permanentes em tecidos e órgãos (Storey 1996; Lushchak et al., 2005; Fogaça e Sant'Ana, 2009).

A produção de EROs nos processos metabólicos é contínua, mas o organismo apresenta mecanismos de defesa antioxidante para controlar seus níveis intracelulares e impedir os danos celulares (Sies, 1993). Quando a produção fisiológica de EROs está em equilíbrio com a ação destes sistemas de defesa a célula mantém o equilíbrio redox, essencial para a integridade e saúde do organismo (Sies, 1986; Cadenas, 1989; Storey, 1996; Scandalios, 2005; Valavanidis et al, 2005). Um dos sistemas de defesa antioxidante é o sistema enzimático, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST), e o sistema não-enzimático, com a glutathione reduzida (GSH), selênio (Se), vitaminas A, C e E, metalotioneína, entre outros (Schlenk et al., 1999).

Apesar da importância do estresse oxidativo na condição de estresse, pouco se conhece sobre o papel do cortisol neste processo. Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados em humanos sugerem que o cortisol está associado à ativação ou redução da atividade de mitocôndrias e da sua função, bem como a apoptose

celular, dependendo das concentrações do hormônio e do tempo de exposição ao mesmo (Du et al., 2009; Aschbacher et al., 2013). Em peixes, nada se conhece sobre a interação das respostas de estresse com o sistema de defesa antioxidante.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se o sistema imunológico e o sistema de defesa antioxidante hepático de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) são mediados pelo cortisol circulante, elevado por administração do hormônio na ração ou por exposição dos peixes a um estressor. Para isso, foram avaliados indicadores de estresse (cortisol e glicose circulantes), indicadores de imunidade inata (atividade respiratória de leucócitos, atividade sérica do sistema complemento, via alternativa e concentração sérica de lisozima), indicadores hepáticos do sistema de defesa antioxidante (atividade das enzimas glutathiona peroxidase e catalase), e histologia do tecido linfoide (baço) para observação de danos teciduais (presença de melanomacrófagos).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos experimentais do estudo seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 07913/16), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

### **2.1 Animais, protocolo e delineamento experimental**

Foram utilizados 135 juvenis de pacu fornecidos pelo CAUNESP (Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal) distribuídos em 27 unidades experimentais. Antecedendo o período experimental, os animais ficaram por 14 dias nas unidades experimentais para aclimatação. Foram considerados aclimatados quando todos os animais se alimentavam normalmente. Neste período receberam ração comercial peletizada (28% de proteína bruta e 3.600 kcal EB/kg, Pirá 28, Guabi) até saciedade aparente, duas vezes por dia (8:00 e 16:00 h). No período experimental, os parâmetros de qualidade de água foram: oxigênio dissolvido:

6,23±0,32mg/L; temperatura: 29,28±0,28°C; pH: 7,28±0,29; amônia total: 0,280±0,03mg/L; amônia não-ionizada: 0,01±0,009mg/L, com fotoperíodo controlado de 12h claro:12h escuro.

Após a aclimatação, os peixes foram pesados (114,33± 10,9 g) e divididos em três grupos, distribuídos em 27 unidades experimentais de 100L, sendo três unidades por tratamento (5 animais por unidade). Os peixes foram alimentados com 2% do seu peso corporal, duas vezes ao dia, de acordo com os seguintes tratamentos:

- 1) Grupo controle (C) – Peixes alimentados com ração comercial, sem manipulação;
- 2) Grupo hidrocortisona (HC) – Peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (400 mg/kg), sem manipulação;
- 3) Grupo estressado (E) – Peixes alimentados com ração comercial, perseguidos com puçá por 2 minutos e expostos ao ar por 4 minutos.

No dia do experimento, os grupos C e HC receberam apenas uma alimentação conforme suas respectivas rações, às 8:00 h, e foram amostrados 1, 3, 6, 24 e 72 horas depois (n=9 de cada tratamento por amostragem, 3 de cada unidade experimental). O grupo E recebeu a ração comercial, no mesmo horário dos outros grupos, e, em seguida, os peixes foram submetidos ao manejo estressor, devolvidos às respectivas unidades experimentais e amostrados 1, 3, 6, 24 e 72 horas após o manejo.

## **2.2 Preparo das rações**

A ração suplementada com hidrocortisona foi preparada borrifando 400 mg de hidrocortisona (HC) (Sigma, 45698-250MG-R), diluídos em 100 mL de etanol, em um quilograma de ração controle. Após o acréscimo da hidrocortisona, a ração foi posta para secar, e congelada até o momento da utilização. A concentração de HC utilizada foi definida de acordo com Brinn (2003) e Serra et al. (2015). A ração controle foi borrifada com etanol, sem HC, para realizar a homogeneização das rações.

## 2.3 Amostras e análises

No dia do experimento, foram amostrados nove peixes de cada tratamento (3 de cada unidade experimental). Os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 mg/L H<sub>2</sub>O) até os movimentos operculares cessarem, e o sangue retirado (1500 µL) por punção dos vasos caudais, com seringas sem anticoagulante.

### 2.3.1 *Análise de indicadores de estresse*

Amostras de sangue total foram adicionadas (50 µL) em microtubos contendo 20 µL de Glistab® (anticoagulante), para a obtenção do plasma e determinação da concentração de glicose, por método enzimático, com kit comercial (Glicose PAP Liquiform - Labtest®). O restante do plasma foi armazenado a -20 °C até a análise dos níveis de cortisol por kit comercial (DRG International, Inc., USA; Cortisol ELISA - EIA - 1887).

### 2.3.2 *Análise de indicadores imunológicos*

Outra amostra do sangue total foi adicionada (50 µL) em microtubos heparinizados (20 µL) para a análise da atividade respiratória de leucócitos (ARL) (Biller-Takahashi et al., 2013). O método colorimétrico se baseia na determinação das EROs produzidas pelo “burst” oxidativo das células, pela redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis a 540nm.

Posteriormente, outra alíquota do sangue (200 µl) foi colocada em tubos de vidro sem anticoagulante para separação de soro. Após 3 horas de repouso, o sangue foi centrifugado (10 min a 5.000 rpm), armazenado à -80 °C até determinação da concentração de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento (AHC), conforme Zanuzzo et al. (2015).

### 2.3.3 *Análise indicadores da defesa antioxidante hepática*

Para as análises das atividades enzimáticas catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) foram utilizadas amostras de fígado, mantidas a -80°C até o momento dos ensaios. Os órgãos previamente pesados foram homogeneizados em 0,05 M de tampão fosfato, pH 7,4, com o homogeneizador de tecidos Turrax

(MA102/B). Em seguida, os homogenados foram centrifugados a 10.000 g, durante 30 min, a 4° C, e os sobrenadantes usados para a análise das atividades enzimáticas.

O conteúdo proteico do fígado foi determinado pelo método do biureto, através do Kit de Proteínas Totais Labtest®, utilizando a albumina sérica como padrão. As leituras foram realizadas a 545nm em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis.

A atividade da catalase foi determinada pelo método de Aebi (1974), modificado por Regoli et al. (1997). A reação consistiu na mistura de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.0), 200 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 µL de sobrenadante do homogenato hepático. A redução da absorbância foi determinada a 240 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis). A atividade da catalase foi expressa em mmol/mg proteína/min.

A atividade da glutathione peroxidase foi determinada pelo método de Lawrence e Burk (1976), modificado por Flohé e Günzler (1984). A reação consistiu na mistura de 0,1mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,6) + EDTA 0,5 mM, 10% de Triton x-100, 100mM de GSH, 10mM de NADP(H), 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e calculada por mg de proteína do fígado. A leitura foi realizada a 340 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis). Uma unidade da GPx foi definida como a quantidade de enzima que consome 1µg de GSH por minuto (Latha e Pari, 2004). A atividade da GPx foi expressa em unidades por mg de proteína.

#### *2.3.4 Análise histológica*

Após a coleta do sangue, os peixes foram eutanasiados com sobredose de benzocaína (0,1 g/L) e cirurgicamente abertos na região ventral para retirada do baço. O órgão foi pesado para cálculo do Índice esplenossomático (IES % = [peso do baço (g)/ peso corporal (g)] x 100) e as amostras do órgão foram adicionadas em solução de formalina tamponada 10% (pH 7,2). Após 24 horas, os tecidos foram desidratados em níveis crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90 e 100%) para serem incluídos em parafina (Luna, 1960). Foram realizados seis cortes seriados de 3 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram analisadas, quanto às alterações estruturais e celulares capturadas



com uma câmera fotográfica digital (Leica DFC 295) acoplada a microscópio (Leica-DM 2500), em objetiva de 40X. As imagens foram analisadas pelo programa de captura e análise de imagens LAS V.3.8 (Leica, Germany). Foram escolhidas aleatoriamente três fotomicrografias por lâmina com o uso de tabela de randomização, sendo cada imagem sobreposta com gradículas ajustadas para 50.000 *pixels*<sup>2</sup>, totalizando 375 intersecções, que corresponderam aos pontos utilizados na técnica estereológica manual clássica com base na contagem de pontos (Sundberg 1992, Rocha et al. 1997). Em cada imagem, determinou-se as densidades estruturais (%) de polpa vermelha (PV), polpa branca (PB), número de melanomacrófagos (MMs) e centros de melanomacrófagos (CMMs). O percentual de cada estrutura foi calculado em cada imagem pela seguinte fórmula: estrutura (%) = (contagem total/375) x100. O software ImageJ 1.46® foi utilizado para realizar as análises.

## 2.4 Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade, e quando necessários os dados foram transformados para atingir os pré-requisitos, uma vez que foram feitas análises paramétricas. Os grupos foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) em duas vias, tendo como fatores tempo de coleta (1, 3, 6, 24, e 72 h) e tratamento (controle, hidrocortisona e estressado). Como pós-teste para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## 3. RESULTADOS

Este estudo investigou indicadores de estresse, de imunidade inata e do sistema de defesa antioxidante hepático em juvenis de pacus que tiveram o cortisol circulante elevado por manipulação exógena (alimentação única com ração contendo 400 mg/kg) ou endógena (exposição dos peixes a captura e exposição aérea) e que foram amostrados 1, 3, 6, 24 e 72 e duas horas depois da alimentação ou exposição ao estressor.

### 3.1 Concentração plasmática de cortisol e glicose (Figura 1A e 1B)

As concentrações plasmáticas de cortisol (Figura 1A) diferiram em relação ao tempo de amostragem ( $P = 0,01$ ), ao tratamento ( $P = 0,004$ ) e na interação do tempo e tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo do tempo, as amostragens do grupo C, não houveram alteração das concentrações do hormônio. No grupo HC, o maior valor foi observado na primeira hora, com redução gradual até 24 horas, com os valores mais baixos. Já no grupo E, houve elevação das concentrações às 3 horas, sendo que estes valores se mantiveram até as últimas amostragens.

Comparando os tratamentos em cada tempo, à 1 hora, o grupo HC apresentou as concentrações de cortisol mais elevadas, enquanto os grupos C e E apresentaram valores semelhantes. Na amostragem de 3 horas, as concentrações observadas em todos os grupos não diferiram. As 6 e 24 horas, os grupos C e E mostraram as mesmas concentrações, mais elevadas que as dos peixes HC. Por último, às 72 horas, apenas o grupo E manteve valores mais altos, enquanto nos grupos C e HC as concentrações foram semelhantes e mais baixas.

Em relação à glicemia (Figura 1B), houve diferença em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), ao tratamento ( $P < 0,001$ ) e na interação entre o tempo e o tratamento ( $P < 0,001$ ).

No grupo C, as concentrações de glicose não se alteraram ao longo das amostragens. Os valores observados as 3 e 6 horas, semelhantes aos da amostragem de 1 hora, foram maiores que os de 24 e 72 horas, e estes semelhantes ao da primeira amostragem. No grupo HC, houve um valor de elevação às 6 horas, maior que os observados em todas as outras amostragens. Entre os outros valores, apenas aqueles observados às 72 horas foram mais baixos que os outros, iguais entre si. Por último, no grupo E, as concentrações mais elevadas foram observadas as 3 horas, caíram aos valores da primeira amostragem às 24 horas e atingiram os valores mais baixos às 72 horas.

Comparando os tratamentos em cada tempo, à 1 e 3 horas, os peixes do grupo E apresentaram as glicemias mais elevadas; às 6 horas isso ocorreu no grupo HC; às 24 horas ambos HC e E apresentaram glicemias mais altas que o grupo C e, por fim, às 72 horas, os valores de todos os grupos se igualaram.

### **3.2 Atividade respiratória de leucócitos (ARL), atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) e concentração de lisozima sérica (CLS) (Figura 2A, 2B e 2C)**

A atividade respiratória de leucócitos (Figura 2A) diferiu em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), ao tratamento ( $P = 0,05$ ), e na interação do tempo e tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo das amostragens, no grupo C, não houve alteração da ARL, exceto pelas atividades mais baixas observadas às 6 e 24 horas em relação à observadas às 72, que, entretanto, não diferiram dos valores de uma e três horas. No grupo HC, há uma redução significativa da ARL em relação aos outros tempos de amostragem, que não diferenciaram entre si. Já no grupo E, a ARL se elevou às três horas, reduziu significativamente às seis horas e retornou aos valores de uma hora nas amostragens seguintes.

Comparando os tratamentos em cada tempo, só há diferenças às 3 e 6 horas. Às 3 horas, a ARL é mais elevada no grupo E, mas reduz em ambos os grupos HC e E na amostragem seguinte.

A AHC (Figura 2B) diferiu em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), ao tratamento ( $P < 0,001$ ) e na interação do tempo e do tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo das amostragens, no grupo C, a AHC diminuiu às 6 horas e manteve em valores semelhantes em outros tempos de avaliação. No grupo HC, ocorreram alterações de padronização de dados da AHC ao longo das amostragens. Já no grupo E, a AHC se elevou a partir de 3 horas e tem a atividade mais elevada às 72 horas.

Comparando os tratamentos em cada tempo, em uma hora, a AHC diminuiu gradualmente nos grupos HC e E em relação ao grupo C e, às 3 horas, este perfil se repetiu. Nas amostragens seguintes, não se observa diferença entre os grupos.

A concentração sérica de lisozima (CLS) (Figura 2C) diferiu no conjunto dos tratamentos nos diferentes tempos de amostragem ( $P < 0,001$ ) mas não entre os tratamentos ( $P = 0,283$ ) e não houve interação ( $P = 0,200$ ) entre tratamento e tempo.

Ao longo das amostragens, independente do tratamento, a CSL aumentou para valores semelhantes as 3, 6 e 24 horas, em relação aos valores observados em 1 hora, e aumentou mais em 72 horas.

### **3.3 Atividade hepática da glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Figura 3A e 3B)**

A atividade da GPx (Figura 3A) diferiu em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), aos tratamentos ( $P < 0,01$ ) e na interação do tempo e tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo das amostragens, no grupo C, a atividade da GPx caiu às 6 horas, e manteve, nos outros tempos, os valores observados inicialmente. No grupo HC, a atividade foi mais baixa até 24 horas e aumentou às 72 horas. Já no grupo E, o perfil foi semelhante ao do grupo HC. Os valores mais baixos são observados de 1 a 6 horas, eleva às 24 horas e mais ainda às 72 horas.

Comparando os tratamentos em cada tempo, em uma hora, a atividade da GPx sempre foi mais elevada no grupo C, em relação aos grupos HC e E, exceto às 72 horas, quando os valores se igualam.

A atividade da CAT (Figura 3B) diferiu em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), aos tratamentos ( $P < 0,01$ ) e na interação do tempo e do tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo das amostragens, no grupo C, a atividade da CAT não mostrou alterações significativas. No grupo HC, a atividade reduziu às 3 horas em relação à observada à 1 hora e se manteve, não alterando-se significativamente até o final das amostragens. Perfil semelhante foi observado no grupo E.

Comparando os tratamentos em cada tempo, em uma hora, os três grupos apresentaram resultados semelhantes. Às três horas, a atividade do grupo E foi a mais reduzida em relação aos outros dois grupos, e nos outros tempos de amostragem a atividade observada no grupo HC foi menor que a do grupo C, e a do grupo E menor que as outras duas.

### 3.4 Indicadores teciduais

#### 3.4.1 Índice esplenossomático (IES) (Figura 4)

O IES diferiu em relação ao tempo de amostragem ( $P = 0,016$ ), no entanto não diferiu entre os tratamentos ( $P = 0,094$ ) e não houve interação entre os fatores ( $P = 0,10$ ). Os grupos não diferiram em cada tempo de amostragem e os resultados entre os tempos não foram significativos.

#### 3.4.2 Polpa branca (PB) e polpa vermelha (PV) (Figura 5A e 5B; Figura 7)

A porcentagem de polpa branca (Figura 5A) diferiu em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), aos tratamentos ( $P < 0,001$ ) e na interação do tempo e tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo das amostragens, no grupo C, não houve alteração na área correspondente à PB. No grupo HC, a porcentagem de PB aumentou de 1 para 3 horas, e diminuiu nas amostragens seguintes obtendo padrão de resultados nos valores observados na primeira hora de amostragem. Já no grupo E, houve um aumento de 1 para 3 e 6 horas, com outra elevação as 24 e 72 horas.

Comparando os tratamentos em cada tempo, em 1 hora, observa-se uma redução gradual da porcentagem de PB do grupo C para os grupos HC e E. Nos tempos 3 e 6, a PB do grupo E é menor que dos outros grupos e nas outras amostragens não há diferença entre os grupos.

No caso da polpa vermelha (PV) (Figura 5B), a porcentagem diferiu entre os tempos de amostragem ( $P < 0,001$ ), entre os tratamentos ( $P < 0,001$ ) e houve interação entre tempo e tratamento ( $P = 0,007$ ).

Ao longo das amostragens, a porcentagem de PV no grupo C não se modifica; no grupo HC observa-se uma redução às 3 horas, em relação à amostragem anterior, mas os valores voltam aos níveis da amostragem inicial nas amostragens seguintes. No caso do grupo E, observa-se uma redução às 3 e 6 horas, enquanto os valores das outras amostragens se assemelham.

Comparando os tratamentos em cada tempo, na primeira amostragem o grupo HC tem os valores mais elevados, enquanto às 3 e 6 horas, os valores mais

baixos são observados no grupo E. Já nos outros tempos, não há diferença entre os grupos.

### *3.4.3 Melanomacrófagos (MMs) e Centro de melanomacrófagos (CMMs) (Figura 6A e 6B; Figura 7)*

Tanto a porcentagem de MMs quanto a de CMMs diferiram em relação ao tempo de amostragem ( $P < 0,001$ ), aos tratamentos ( $P < 0,001$ ) e na interação do tempo e tratamento ( $P < 0,001$ ).

Ao longo das amostragens, tanto no grupo C quanto no grupo HC, não há diferença entre a porcentagem de MMs (Figura 6A). Já no grupo E, as porcentagens mais elevadas são observadas 1, 3 e 6 horas, que diminuem nas amostragens seguintes.

Comparando os tratamentos em cada tempo, em uma, três e seis horas, a porcentagem de MMs do grupo E é mais elevada que nos outros grupos, enquanto os valores não diferem nas amostragens seguintes.

Em relação aos CMMs (Figura 6B), eles só foram observados no grupo E nas amostragens de 1, 3 e 6 horas.

Na Figura 7, são apresentadas fotomicrografias do baço com a identificação das diferentes estruturas: polpas branca e vermelha, MMs e CMMs.

## **4 DISCUSSÃO**

Neste estudo, pacus juvenis tiveram as concentrações de cortisol elevadas exógena (administração oral de hidrocortisona) e endogenamente (exposição a estressor) para avaliar seu papel mediador em respostas imunes e do sistema hepático de defesa antioxidante dos peixes. Nos peixes expostos ao estressor, a relação entre as respostas de estresse e os indicadores imunes e do sistema antioxidante analisados foi mais clara, sugerindo que a elevação do hormônio por ingestão de HC não simulou a resposta de estresse e que outros sistemas hormonais (Yada e Tort, 2016) estão envolvidos na regulação das respostas. O cortisol circulante é utilizado como um dos mais importantes indicadores da condição de estresse (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; Barton, 2002; Tort, 2011).

De modo geral, o estresse/cortisol afetaram negativamente as respostas imune inatas e o sistema hepático enzimático de defesa antioxidante. Adicionalmente, o baço apresentou características de estresse oxidativo quando os peixes passaram por estresse.

O perfil do cortisol circulante diferiu entre as estratégias usadas. A maior concentração do hormônio nos peixes alimentados com HC, observada uma hora depois da ingestão do alimento, diminuiu gradativamente até valores abaixo dos valores controle, sugerindo a presença de um mecanismo de feedback negativo. Já nos peixes expostos ao estressor, as maiores concentrações de cortisol, observadas às três horas, se mantiveram ao longo da observação.

Com relação à glicose, outro importante indicador de estresse (Wells e Pankhurst, 1999; Barton, 2002), o perfil também diferiu dependendo da estratégia de elevação do cortisol. Nos peixes E, houve um aumento inicial seguido da recuperação dos valores controle, como esperado no tipo de manejo utilizado (Arends et al., 1999; Barcellos et al., 2001; Morales et al., 2005), enquanto nos peixes HC a elevação foi mais tardia, refletindo aumento da glicemia por gliconeogênese, por ação do cortisol (Mommsen et al., 1999).

Em relação aos indicadores de imunidade inata, a ARL aumentou pontualmente nos peixes E, 3 horas depois do estressor, mas a observação mais marcante foi a redução da atividade após 6 horas nos grupos HC e E. A relação destas respostas com o cortisol não é clara. No grupo HC, o aumento inicial do cortisol não se refletiu em mudança da ARL, até 3 horas, enquanto a redução da atividade ocorreu quando os níveis do hormônio estavam em declínio. Entretanto, às 24 horas, quando os níveis do cortisol eram os mais baixos, a ARL recuperou os valores mais altos observados ao longo do período experimental. Do mesmo modo, nos peixes E não há uma relação clara entre o perfil do cortisol e da ARL. Às 3 horas, ambos estão elevados, mas enquanto o cortisol manteve os mesmos níveis até 72 horas, a ARL apresentou uma redução às 6 horas.

A ARL é um indicador da primeira linha de defesa imune do organismo, que é o processo de fagocitose (Secombes, 1996), desenvolvido por leucócitos, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, que aumentam o consumo de oxigênio molecular produzindo EROs, no processo conhecido como “burst” oxidativo, e que atuam como bactericidas. A produção de altas taxas de EROs já é bem estudada

nos fagócitos de vertebrados (Weiss et al., 1981; Babior, 1984) e também em peixes (Lutter et al., 1986; Bayne e Levy, 1999).

No presente estudo, os peixes não foram expostos a nenhum patógeno, mas respostas de ativação e de supressão das respostas inatas associadas à condição de estresse foram relacionadas ao tipo de estressor e tempo de exposição e descritas em revisão recente (Yada e Tort, 2016). Nos peixes E, houve ativação da ARL às 3 horas, sugerindo mobilização celular, característica de estresse agudo, mas às 6 horas já houve uma redução, assim como no grupo HC, embora o período seja curto para caracterizar um período crônico. Leucócitos são ativados na fase inicial do estresse para preparar o corpo para reagir prontamente a uma possível injúria (Wojtaszek et al., 2002). Peixes tratados com cortisol apresentaram modulação da atividade fagocitária (Harris e Bird, 2000; Yada e Nakanishi, 2002; Esteban et al., 2004) e aumento no número de leucócitos em circulação (Yada e Nakanishi et al., 2002).

No caso do sistema complemento, a atividade foi prejudicada em relação ao sistema imune nos dois grupos HC e E, nas amostragens de 3 e 6 horas. Da mesma forma que na ARL, não foi possível estabelecer uma relação clara entre esta resposta e as concentrações de cortisol circulante, mas em ambas as estratégias a ACH foi reduzida.

O sistema complemento é também um importante efector da resposta imune. Ele é composto por um conjunto de proteínas que, quando ativas, atuam na eliminação de patógenos além de desempenhar papel importante em reações de inflamação, atraindo células fagocíticas para o local da lesão (Holland e Lambris, 2002; Nikoskelainen et al., 2002; Boshra et al., 2006; Nakao et al., 2011). Neste estudo, não houve desafio bacteriano como agente de estimulação do sistema, mas não foi observada a ativação relatada por Yada e Tort (2016) em situação aguda de estresse, fator diferido entre os resultados obtidos, como a ativação mais tardia do sistema complemento.

Em relação à lisozima, a elevação do cortisol, por ambas as estratégias, não interferiu no perfil sérico da enzima. Na última amostragem (72 horas), a concentração da enzima aumentou independente do tratamento. A lisozima é outro importante componente do sistema imune inato dos peixes (Grinde et al.,



1988) e atua contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Fast et al., 2008; Palaksha et al., 2008).

No caso dos indicadores do sistema hepático de defesa antioxidante, houve prejuízo na atividade de ambas as enzimas estudadas, a GPx e a CAT, especialmente nos peixes expostos ao estressor. A GPx foi afetada já na primeira amostragem, às 3 horas, e a CAT a partir de 6 horas.

A atividade destas enzimas é um importante indicador da ativação do sistema de defesa antioxidante celular e uma proteção contra o estresse oxidativo (Livingstone, 2001; Valavanidis et al., 2005). Atualmente, pouco se conhece sobre a relação deste sistema enzimático com o estresse generalizado em peixes. É um sistema muito estudado, mas o foco dos estudos é a mediação do estresse oxidativo durante a exposição dos peixes a condições ambientais de risco (Van der Oost et al., 2003; Lushchak, 2016). Em trutas, sob hiperóxia (173% de saturação de O<sub>2</sub>), foram relatados baixos valores das atividades enzimáticas CAT e GPx após exposição de 14 dias (Ritola et al., 2002), enquanto, em salmão do Atlântico exposto por período mais prolongado a esta condição (126 dias com 130% O<sub>2</sub> saturado), foram observadas mudanças na expressão das enzimas antioxidantes, incluindo a glutatona peroxidase (Olsvik et al., 2005).

Embora a importância do estresse oxidativo na condição de estresse generalizado seja conhecida, pouco se conhece sobre o papel do cortisol neste processo. Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem, em humanos, que o cortisol está associado à ativação ou redução da atividade de mitocôndrias e da função e apoptose celular, dependendo das concentrações do hormônio e do tempo de exposição ao mesmo (Du et al., 2009; Aschbacher et al., 2013).

O presente estudo avaliou como indicador de estresse oxidativo as alterações estruturais do baço, importante órgão linfoide que apresenta os melanomacrófagos (MM), ou agrupamentos destes, os centros melanomacrófagos (CMM), células características por acumular pigmentos como lipofucsina, melanina e hemosiderina (Satizabal e Brad, 2015). As lipofuscinas são metabólitos não degradáveis da peroxidação de ácidos graxos insaturados (Terman e Brunk, 2004). A melanina parece atuar na neutralização de radicais livres liberados durante a quebra de membranas celulares fagocitadas (Agius, 1985) e na produção de compostos antimicrobianos como o peróxido de

hidrogênio (Wolke et al., 1985). A presença de melanina ou lipofucsina livre, oriunda da ruptura dos centros melanomacrófagos, é observada na infecção por *Aeromonas hydrophila* (Roberts, 1989).

Já a hemosiderina, é uma forma de estoque intracelular de ferro formado na quebra da hemoglobina e serve como passo intermediário na reciclagem do ferro (Agius, 1979; Kranz, 1989). Os MMs são células pigmentadas com material heterogêneo ou granular, com coloração que pode ir do amarelo ao marrom escuro. Quando há o aumento no número destas células no baço, indicam o aumento da atividade fagocítica no órgão (Rabitto et al., 2005; Mela et al., 2006).

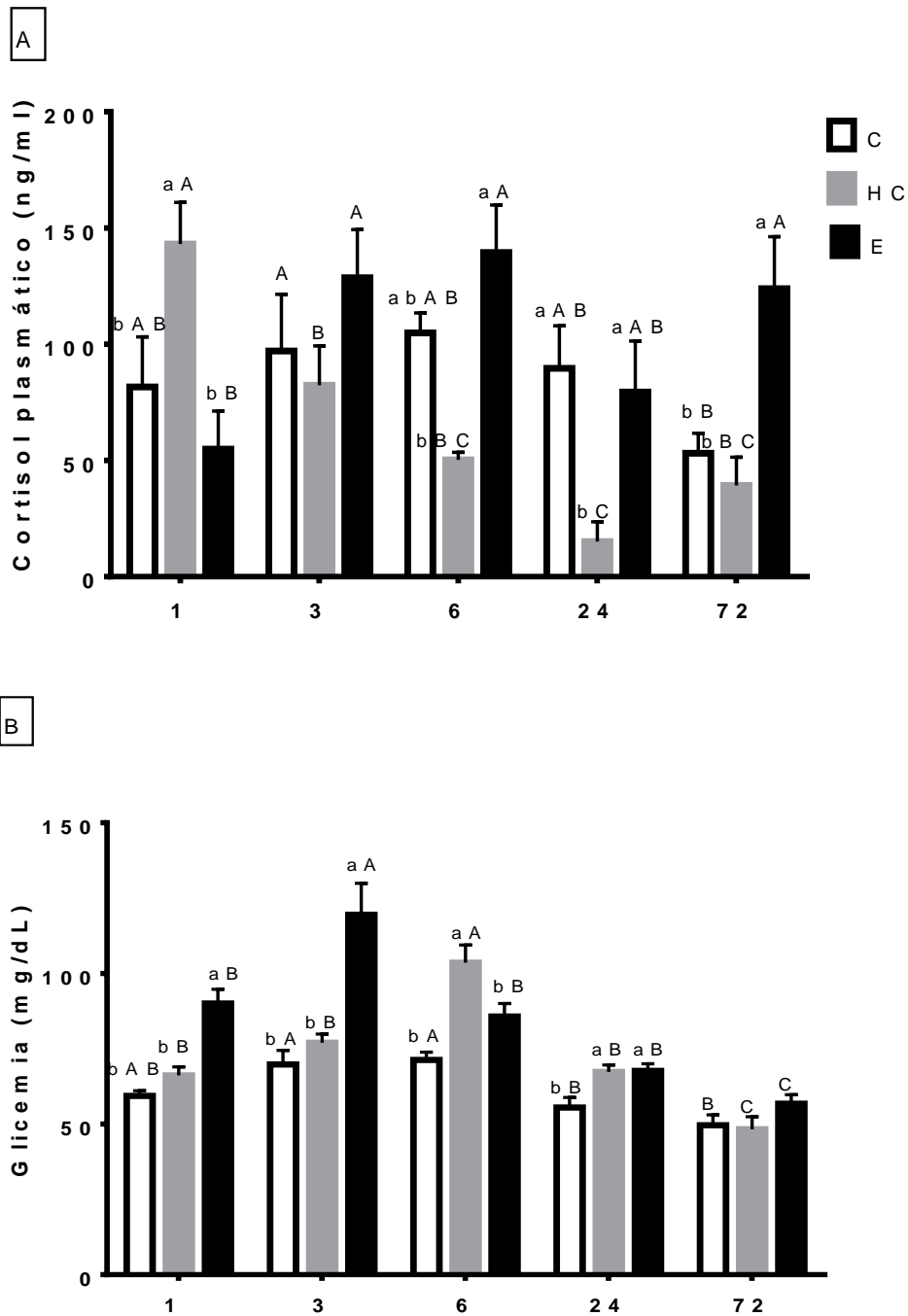
A análise dos MM e CMMs mostraram presença significativamente maior destas estruturas nos peixes E, até 6 horas depois da manipulação dos animais, indicando ocorrência de estresse oxidativo. O tamanho do órgão não se alterou e a relação entre a polpa branca (PB) e a polpa vermelha (PV) mostrou alguma alteração significativa. Nos peixes HC e E, houve redução da PB, até 6 horas após a manipulação dos animais, e da PV, particularmente nos peixes E, no mesmo período. Esses achados indicam mobilização das células do tecido. Segundo Fishelson (2006), o baço de peixes teleósteos é similar ao de vertebrados, com uma separação bastante marcante entre uma polpa branca, constituída de tecido linfático, e uma polpa vermelha que contém uma rede de cordões celulares enrolados, rico em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos.

Histologicamente o baço dos peixes, neste estudo, apresentou distinção da polpa branca e polpa vermelha, no entanto entre os grupos HC e E a proporção das polpas foi desequilibrada se comparadas ao tratamento C. A polpa vermelha constituía-se por campos de hemácias, vasos sanguíneos, melanomacrófagos livres, eosinófilos e linfócitos e a branca por nódulos linfáticos formados por infiltrados mononucleares.

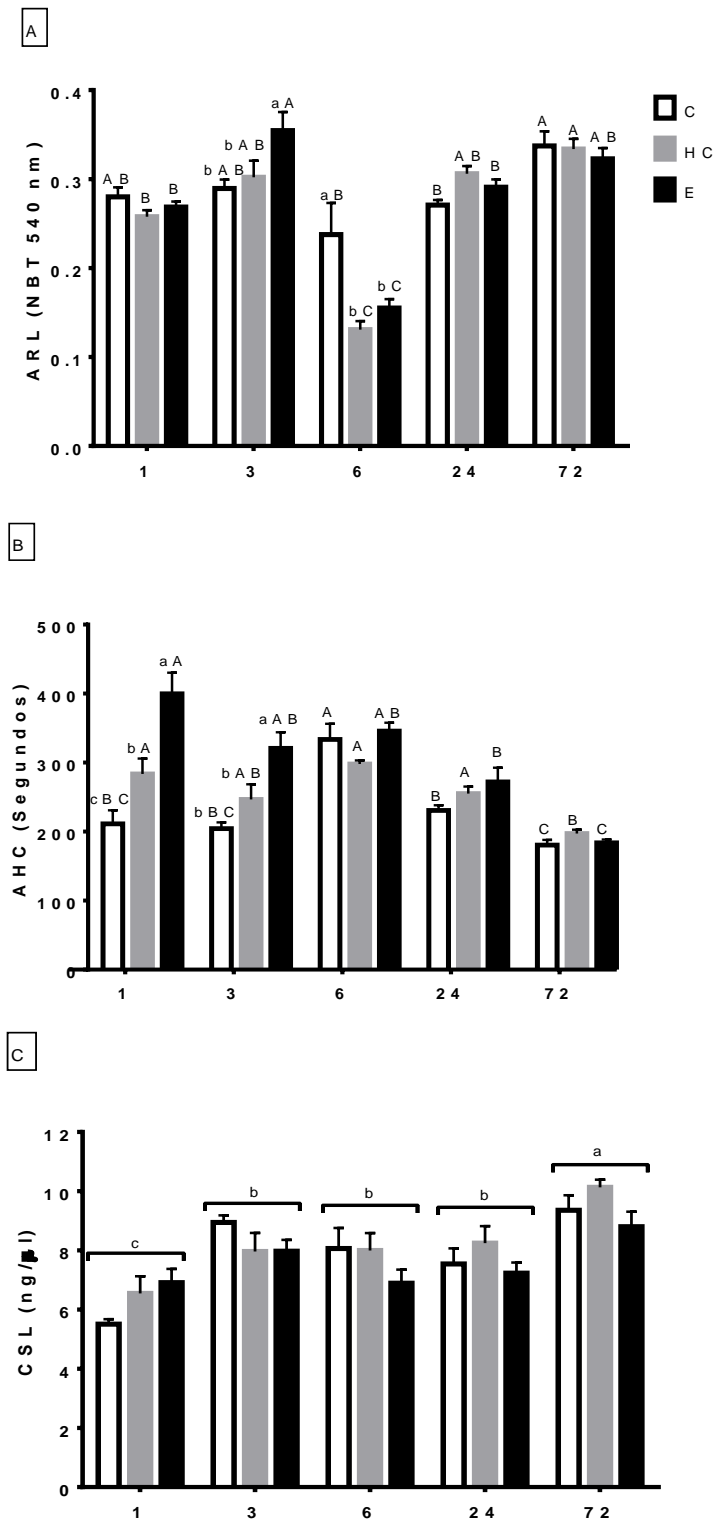
Considerando o conjunto de dados obtidos, pode-se concluir que tanto a administração oral de hormônio, quanto a exposição dos peixes ao estressor, aumentaram os indicadores de estresse (cortisol e glicose sanguíneos) mas a administração não reproduz as condições de produção endógena do cortisol. Entretanto, foi possível concluir que o estresse/cortisol afetou negativamente as respostas imunes e do sistema hepático de defesa antioxidante, e levou a uma

condição de estresse oxidativo expresso pela presença de MMs e CMMs esplênicos.

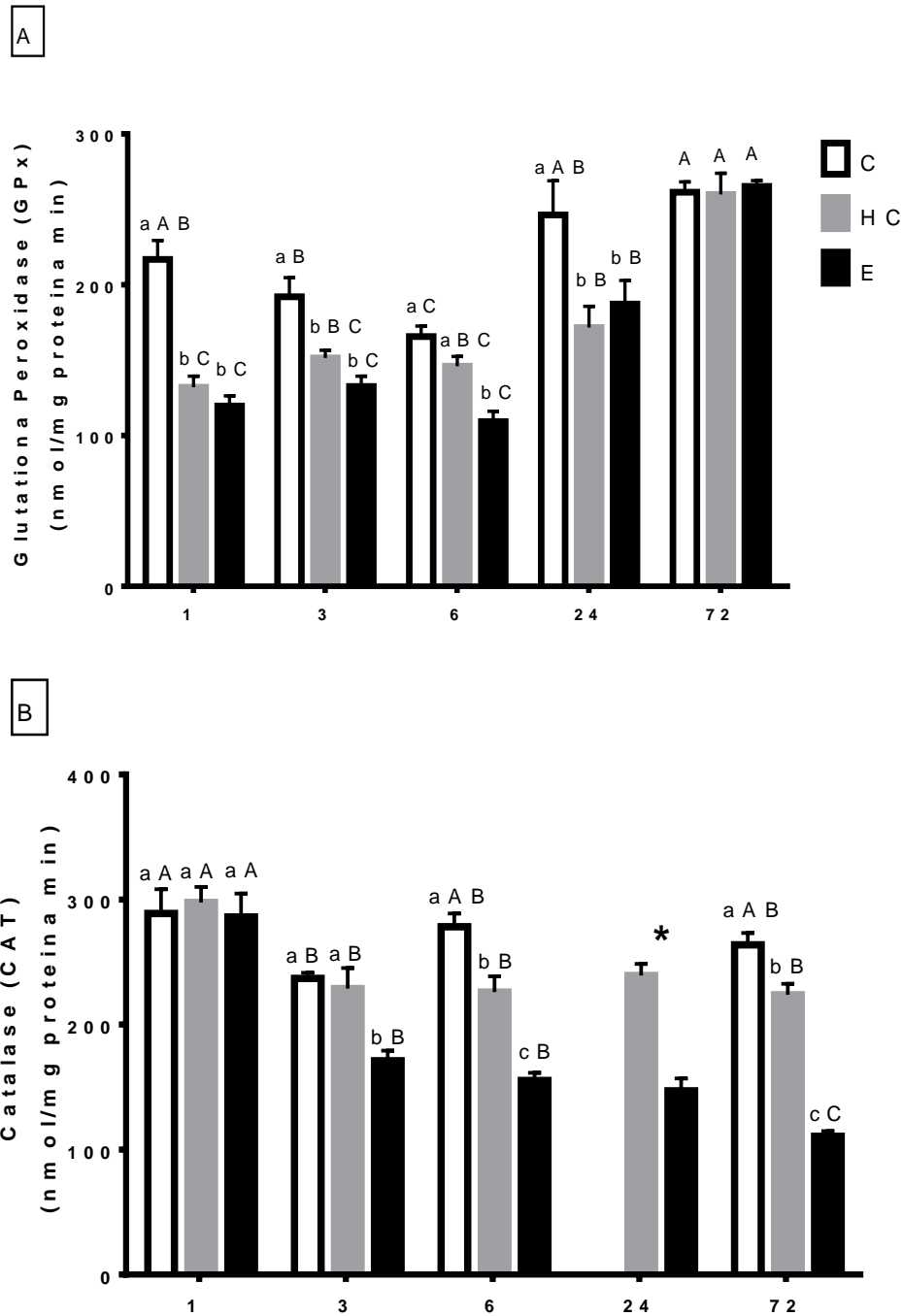
Entretanto, pelo pouco que se conhece sobre a interação do sistema fisiológico de estresse e do sistema imune inato com as respostas do sistema antioxidante de defesa em peixes, estudos futuros devem ser desenvolvidos para esclarecer as questões em aberto sobre o tema, com consequências na fisiologia dos peixes e seu desdobramento no desempenho produtivo de espécies de interesse econômico e ambiental.



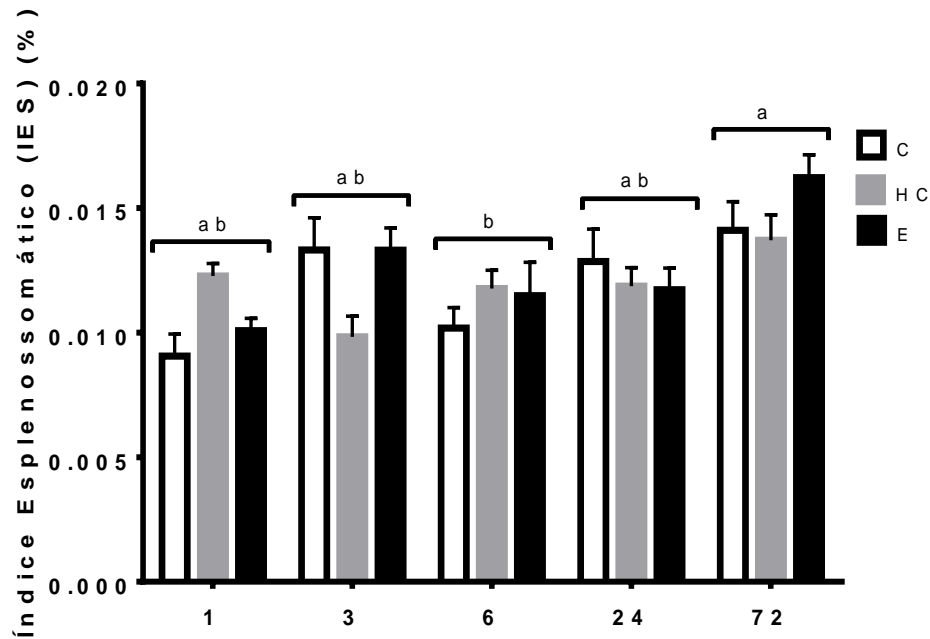
**Figura 1.** Concentrações plasmáticas de cortisol (A) e glicose (B) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.



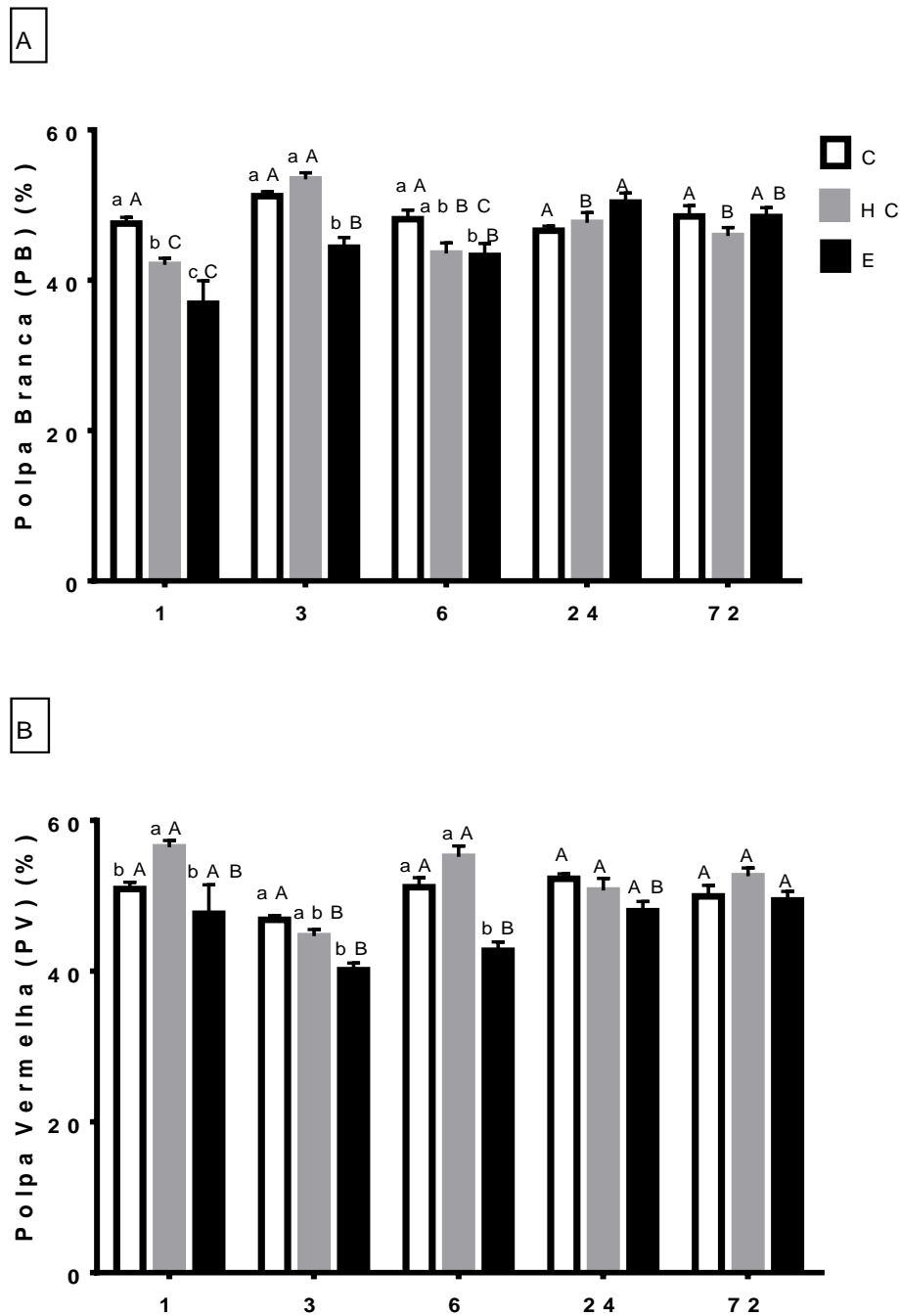
**Figura 2.** Atividade respiratória de leucócitos ARL (A), atividade hemolítica do sistema complemento AHC (B) e concentração sérica de lisozima CSL (C) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.



**Figura 3.** Atividade hepática da glutathione peroxidase GPx (A) e catalase CAT (B) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo. \*Os resultados da catalase da amostragem 24 horas do tratamento controle não são apresentados, pois as amostras foram perdidas no armazenamento.

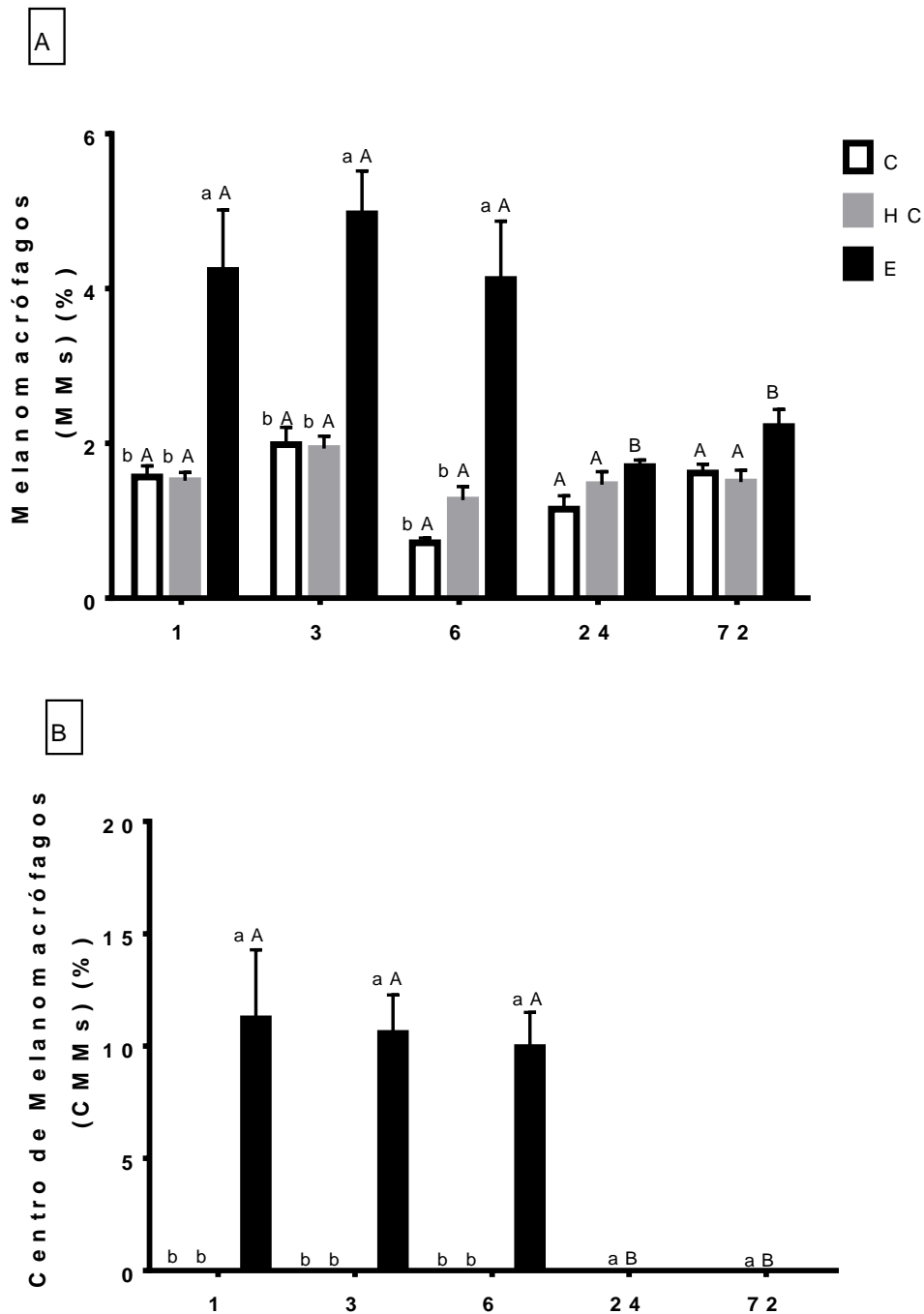


**Figura 4.** Índice esplenossomático de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos ao longo do tempo.

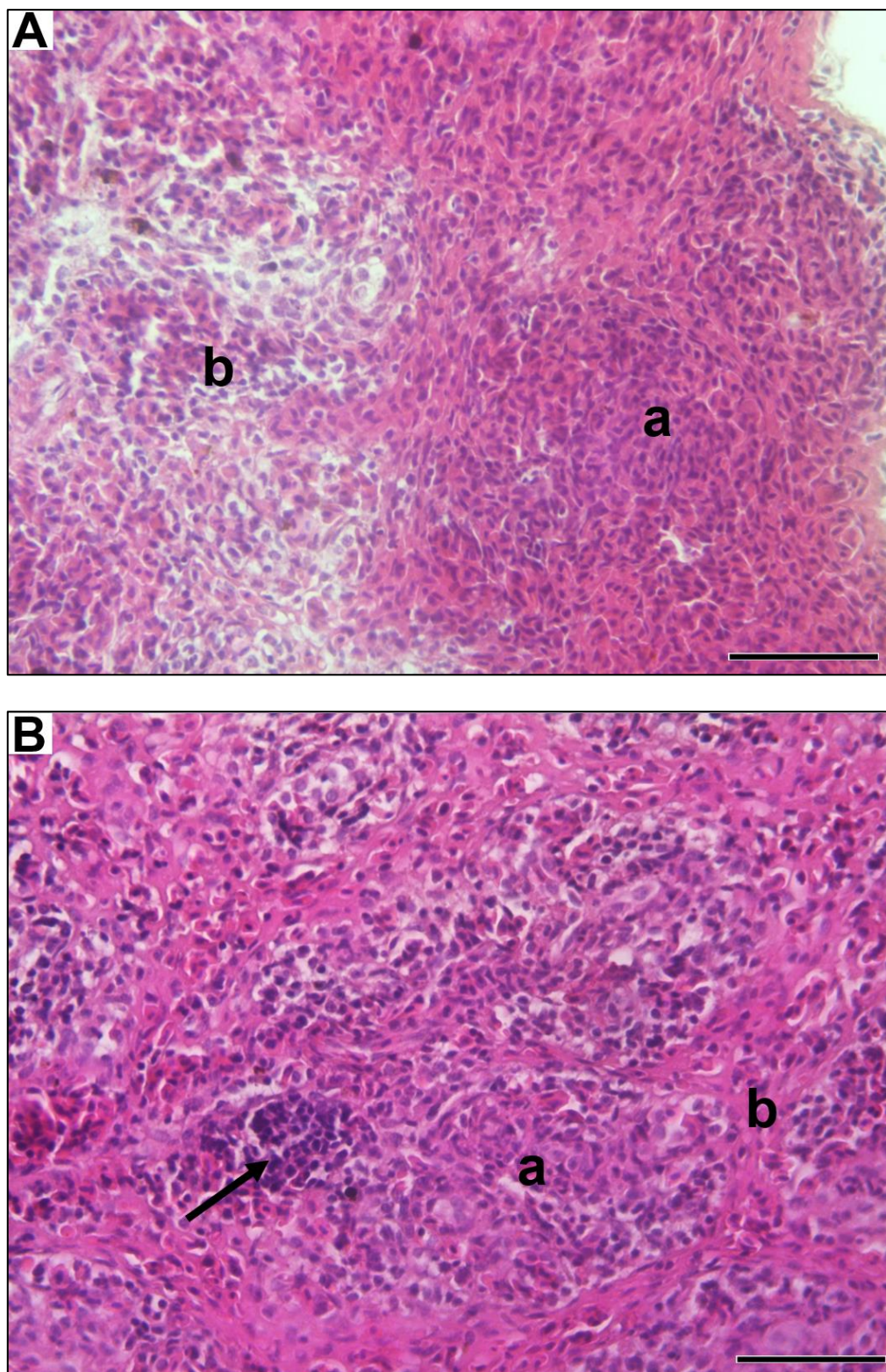


**Figura 5.** Polpa branca PB (A) e polpa vermelha PV (B) no baço de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.





**Figura 6.** Melanomacrófagos MMs (A) e Centro de melanomacrófagos (CMMs) (B) de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo ao longo de 72 horas. Controle sem manejo (C), peixes alimentados com ração contendo hidrocortisona (HC) e peixes submetidos a estresse (E). Letras minúsculas indicam a comparação de tratamentos no mesmo tempo e letras maiúsculas de cada tratamento ao longo do tempo.



**Figura 7.** Fotomicrografias de polpa vermelha (a), polpa branca (b) e centros de melanomacrófagos (seta) no baço de juvenis de pacu submetidos a diferentes protocolos de manejo. (A) peixes controle C e (B) peixes submetidos a estresse E após 1 hora. 40x, Hematoxilina e Eosina.

---

## 5. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase. In: BERGMAYER, H.U.; WEINHEIM, V.C (Eds.) Methods of enzymatic analysis. New York, London: Academic Press, p. 673-683, 1974.

AGIUS, C. The melano-macrophage centres in fish: a review. In: Manning, M. J.; Tatner, M. F. (Ed.). Fish Immunology. London: Academic Press, p. 85-105, 1985.

AGIUS, C. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. Journal of Fish Diseases, Oxford, v. 2, n. 4, p. 337-343, 1979.

ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, O.M.; DHABHAR, F. S.; SU, Y.; EPEL, E. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity, Psychoneuroendocrinology, n. 38, v. 9, p. 1698 - 1708, 2013.

ARENDS, R.J.; MANCERA, J.M.; MUNOZ, J.L.; WENDELAAR BONGA, S.E.; FLIK, G. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. Journal of Endocrinology, v. 163, n. 1, p. 149-157, 1999.

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. Journal of Clinical Investigation, v. 73, p. 599-605, 1984.

BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEHTE, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências. Boletim do Instituto de Pesca, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2001.

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

BAYNE, C. J.; LEVY, S. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines: mechanisms of action. Journal of Leukocyte Biology, v. 50, p. 554-560, 1999.

BELLÓ, A.R.R.; FORTES, E.; BELLÓ-KLEIN, A.; BELLÓ, A.A.; LLESUY, S.F.; ROBALDO, R.B.; BIANCHINI, A. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. Diseases of Aquatic Organisms, v.42, p.233-236, 2000.

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

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

BRINN, R. P. Cortisol exógeno em matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae, Gûnter, 1869): Variáveis fisiológicas na maturação final e crescimento inicial da prole. Tese (Doutorado) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, 2003.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review Biochemistry*, v. 58, p. 79-110, 1989.

DOS SANTOS, W. M.; DE BRITO, T. S.; DE A. PRADO, S.; DE OLIVEIRA, C. G.; DE PAULA, A.C.; DE M. HOYOS, D. C.; RIBEIRO, P. A.P. Cinnamon (*Cinnamomum* sp.) inclusion in diets for Nile tilapia submitted to acute hypoxic stress. *Fish and Shellfish Immunology (Print)*, v. 54, p. 551-555, 2016.

DU, J.; WANG, Y.; HUNTER, R.; WEI, Y.; BLUMENTHAL, R.; FALKE, C.; KHAIROVA, R.; ZHOU, R.; YUAN, P.; MACHADO-VIEIRA, R.; Mc EWEN, B.S.; MANJI, H.K. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *PNAS*, v. 106, p. 3543-3548, 2009.

ESTEBAN, A.; RODRIGUEZ, A.; AYALA, A.G.; MESEGUER, J. Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabream (*Sparus aurata* L.). *General Comparative Endocrinology*, v.137, p. 89-98, 2004.

FAST, M.D.; HOSOYA, S.; JOHNSON, S.C.; AFONSO, L.O.B. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 24, p. 194-204, 2008.

FISHELSON, L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, v. 267, p. 57-69, 2006.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 105, p.114-121, 1984.

FOGAÇA, F.H.S.; SANT'ANA, L.S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção (artigo de revisão). *Archives of Veterinary Science*, v.14, p.117-127, 2009.

GIMBO, R.Y.; FÁVERO, G.C.; FRANCO MONTOYA, L.N.; URBINATI, E.C. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 43, p. 295-300, 2015.

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

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>a</sup> ed. UK: Oxford University Press, 936p, 2000.

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

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

KRANZ, H., Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 6, p. 167-173, 1989.

LAWRENCE, R.A.; BURK, R.F. Gluthatione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 71, p.952-958, 1976.

LATHA, M.; PARI, L. Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 4, p. 577-586, 2004.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, p. 656-666, 2001.

LUNA, L.G. Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3. ed. New York, Mc-Graw Hill, 1960.

LUSHCHAK, V.I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 711-747, 2016.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V.; HUSAK, V.V.; LUZHNA, L.I.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, K.B. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.37, p.1670-1680, 2005.

LUTTER, R.; VAN SCHAİK, M. L. J.; VAN ZWIETEN, R.; WEVER, R.; ALBRACHT, S. P. J.; MEERHOF, L. J.; HARMERS, M. N.; ROOS, D. Characterization of Cytochrome b558, the protein involved in the production of superoxide by neutrophilic granulocytes. In: Rotilio G, editor. *Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine*. Amsterdam: Elsevier Science, p. 128-150, 1986.

MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006.

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

MORALES, A.E.; CARDENETE, G.; ABELLÁN, E.; REJÓN-GARCÍA, L. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, v. 36, n. 1, p. 33-40, 2005.

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

NIKOSKELAINEN, S.; LEHTINEN, J.; LILIUS, E.M. Bacteriolytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) complement. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 26, p. 797-804, 2002.

OLSVIK, P. A.; KRISTENSEN, T.; WAAGBØ, R.; ROSSELAND, B. O.; TOLLEFSEN, K. E.; BAEVERFJORD, G.; BERNTSEN, M. H. G. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 141, p. 314-323, 2005.

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

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, H. C.; SILVA DE ASSIS, É.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, p. 147-156, 2005.

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. B.; BERTOLI, E.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biology*, v. 17, p. 251-258, 1997.

RITOLA, O.; TOSSAVAINEN, K.; KIURU, T.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P.; MÖLSÄ, H. Effects of continuous and episodic hyperoxia on stress and hepatic glutathione levels in one summer-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, v. 18, p. 159-164, 2002.

ROCHA, E.; MONTEIRO, R.A.F.; PEREIRA, C.A.; Liver of the Brown Trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. *The Anatomical Record*, v. 247, p. 317-328, 1997.

ROBERTS, R.J. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. (Ed.) *Fish pathology*. 2nd ed. London: Baillière Tindall, p. 56-134, 1989.

SATIZABAL, L. D.; BRAD, G. Magor Isolation and cytochemical characterization of melanomacrophages and melanomacrophage clusters from goldfish (*Carassius*

*auratus*, L.). *Developmental and Comparative Immunology*, v.48, p. 221-228, 2015.

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

SCHRECK, C.B., TORT, L. The concept of stress in fish. In *Fish Physiology, Biology of Stress in Fish*. In: Schreck, C. B., Tort, L., Farrell, A. P., Brauner C. J., editor. San Diego, CA: Academic Press, v. 35, p. 1-34, 2016.

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

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: celular defenses. In: IWAMA G. & NAKANISHI T. (Eds). *The Fish Immune System*. Academic Press, London, p. 63-105, 1996.

SERRA, M.; WOLKERS, C.P.; URBINATI, E.C. Novelty of the arena impairs cortisol-related increase in aggression of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Physiology and Behavior*, v. 141, p. 51-57, 2015.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 25, p. 1058-1071, 1986.

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

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

SUNDBERG, M.D. An introduction to stereological analysis: morphometric techniques for beginning biologists. In: Goldman, C.A.; Andrews, S.E.; Hauta, P.L.; Ketchum, R. *Tested studies for laboratory teaching*. Vol. 6. *Proceedings of the 6th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 1992.

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Lipofuscin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 36, p. 1400-1404, 2004.

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

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.64, p. 178-189, 2005.

---

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

WEISS S. J.; YOUNG J.; LOBUGIO, A. F.; SLIVKA, A.; NIMEH, N. F. Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, v. 68, p. 714-720, 1981.

WELLS, R.M.G.; PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 30, p. 276-284, 1999.

WENDEELAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A; DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology*, v. 125, n. 2, p. 176-183, 2002.

WOLKE, E.R.; MURCHELANO, R.A.; DICKSTEIN, C.D.; GEORGE, C.J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 35, n. 1, p. 222-227, 1985.

YADA, T.; NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune system in fish. *International Review of Cytology*, v. 220, p. 35-92, 2002.

YADA, T.; TORT, L. Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions. In: Schreck, C.B.; Tort, I.; Farrel, A. P.; Brauner, C.J. *Fish Physiology – Biology of Stress in Fish*, Sand Diego, CA: Academic Pres, 2016.

ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C.; Effect of Aloe vera extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxa during the transport stress. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, p. 2299-2302, 2015.