

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Suplementação dietética com vitamina E:  
respostas de estresse, da imunidade inata e  
do sistema antioxidante de juvenis de pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**

**Aurea Veras Barbosa de Souza**

**Engenheira de Pesca**

Jaboticabal, São Paulo

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Suplementação dietética com vitamina E:  
respostas de estresse, da imunidade inata e  
do sistema antioxidante de juvenis de pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**

**Aurea Veras Barbosa de Souza**

**Orientadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati**

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

2019

Souza, Aurea Veras Barbosa de  
S729s Suplementação dietética com vitamina E: respostas de estresse, da  
imunidade inata e do sistema antioxidante de juvenis de pacu  
(*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) / Aurea Veras Barbosa  
de Souza. – – Jaboticabal, 2019  
vi, 65 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de  
Aqüicultura, 2019

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Luis Henrique Montrezor, Jaqueline Dalbello

Biller

Bibliografia

1. Estresse em peixes. 2. Imunonutriente. 3. Piscicultura. 4.  
Sistema antioxidante. 5. Sistema imune. 6. Tocoferol. I. Título. II.  
Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3.05



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Suplementação dietética com vitamina E: respostas de estresse, da imunidade inata e do sistema antioxidante de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)

**AUTORA:** AUREA VERAS BARBOSA DE SOUZA

**ORIENTADORA:** ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovada 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

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER  
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

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

Jaboticabal, 01 de março de 2019

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá).

# AGRADECIMENTOS

Essa é a parte onde tentarei agradecer pessoas tão importantes com palavras escritas em uma folha de papel, onde elas não serão suficientes para demonstrar o meu agradecimento por cada contribuição que fizeram este momento se tornar realidade.

Agradeço a Deus, meu mestre maior, aquele que me guia e escuta em todos os momentos e que não me deixa desistir.

A minha mãe e família, que acompanharam cada etapa deste trabalho, minhas angústias, desesperos e alegrias. Obrigada por estarem sempre comigo, por todo amor e alegria pelas etapas que venço na vida. Amo vocês!

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela orientação, confiança, ensinamentos, incentivos e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Damares Perecim pela ajuda nas coletas e fora delas. Adoro sua alegria, agradeço também os conselhos.

À Raíssa Ribeiro, Adriane Federici, Allana Feitoza e Mariana Mello, pela ajuda em todas as etapas do experimento e pela amizade construída. Este trabalho não seria tão bom sem vocês ao meu lado! Obrigada pelas conversas, ajuda, piadas e momentos de alegria que amenizavam o *estresse* diário. O companheirismo de vocês, a disposição em sempre ajudar foi fundamental nesses dois anos, desde os pequenos até os grandes problemas. Amo vocês!

A todos amigos do laboratório de Fisiologia de Peixes: Mônica Serra, Ana Paula Montedor, Larissa Frazão, Rudney Weiber, Thais Lucato, Gabriela Leandro, Renan Bin, Camila Faria, pela ajuda nas longas horas de análises, pelo apoio e amizade. Pois o segredo de um grande sucesso está no trabalho de uma grande equipe.

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da Unesp, principalmente ao Valdecir e Márcio pela ajuda em várias etapas deste experimento.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado para realização deste projeto.

A todos que estiveram, participaram de alguma forma, e permaneceram em minha vida, todo meu agradecimento.

## **APOIO FINANCEIRO**

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo nº 131568/2017-5

## SUMÁRIO

RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO I .....	13
1. Aquicultura - cenário atual .....	14
2. Estresse em peixes .....	14
3. Sistema imune em peixes .....	17
4. Sistema antioxidante/Estresse oxidativo .....	19
5. Vitamina E .....	22
6. Modelo biológico .....	23
REFERÊNCIAS .....	25
CAPÍTULO II .....	35
Suplementação dietética com vitamina E: variáveis fisiológicas e avaliação do sistema antioxidante de juvenis de pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> ) .....	35
RESUMO .....	36
ABSTRACT .....	37
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.1 Rações experimentais .....	40
2.2 Animais e protocolo experimental .....	40
2.3 Coletas e análises laboratoriais .....	41
2.3.1 Análise de indicadores de estresse .....	42
2.3.1.1 Concentração plasmática de cortisol e glicose .....	42
2.3.2 Análise de indicadores imunológicos .....	42
2.3.2.1 Atividade respiratória de leucócitos .....	42
2.3.2.2 Atividade do sistema complemento .....	43
2.3.2.3 Determinação da atividade de lisozima .....	43
2.3.3 Análise de indicadores do sistema antioxidante .....	44
2.3.3.1 Concentrações de proteínas hepáticas .....	44
2.3.3.2 Atividade da glutathione S-transferase (GST) .....	44
2.3.3.3 Atividade da glutathione reduzida (GSH) .....	44
2.3.3.4 Atividade da catalase (CAT) .....	45
2.4 Estatística .....	45
3. RESULTADOS .....	46
3.1 Indicadores de estresse .....	46
3.1.1. Concentrações plasmáticas de cortisol .....	46

3.1.2. Concentrações plasmáticas de glicose .....	47
<b>3.2 Indicadores de imunidade inata</b> .....	<b>49</b>
3.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (ARL) .....	49
3.2.2 Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC50) .....	50
3.2.3 Concentração sérica da lisozima.....	51
<b>3.3 Indicadores do sistema antioxidante</b> .....	<b>52</b>
3.3.1 Atividade da glutathiona reduzida (GSH) .....	52
3.3.2 Atividade da glutathiona S-transferase (GST) .....	53
3.3.3 Atividade da catalase (CAT).....	54
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>

## RESUMO

Manejes inerentes da piscicultura intensiva afetam a condição fisiológica e o sistema imune, desencadeando respostas de estresse nos animais, podendo aumentar a susceptibilidade a infecções, causando queda da produtividade. Para contornar este problema, o uso de nutrientes moduladores do sistema imunológico na dieta vem sendo utilizado como medida profilática para assegurar uma maior sobrevivência e conseqüentemente a produtividade. A vitamina E é um importante antioxidante e tem sido muito utilizado na aquicultura pelo seu efeito imunoestimulante. Porém, é pouco investigado o seu efeito direto sobre a resposta clássica de estresse. Neste contexto, o presente estudo avaliou, em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o uso oral de vitamina E na dieta com 0,150 e 500 mg kg<sup>-1</sup> administrados por 30 dias, onde em cada condição alimentar metade dos peixes foram manipulados (submetidos a estresse por perseguição (estresse crônico)). Após o período experimental, foram amostrados para respostas de estresse, do sistema imune e sistema antioxidante de peixes submetidos a estressores crônico e agudo. Avaliamos como indicadores da resposta de estresse, a concentração de cortisol e glicose plasmáticos; como indicadores do sistema imune inato, a atividade respiratória de leucócitos, a atividade hemolítica do sistema complemento e a atividade de lisozima; como indicadores do sistema antioxidante/estresse oxidativo, as atividades das enzimas hepáticas da glutathione-S-transferase (GST), da glutathione reduzida (GSH) e da catalase (CAT). A vitamina E influenciou na glicose ao longo das amostragens, e em peixes não manipulados a elevação foi maior nos que receberam alimentação com 150mg de vitamina. A atividade respiratória de leucócitos teve elevação reduzida nos peixes que receberam a ração suplementada. A concentração sérica da lisozima não diferiu em ambas as condições, tanto nos peixes com estresse crônico quanto os que sofreram estresse agudo e a atividade hemolítica do sistema complemento aumentou 24h depois do estressor agudo em todos os grupos, nas duas condições. Nossos resultados mostram que a vitamina E estimula o sistema imunológico, e também o sistema antioxidante de ambas as condições de estresse.

## PALAVRAS- CHAVE:

Estresse em peixes, Imunonutriente, Piscicultura, Sistema antioxidante, Sistema imune e Tocoferol

## **ABSTRACT**

Inherent management of intensive fish farming affects the physiological condition and immune system, triggering stress responses in animals, which may increase susceptibility to infections, causing a drop of the productivity. To solve/reduce this problem, the use of nutritional modulators of the immune system in the diet has been considered as a prophylactic measure to ensure better survival and consequently productivity. Vitamin E is an important antioxidant that has been widely used in aquaculture also as an immunostimulant. However, its direct effect on the classic stress response is little investigated. In this context, the present study evaluated the oral use of vitamin E in the diet with 0.150 and 500 mg kg<sup>-1</sup> administered for 30 days, in which half of the fish were handled during the whole period (Chronic Stress) and the other half was not disturbed and only handled acutely after the 30-day period (Acute stress). After the experimental period, both fish groups were sampled for the assessment of indicators of stress, innate immune system and the antioxidant system. We evaluated the concentration of cortisol and glucose, the respiratory activity of leukocytes, the hemolytic activity of the complement system and the activity of lysozyme, and the activity of hepatic enzymes glutathione-S-transferase (GST) and catalase (CAT), and the reduced glutathione (GSH). Vitamin E influenced glucose throughout the samplings, and non-fish manipulated the elevation was higher in those fed with 150mg vitamin. The leukocyte respiratory activity had a reduced elevation in the fish that received the supplemented feed. The serum concentration of lysozyme did not differ in both conditions, both in fish with chronic stress and those who suffered acute stress and the hemolytic activity of the complement system increased 24 hours after the acute stressor in all groups, under both conditions. Our results show that vitamin E stimulates the immune system, and also the antioxidant system of both stress conditions.

## **KEYWORDS:**

Stress in fish, Immunonutrient, Pisciculture, antioxidant system, immune system and Tocopherol

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## **1. Aquicultura - cenário atual**

Aquicultura é a produção de organismos aquáticos, que se destina a produzir alimentos de alto valor nutritivo. É a atividade considerada como única alternativa para aumentar o suprimento de pescado, sendo o setor de produção que mais cresce no mundo (Jensen, Nielsen e Nielsen, 2014). Segundo a FAO (2018), a produção mundial de pescado foi de 110,2 milhões toneladas, com a aquicultura contribuindo com 80 milhões toneladas em 2016.

O Brasil se destaca como um dos países com capacidade para a expansão da aquicultura, pois apresenta diversos fatores favoráveis, como, diversidade em espécies nativas, potencial hídrico e áreas adequadas ao desenvolvimento da atividade, além de condições favoráveis do mercado consumidor (Borghetti; Ostrensky, 1999). A aquicultura brasileira apresentou uma produção total de 722.560 mil toneladas em 2018, apresentando um aumento de 4,5% (Anuário Peixe-BR, 2019). A piscicultura tem se desenvolvido expressivamente, se impondo como atividade pecuária. Para isso, os sistemas de produção vêm intensificando os sistemas de criação, aumentando a estocagem para aumentar a produtividade. No entanto, a intensificação da produção submete os animais a agentes estressores. Manejos de rotina, densidade de estocagem, transporte, alterações na qualidade da água, entre outros, são considerados os principais fatores estressores que podem reduzir a imunidade dos animais, tornando-os mais susceptíveis a doenças e aumentando a mortalidade, ocorrências indesejadas no sistema de produção (Urbinati e Carneiro, 2004).

## **2. Estresse em peixes**

O estresse é um conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais de um organismo frente a um estímulo, seja ele interno ou externo, que causa alteração e quebra do equilíbrio fisiológico, denominado homeostase. Deste modo, a resposta de estresse é uma reação que promove a adaptação do animal, visando a sobrevivência, diante de uma situação considerada nociva ou desafiadora. Em 1936, Selye apresenta o conceito da Síndrome de adaptação geral (SAG), onde a resposta de estresse apresenta diferentes estágios: a resposta de alarme (primária), se inicia imediatamente após a presença do

estressor, ocorrendo a liberação das catecolaminas e cortisol para a circulação através do sistema nervoso autônomo, via células cromafins do rim cefálico e pelo eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI); estado de resistência (resposta secundária) que é o ajuste corporal para se adaptar as condições homeostáticas alteradas, e a exaustão (terciária), que indicam o grau de alteração provocado pelo estímulo estressor e dependem da intensidade e duração deste estímulo (Mommsen et al., 1999; Tort, 2011, Urbinati et al., 2013).

As respostas resultantes do estresse modificam quanto a intensidade, duração e tipo de agente estressor, podendo ser físicos, químicos e ambientais (Barton e Iwama, 1991). Na piscicultura, atividades como adensamento, perseguição, exposição aérea, captura e transporte são comuns (Urbinati e Carneiro, 2004), caracterizados de estressores físicos. Outros efeitos extenuantes para o peixe, podem ser ocasionados pelo estresse químico, que são alterações na composição química da água (oxigênio dissolvido, pH, concentração de amônia, etc.) e quanto aos estressores ambientais ou sociais temos a densidade de estocagem, agressividade e dominância (Tort, 2011; Urbinati et al., 2014).

O cortisol é um hormônio corticosteroide que tem efeito no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos. É também conhecido como hormônio do estresse por estar relacionado ao aumento da pressão arterial e da glicose no sangue diante de uma situação estressora, gerando assim energia muscular (Brandão et al., 2006). A resposta ao estresse geralmente é seguida de uma hiperglicemia, devido sua ação sobre a glicose hepática através da glicogênese, proporcionando mais energia para que o animal supere mudanças, sejam elas fisiológicas ou físicas. Nos peixes, o cortisol participa de diferentes processos fisiológicos, tais como metabolismo, osmorregulação (Wendelaar Bonga, 1997). O cortisol é o principal glicocorticoide secretado pelo tecido interrenal dos peixes teleósteos e suas concentrações plasmáticas aumentam dramaticamente durante o estresse (Iwama et al., 1999; Mommsen et al., 1999), é considerado um ótimo indicador de estresse primário em peixes.

Como resposta secundária de estresse temos a determinação dos níveis de glicose, podendo ser sanguínea ou plasmática. A glicose nos peixes é a principal fonte de energia, assim como nos mamíferos, e quando ela não é

suficiente para manter a homeostase do animal, outra fonte energética proveniente do fígado é utilizada, o glicogênio (Iwama et al.1999).

O organismo está adaptado para lidar com situações de estresse agudo, definido como ocorrência recente e transitória de um único estressor, mas quando essa condição se torna repetitiva/crônica, ou seja, como uma dificuldade constante enfrentada pelo indivíduo (Shields et al., 2016), seus efeitos se multiplicam em cascata, podendo gerar consequências deletérias para o organismo, quando a homeostase não é reestabelecida. Durante um período de estresse crônico, o animal compromete as reservas de glicogênio, e aumenta o catabolismo de proteínas teciduais. Ou potencialmente podem ocorrer ambos para regular os recursos energéticos necessários para manter os componentes da resposta ao estresse agudo (Wendelaar-Bonga, 1997). Este aumento do uso de reservas energéticas é um fator contribuinte a vulnerabilidade do animal ao desenvolvimento de doenças (Moberg, 1985).

Em peixes, a ação de estressores pode produzir efeitos que desestabilizam a homeostase, mas também pode provocar um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas como ação compensatória e/ou adaptativa, provendo a esse animal a possibilidade de superar as ameaças encontradas (Wendelaar-Bonga, 1997). Entretanto, se esse animal está submetido a estressor intenso e constante, a resposta fisiológica pode perder seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, causando danos à sua saúde e bem-estar (Carmichael et al., 1984). Assim, como consequências danosas do estresse crônico, podem ocorrer redução do crescimento, prejuízo no peso corporal e outros parâmetros, como fator de condição e conversão alimentar (Goede & Barton, 1990; Peters, 1982; Pickering & Stewart, 1984; Wendelaar-Bonga, 1997). Além disso, o estresse pode causar redução do desempenho reprodutivo (Small, 2004) dos animais pela depressão da glândula pituitária e de níveis plasmáticos de gonadotrofinas (Carragher et al., 1989), além do decréscimo de níveis de hormônios esteroides (Pickering & Pottinger, 1987) e do tamanho dos ovos e da qualidade das larvas (Campbell et al., 1992, 1994). O estresse também é conhecido por aumentar a susceptibilidade dos peixes a doenças infecciosas por afetar negativamente a capacidade de resposta do sistema imunológico (Wedemeyer, 1970; Snieszko, 1974; Pickering & Pottinger, 1987; Angelidis et al., 1987).

### 3. Sistema imune em peixes

A imunidade é um conjunto de mecanismos de defesa de grande complexidade, composto por uma vasta gama de componentes celulares e humorais, que tem como objetivo preservar a homeostase e conferir aos organismos proteção contra infecções bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias (Pohlez e Gatlin III, 2014; Urbinati et al., 2014).

O sistema imune de peixes pode ser classificado do ponto de vista funcional em: inato ou não específico e específico ou adaptativo (de memória), assim como nos mamíferos. A resposta inata ou não específica consiste na primeira barreira de defesa do organismo contra a presença de um agente patógeno e no controle de muitas infecções sem recorrer ao sistema específico, e a resposta imune específica, caracterizada pela especificidade e memória imunológica, é induzida por substâncias denominadas antígenos (Iwama e Nakanishi, 1996; Bernstein et al., 1998).

O sistema inato é constituído por parâmetros físicos, humorais e celulares. Os parâmetros físicos são a escamas, e o muco que recobre a pele, brânquias e epitélio gastrointestinal. O muco além de constituir uma barreira física, apresenta também uma série de fatores, que possibilitam o combate de substâncias estranhas de maneira inespecífica. Nos parâmetros celulares encontram-se os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos e *natural killer* que atuam no reconhecimento e eliminação dos patógenos (Ellis,1999; Ellis,2001). A classificação das células sanguíneas dos peixes foi baseada na sua semelhança morfológica com as células dos mamíferos, por esta razão os nomes são os mesmos, apenas algumas funções são diferenciadas (Ainsworth, 1992).

Os parâmetros humorais são proteínas solúveis como os fatores inibidores do crescimento de bactérias, como a antiproteases, proteína C reativa, lisozima e as proteínas do sistema complemento. (Ellis,1999; Ellis,2001).

A atividade respiratória de leucócitos (“burst oxidativo”) compreende o aumento do oxigênio molecular originado na fagocitose. Durante este processo, há redução do O<sub>2</sub> em ânion superóxido, originando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, posteriormente, por ação enzimática, libera radicais hidroxila, água e cloraminas. Nesta reação,

as EROs (espécies reativas de oxigênio), agem na destruição de agentes infecciosos (Verlhac e Gabaudan, 1997).

O sistema complemento é constituído por um conjunto de proteínas solúveis no plasma, que atuam nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (Secombes, 1996), além de ser considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório (Roed et al., 1992). Estas proteínas normalmente se encontram na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea, e sua ativação ocorre de maneira sequencial, em efeito cascata, graças a um estímulo inicial em que cada componente contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado (Rus et al., 2005). A ativação do sistema complemento ocorre pelas vias clássica e alternativa. A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e agregados de imunoglobulinas, enquanto a via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada, mas de presença de certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos são suficientes para a produção das proteínas solúveis no plasma. Em peixes, a atividade bactericida é decorrente principalmente da ativação da via alternativa (Koppenheffer, 1987).

A lisozima é uma enzima de grande importância para o sistema de defesa inespecífico, por possuir capacidade de promover proteção contra invasões de microrganismos. Pode ser encontrada principalmente em locais onde há maior probabilidade de ocorrer invasão bacteriana e em tecidos que possuam grande quantidade de leucócitos, tais como muco, sangue, tecido linfóide e outros fluidos corpóreos de peixes de água doce e marinha (Oohara et al., 1991; Yousif et al., 1991; Shailesh Saurabh e Sahoo, 2008). Em peixes, esta enzima se encontra em maior quantidade em neutrófilos, monócitos e macrófagos, assim o rim cefálico é o órgão onde há maior concentração desta proteína, seguido pelo trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo (Murray e Fletcher, 1976; Lie et al., 1989).

Entretanto, a atividade dessa enzima sofre influência de fatores como sexo, estágio de maturação sexual, temperatura da água, estação do ano, poluição e estresse (Fletcher et al., 1977; Studnicka et al., 1986; Mock e Peters, 1990). A atividade da lisozima pode ser influenciada também pela condição de estresse a qual os peixes são submetidos.

O sistema imune específico é acionado na presença de antígeno, apresenta como funções o reconhecimento do agente invasor, desencadeando uma cascata de reações que irá culminar no aumento de anticorpos específicos circulantes e na memória imune (Bernstein et al., 1998). A imunidade específica refere-se à proteção que existe num organismo quando este já sofreu exposição prévia a determinados agentes patogênicos, e em peixes, assim como nos demais vertebrados, o sistema imune adaptativo requer tempo para que seja ativado (Carey et al., 1999).

As células do sistema imune específico são compostas de linfócitos e são responsáveis pela resposta imune adaptativa humoral e celular. Os linfócitos se distinguem em dois grupos, com ações diferentes, chamados linfócitos T e B (Tort, 2011; Secombes, 1996). As células T apresentam a capacidade de reconhecer o antígeno na presença de moléculas de histocompatibilidade (receptores glicoproteicos). Neste processo de reconhecimento, as células T secretam sinais químicos (citocinas) que ativam as células B, responsáveis pela produção dos anticorpos que irão atuar na destruição dos microrganismos invasores (Abbas e Lichtman, 2004; Urbinati et al., 2014)

#### **4. Sistema antioxidante/Estresse oxidativo**

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo dos organismos, assim os radicais livres são produzidos naturalmente ou devido alguma disfunção biológica. O excesso de radicais livres presente no organismo é combatido por agentes antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos através da dieta (Barreiros et al., 2006).

Segundo Halliwell e Gutteridge (1990), um radical livre é uma espécie (moléculas ou átomos) altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última cadeia eletrônica, é este não emparelhamento que lhe confere alta reatividade. Altas concentrações de radicais livres podem ocasionar oxidação de biomoléculas, gerando um quadro de estresse oxidativo.

A respiração celular consiste na principal fonte de espécies reativas de oxigênio. As mitocôndrias constituem a principal fonte de produção das espécies reativas do oxigênio, seguidas pelo retículo endoplasmático em menores proporções (Biller-Takahashi et al., 2015; Sies, 1997). O equilíbrio dos

organismos aeróbicos com os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio deve-se ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes altamente especializados, numerosos mecanismos antioxidantes vêm sendo descritos como agentes efetivos na proteção da integridade celular contra as EROs.

Halliwell e Gutteridge (1989) relatam que os antioxidantes são moléculas capazes, mesmo em concentrações mais baixas do que o substrato oxidável, de retardar ou prevenir a oxidação. É importante que os antioxidantes tenham uma estrutura química que ao atuar sobre o radical livre, mantenha estável sua própria estrutura (Adams, 1999). Jordão Jr. et al. (1998) definiram os antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares.

Os radicais livres de maior importância nos sistemas aeróbios são os radicais oxigênio. Estes incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os radicais lipídicos alcóxil e peróxil (derivados dos ácidos graxos polinsaturados) e o fortemente reativo radical hidroxil  $HO^\cdot$ . O radical peróxil tem significado especial por seu envolvimento na peroxidação dos lipídios (Burton & Traber, 1990). Os lipídios são constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias, a maior parte destes constituintes é oxidável.

A peroxidação ou autooxidação constitui uma reação em cadeia de oxidação dos óleos e gorduras (Farmer et al., 1942; Burton & Traber, 1990; Nagaoka et al., 1992) gerando os radicais livres que alteram a fluidez, permeabilidade e integridade das mesmas. As gerações de radicais livres estão presentes na maioria dos sistemas biológicos, ocorrem naturalmente em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio. São necessários para funções como sinalização celular, durante os processos metabólicos atuam como mediadores de processos metabólicos nas várias reações bioquímicas. Porém, quando há produção excessiva podem gerar lesões oxidativas (Barbosa et al., 2010).

As células possuem sistema de defesa não enzimáticos e enzimáticos para proteger seus constituintes e manter assim seu estado redox. Em condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos das EROs são neutralizados pelo sistema

defesa antioxidante (Dandapat, 2000). Um agente antioxidante é capaz de inibir a oxidação ou qualquer substância que mesmo presente em baixa concentração, comparada com seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação do substrato. Os agentes antioxidantes podem prolongar a fase de iniciação ou inibir a fase de propagação, mas não previnem completamente a oxidação (Jordão Junior et al., 1998).

Dentre os agentes antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), primeira enzima na linha de defesa, responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (Zhang et al., 2004).

Descrita em 1901 por Loew a catalase é uma enzima que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e  $O_2$ , por isso é considerada um dos maiores componentes da defesa antioxidante primária (Gaetani et al., 1989) é encontrada em todos os organismos vivos.

A glutathione peroxidase (GPx) é responsável por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (e peróxidos orgânicos em seus respectivos álcoois (Dringen; Hirrlinger, 2003), empregando a glutathione (GSH) como cofator e assim gerando a glutathione oxidada (GSSG) como produto (Hayes et al., 1997; Halliwell & Gutteridge, 2007). Dependente de selênio, que emprega a glutathione reduzida (GSH) como cofator.

A enzima glutathione-S-transferase (GST) desempenha um papel importante na detoxificação e eliminação de compostos eletrolíticos. Sua estimulação envolve reações de conjugação na presença de glutathione. (CHO et al., 1999; Fenet et al., 1998; Kantoniemi et al., 1996).

A GSH está envolvida em diversas funções fisiológicas, participa do transporte de aminoácidos e detoxificação de toxinas, atua degradando peróxidos endógenos (Stamler & Slivka, 1996).

O sistema antioxidante não-enzimático tem sua importância devido atuar impedindo as reações de auto oxidação e reduzindo assim os radicais livres (Sayeed et al., 2003).

Os tocoferóis são os principais antioxidantes naturais do grupo primário, sendo caracterizado por serem compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Ramalho & Jorge, 2006). Segundo Rutz (2008) a vitamina E é o único antioxidante que, uma vez

absorvido, deposita-se no organismo animal. Tem importante papel na proteção contra peroxidação lipídica (González-Flecha et al., 1991) eliminando tanto o radical hidroxil quanto o oxigênio singlete (Burton & Ingold, 1981).

## 5. Vitamina E

As vitaminas são compostos orgânicos distintos dos aminoácidos, carboidratos e lipídios, pois são exigidos em menores quantidades e geralmente provindas de fonte exógena. Não são sintetizadas pelo metabolismo natural dos peixes, ou pelo menos não em quantidade suficiente para suprir suas exigências, sendo assim suplementadas na dieta. Com papel vital no metabolismo, estão envolvidas em diversas reações e vias bioquímicas como reguladores e catalisadores metabólicos, são necessárias para reprodução, crescimento e manutenção da higidez destes animais (Gatlin, 2002; Webster e Lim, 2002; Pezzato et al., 2004; Koshio, 2007; Peng e Gatlin, 2009)

As vitaminas podem ser classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis. As consideradas hidrossolúveis são: colina, ácido fólico, biotina, ácido pirodoxina (B<sub>6</sub>), ácido pantotênico (B<sub>3</sub>), niacina, riboflavina (B<sub>2</sub>), tiamina (B<sub>1</sub>), ácido ascórbico (C) e cianobalamina (B<sub>12</sub>). As lipossolúveis são as vitaminas K, A, D e E. Quando ingeridas, as vitaminas hidrossolúveis geralmente não são armazenadas e seu excesso é excretado, em compensação as lipossolúveis são absorvidas no intestino junto aos lipídios e podem ser armazenadas no tecido adiposo do animal (Webster e Lim, 2002; NRC,2011).

Vitamina E é uma descrição utilizada para compostos que tem a mesma atividade biológica que o  $\alpha$ -tocoferol, são solúveis em lipídios e constituem os tocotrienóis e tocoferóis (Halver, 2002; Zingg, 2007; NRC, 2011). Na natureza são encontradas oito formas distintas:  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\alpha$  tocotrienóis e tocoferóis. Foi descoberta em 1922, e descrita como fator nutricional considerado especialmente importante na reprodução animal. Sua substância mais ativa é chamada de tocoferol, e foi isolada em 1936 por Evans (Quinn, 1999).

A vitamina E tem papel importante no funcionamento dos receptores para as respostas imunes, está presente na membrana celular (Trichet, 2010). O seu papel antioxidante é vital para manter a homeostase intra e intercelular. Promovendo a integridade da membrana e macromoléculas (proteínas, lipídios,

DNA e outras vitaminas), protegendo contra a oxidação por radicais livres e peroxidação durante o metabolismo, ou em condições adversas como enfermidades e estresse (Halver, 2002; Webster e Lim, 2002; Chen et al., 2004). A defesa contra o estresse oxidativo inclui enzimas endógenas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). As enzimas exógenas, como a glutathione reduzida (GSH), selênio (Se), vitaminas A, C e E, metalotioneína, entre outros (Schlenk et al., 1999; Halver, 2002; Hamre, 2011).

Esta importante função da vitamina E de resistência à oxidação, especialmente em leucócitos, está ligada à liberação de radicais que participam da atividade microbicida dos macrófagos. Em peixes, a vitamina E também é considerada muito importante por sua ação imune não específica. Ela também mitiga a imunossupressão na resposta de estresse promovido pela alta densidade de estocagem (Montero et al., 1999; Belo et al., 2005).

## 6. Modelo biológico

### **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um teleósteo pertencente a superordem Ostariophysi, da ordem Characiformes, família Characidae e da subfamília Myleinae. É uma espécie nativa encontrada nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai, com maior distribuição nas planícies alagadas da região Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso (Petrere, 1989). Esta espécie possui grande importância para a piscicultura pois apresenta rápido crescimento, rusticidade ao manejo e grande aceitação pelo mercado consumidor. (Urbinati et al., 2013). É um peixe de escamas, com corpo achatado e robusto, possuindo uma coloração variando do castanho ao cinza escuro, com o ventre amarelado. Possui hábito alimentar onívoro/herbívoro, explorando uma gama bastante diversificada de alimentos, devido à sazonalidade, como: sementes, caules, flores e frutos, com fácil adaptação a alimentação artificial (Urbinati et al., 2013).

A espécie desperta interesse para a piscicultura, em função de sua capacidade de aproveitamento de ingredientes de origem vegetal na dieta, rápido crescimento e elevado ganho de peso (Fernandes et al., 2000; Abimorad

et al., 2007). É considerada uma espécie de grande importância na aquicultura brasileira, porém seu cultivo intensivo o coloca em uma condição em que diversos fatores estressantes estão presentes, predispondo-o à imunossupressão e conseqüentemente a doenças (Urbinati e Carneiro, 2004). Desta forma, o sucesso na criação do pacu depende de boas práticas de manejo e de medidas que minimizem o efeito negativo de estressores, garantindo a saúde dos animais.

Assim, pelo exposto, e considerando que o estresse é uma resposta biológica de alta demanda energética, que tem como consequência alterações no sistema imune por desviar recursos energéticos para atividades vitais, e que o sistema antioxidante é um sistema que atua no processo de produção de energia mitocondrial, combatendo radicais livres resultantes da respiração aeróbica, o presente estudo investigou se o balanço redox mitocondrial poderia ser afetado numa condição aguda e crônica de estresse, além de avaliar o papel da vitamina E nas respostas citadas.

## 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. **Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração proteica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).** Revista Brasileira de Zootecnia, v.33, p. 1101-1109, 2004.
- ADAMS, C.A. **Oxidation and antioxidants.** In: NUTRICINES: food components in health and nutrition. Nottingham: Nottingham University Press. Cap.2. p.11-32, 1999.
- AEBI H. **Catalase** Bergmeyer, HV. Methods in enzymatic analysis. Vol. 2, New York: Academic Press; p.674-84,1974.
- AINSWORTH, A.J. **Fish granulocytes morphology, distribution, and function.** Annual Reviews of Fish Disease, v.2, p.123-148,1992.
- ALMEIDA, J. A.; DINIZB, Y.S.; MARQUESA, S.F.G. **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.
- ANGELIDIS, P.; BAUDIN-LAURENCIN, F.; YOUINO, P. **Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*.** Journal of Fish Biology, 31, p.113-122, 1987.
- ANUÁRIO Peixe-BR 2019 - PEIXE BR. Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixe-BR. Associação Brasileira da Piscicultura. Disponível em: <http://www.peixebr.com.br>.
- ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, OM.; DHABHAR FS, SU Y, EPEL E. **Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity.** Psychoneuroendocrinology, v.38, p.1698–1708, 2013.
- BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova. 29: 113 – 12, 2006.
- BARTON, B. A. **Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective.** In: Iwana, G.K.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (eds) Fish Stress and Health in Aquaculture. Society for Experimental Biology, Seminar Series 62, Cambridge: Cambridge University Press. p. 1-33, 1997.

BARTON, B. A. **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.** Integrative and Comparative Biology, v.42, 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.

BASSITY, E.; CLARK T.G. **Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Journal Plos One, v.7(3) p.1-14, 2012.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C; MORAES. F.R.; SOARES, V.E; OTOBONI, A. M. M. B. MORAES, J. E. R. **Effects of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish *Piaractus mesopotamicus*.** Journal of Comparative Pathology. v. 133, n. 2/3. P. 146-154, 2005.

BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. **Immunity.** In: EVANS, D.H. (Ed.). The physiology of fishes. Boca Raton: CRC Press, 2<sup>a</sup> ed., p.215-242, 1998.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. **Improved method for determination of erythrocyte glutathione.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 61.882, 1963.

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

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; SABIONI, R.E.; URBINATI, E.C. **Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, n.2, p.237-241, 2012.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*.** Brazilian Journal of Biology, v.73, n.2, p.425-429, 2014.

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.

BORGHETTI, J. R.; OSTRENSKY, A. **Pesca e aquicultura de água doce no Brasil.** In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo: Escrituras, cap. 13, p. 451-466, 1999.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. **Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura.** Acta Amazônica, v.36, n.3, p. 349-356, 2006.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. **Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.39, p. 357-362, 2004.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods of Enzymology v.52, p.302–310, 1978.

BURTON, G.W. AND INGOLD, K.U. **Autoxidation of biological molecules. I – The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro.** Journal of American Chemical Society v.103, p.6472-6477, 1981.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G. **Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability.** Annual Review of Nutrition v.10, p.357-382, 1990.

CAMPBELL, P.; POTTINGER, T. and SUMPTER, J. **Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout.** Aquaculture v.120(1-2), p.151-169, 1994.

CAMPBELL, P.; POTTINGER, T. and SUMPTER, J. **Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout.** Biology of Reproduction v.47(6), p.1140-1150, 1992.

CARMICHAEL, G.; TOMASSO, J.; SIMCO, B. and DAVIS, K. **Confinement and water quality-induced stress in largemouth bass.** Transactions of the American Fisheries Society, v.113(6), p767-777,1984.

CARRAGHER, J.; SUMPTER, J.; POTTINGER, T. and PICKERING, A. **The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta L.* and *Salmo gairdneri* Richardson.** General and Comparative Endocrinology, v.76(2), p.310-321,1989.

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.

CHELIKANI, P.; FITA. I.; LOEWEN, P. C.; **Diversity of structures and properties among catalase.** Cellular and Molecular Life Sciences, v.61, p. 192-208, 2004.

CHEN, R. G; LOCHMAN. R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K; DABROWSKI, K.; LEE, K. **Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*).** Aquaculture. v.242. n 1/4. p. 553-569, 2004.

CHO J.R.; KIM Y. J.; HONG K. J.; YOO J. K.; LEE J.O.; AHN Y. J.; CHO J.R.; KIM Y.J.; HONG K.J.; YOO J.K.; LEE J.O.; AHN Y.J. **Resistance monitoring and enzyme activity in field-collected populations of the spiraea aphid, *Aphis citricola* Van der Goot.** Journal of Asian Pacific Entomology, v. 2, p.113-119, 1999.

DANDAPAT, J.; CHAINY. G.B.N; RAO. K.J. **Dietary vitamin E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii***. Comparative Biochemistry Physiology v.127, p.111-115, 2000.

DU J, WANG Y.; HUNTER R, WEI Y.; BLUMENTHAL R, FALKE C.; KHAIROVA R, ZHOU R.; YUAN P, MACHADO-VIEIRA R, MCEWEN BS, MANJI HK. **Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids**. PNAS v.106, p.3543–3548, 2009.

ELLIS, A.E. **Immunity to bacteria in fish**. Fish & Shellfish Immunology, v.9, p.291– 308, 1999.

ELLIS, A.E. **Innate host defense mechanism of fish against virus and bacteria**. Development and Comparative Immunology, v.25, p.827-839, 2001.

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

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/423722/>>acesso em 05 de setembro de 2018.

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, **SOFA**. 2018.

FARIA, C. F. P. **Estresse e modulação do sistema antioxidativo pelo glutamato dietético em juvenis de pau *Piaractus mesopotamicus***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura – CAUNESP) – Centro de aquicultura da UNESP- Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 2017.

FAST, M.D.; SIMS, D.E.; BURKA, J.F.; MUSTAFA, A., ROSS, N.W. **Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon**. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology v.132, p.645-657, 2002.

FERNANDES, J. B.; CARNEIRO, D. J. SAKOMURA, N. K. **Sources and levels of crude protein in diets for pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fingerlings**. Revista Brasileira de Zootecnia. v. 29, P. 646-653, 2000.

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.

FLETCHER, T.C. **Dietary effects on stress and health**. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPETER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: University Press, p. 223-245, 1997.

GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRAIS, A. M. & KIRKMAN, H. N. **Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes**. Blood v.3, p.334-339, 1989.

GATLIN II, D. M. **Nutrition and dish health**. In: HALVE, J. E.; HARDY, W.H, (Ed) Fish Nutrition. San Diego, California, USA, Academic Press, v. 2, p. 672-703, 2002.

GATLIN, D. M.; BAI, S. C; ERICKSON, M. C. **Effects of dietary vitamin E and synthetic antioxidant on composition and storage quality on channel catfish *Ictalurus punctatus***. Aquaculture v.106, n.3/4, p.323-332,1992.

GOEDE, R.; BARTON, B. **Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition in fish**. American Fisheries Society, Symp. 8, Bethesda, pp.93-108,1990.

GONZALEZ-FLECHA, B.S.; REPETTO, M.; EVELSON, P.; BOVERIS, A. **Inhibition of microsomal lipid peroxidation by  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherol acetate**. Xenobiotica, v.21: 1013-1022,1991.

BOSHRA, H.; LI.;SUNYER, JO., **Recent advances on the complement system of teleost fish**, Fish & Shellfish Immunology. 239-262, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death**. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, v. 1. 851p, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press: UK. 2002

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2<sup>n</sup> ed., Oxford Clarendon Press. P. 469. 1990.

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

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

HALVER, J. E. **The vitamins**. In: HALVER, J. E; HARDY, R. W (Ed). Fish Nutrition. Third Edition, San Diego, California, USA. Academic Press. P. 61-81, 2002.

HARE. K.; **Metabolism, interactions requirements and functions of vitamin e in fish**. Aquaculture Nutrition, Oxford, v17, n1. p.672-703, 2011.

IBGE- **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da pecuária municipal. 2016.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. San Diego: Academic Press, 1996.

JENSEN, F.; NIELSEN, M.; NIELSEN, R. **Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth?** Fisheries Research, v. 159, p. 25-33, 2014.

JENSEN, F.; NIELSEN, M.; NIELSEN, R. **Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth?** Fisheries Research, v. 159, p. 25-33, 2014.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 309p, 1994.

JOBLING, M.; BAARDVIK, B. M.; CHRISTIANSEN, J. S.; JORGENSEN, E. H. **The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish**. Aquaculture International, v.1, p. 95-111, 1993.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCH, H. **Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E**. Medicina, v. 31, p. 434-449, 1998.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; SILVEIRA, S.; FIGUEIREDO, J. F.C.; VANNUCCHI, H. **Urinary ecretion and plasma vitamin E levels in patients with AIDS**. Nutrition 14, 423-426, 1998.

KOPPENHEFFER, T. L. **Serum complement system of ectothermic vertebrates**. Developmental & Comparative Immunology, v. 11, p. 279-286, 1987.

KOPPENHEFFER, T.L. **Serum complement system of ectothermic vertebrates**. Developmental & Comparative Immunology, v.11, p.279-286, 1987.

KOSHIO, S. **Vitamins**. In: NAKAGAWA, R.; SATO, M.; GATLIN III, D. M.; (Ed). Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. Trowbridge, United Kingdom; Crowell Press, p.35-46, 2007.

LAWRENCE, R. A.; BURK, R. F. **Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver**. Biochemical and Biophysical Research Communications. 71:952 – 958, 1976.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. **Study of lysozyme activity in some fish species**. Disease Aquatic Organism, v. 6, p. 1-5, 1989.

LUSHCHAK, V.I. **Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach**. Fish Physiology Biochemistry. 42(2):711-747, 2016.

MAGNADOTTIR, B. **Innate immunity of fish (overview)**. Fish & Shellfish Immunology. 20, 137–151, 2006.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. **Primary and secondary effects of stress in fish**. Transactions of the American Fisheries Society, 106: 201-212, 1977.

MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocytin)**. The Journal of Biological Chemistry. 244 (22), 6049–6055, 1969.

MOBERG, G. **Animal stress**. Baltimore: Waverly Press. 1985.

MOCK, A.; PETERS, G. **Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution.** Journal of Fish Biology, v.37, p.873-885, 1990.

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

MONTERO, D.; GRASSO, V. IZQUIERDO, M, S. GANGA, R.; REA, F.; TORT, L.; CABALLERO, M. J.; ACOSTA, F. **Total substration of fish oil by vegetable in gilthead parameters.** Fish & Shellfish Immunology, London, v.24, n2, p. 147-155, 2008.

MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. **The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues.** Journal of Fish Biology, v.9, p.329-334, 1976.

NEYRÃO, I. M. **Mediação de respostas imunes e do sistema de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Dissertação (Mestrado em Aquicultura – CAUNESP) – Centro de aquicultura da UNESP-Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 2017.

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.

NRC. **Nutrient requeriments of fish and shrimp.** Washignton, D.C; Natiiona Academics Press, 376p, 2011.

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

OOHARA, I.; AKIYAMA, T.; AONO, H. **Distribution and interorganic correlations of lysozyme activity in the juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*.** Bulletin of National Research Institute of Aquaculture, v.19, p.17- 26, 1991.

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. 127, p. 291-296, 2000.

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

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. **A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1).** Clinica Chimica Acta. 293, 157-166, 2000.

PETERS, G. **The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L.** Journal of Fish Biology, 21(5), pp.497-512, 1982.

- PETRERE JR, JR. M. **River fisheries in Brazil: a review.** Regulated Rivers: Research and Management, v.4, p.1-16, 1989.
- PICKERING, A. AND POTTINGER, T. **Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout, *Salmo trutta* L.** Journal of Fish Biology, 30(1), pp.41-50,1987.
- PICKERING, A. AND STEWART, A. **Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress.** Journal of Fish Biology v.24(6), p.731-740, 1984.
- POHLENZ, C.; GATLIN III. D.M.; **Interrelationships between fish nutrition and health.** Aquaculture v.41, n.15, p. 111-111, 2014.
- QUINN, P. J.; WANG, X. **Vitamin E and its function in membranes.** Progress in Lipid Research v. 38, p. 309-336, 1999.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** Química Nova v.29, n.4, 755-760, 2006.
- ROED, K.H.; FJALESTAD, K.; LARSEN, H.J.; MIDTHJEL, L. **Genetic variation in haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** Journal of Fish Biology v.40, p.739-750, 1992.
- RUS, H; CUDRICI, C.; NICULESCU, F. **The role of the complement system in innate immunity.** Immunology Research; v.33, p.103-12, 2005.
- RUTZ, F. **Absorção de vitaminas.** 2008. In: Macari, M.; Furlan, R.L. e Gonzales, E. Fisiologia aviária: aplicada a frangos de corte. 2ª ed. FUNEP/ UNESP. Jaboticabal. pp. 149-165, 2008.
- SAURABH, S.; SAHOO, P.K **Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system,** Aquac. Res. 223 e 239, 2008.
- SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; RIZWANUL, H.; RAISUDDIN, S. **Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Chama punctatus* Bloch.** Ecotoxicology Environmental 56, 295-301, 2003.
- 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, 2000.
- SCHRECK, C. B; TORT, L. **The concept of stress in fish.** In Schreck, C. B; Tort, L.; Farrell, A.; Brauner, C. Biology of stress in fish: v. 35 – Fish Physiology, p. 1-34, 2016.
- SECOMBES, C.J. **The nonspecific immune system: cellular defenses.** In: IWAMA, G; SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E.1949. THE DETERMINATION OF LYSOZYME. Journal of Bacteriology, V.58, p.731-736, 1996.

SECOMBES, C.J. **The nonspecific immune system: cellular defenses.** In: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). *The fish immune system.* London: Academic Press. p.95-103, 1996

SELYE, H. **A syndrome produced by diverse nocuous agents.** *Nature.* v. 138 p.32-32, 1936.

SHIELDS, G.; SAZMA, M.; YONELINAS, A. **The effects of acute stress on core executive functions: A meta-analysis and comparison with cortisol.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews,* 68, p.651-668, 2016.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIOUS, P.H.; LIM, C. **Immunity and Disease Resistance in Fish.** In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. *Nutrition and Fish Health.* New York: Food Products Press, p.149-162, 2001.

SLATER, T. F.; BENEDETTO, C.; BURTON, G. W.; CHEESEMAN, K. H.; INGOLD, K. U.; NODES, J. T. **In icosanoids and cancer** (THALER-DAO, H., CRASTES DE PAULET, A. & PAOLETTI, R., EDS.), p. 21-29, RAVEN PRESS, NEW YORK. 1984.

SMALL, B. **Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish.** *Journal of Fish Biology,* 64(3), p.589-596, 2004.

SNIESZKO, S. **The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes.** *Journal of Fish Biology,* 6(2), p.197-208, 1974.

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

TRICHET, V. V. **Nutrition and immunity: an update.** *Aquaculture Research.* v.41, p. 356-372, 2010.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. **Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities.** *Aquaculture* 229: 389-400, 2004.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D.; TAKAHASHI, L.S. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** In: Baldisserotto, B., de Carvalho Gomes, L. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil.* 2ª edição revisada e ampliada. Editora UFSM, Santa Maria, p. 205–244, 2013.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D. **Estresse e sistema imune em peixes.** In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce.* Jaboticabal: FUNEP, p.87-105, 2013.

URBINATI, E.C; CARNEIRO, P.C.F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.** In: CYRINO, J.E.P; URBINATI, E.C. et al (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.* São Paulo: TecArt cap. 6, p171-194, 2004.

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, n. 2, p. 57-149, 2003.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on Fish Health**. Roche Technical Bulletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 p, 1997.

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

VIJAYAN, M.M.; BALLANTYNE, J.S; LEATHERLAND, J. F. **High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis***. Aquaculture, v.88, p.371-381, 1990.

VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. **Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol**. Comparative Biochemistry and Physiology 116C, 89-95, 1997.

WEBSTER, C. D; LIM, C. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. New York, USA: CABI Pub., p. 418, 2002.

WEDEMEYER, G. **The role of stress in the disease resistance of fishes**. American Fisheries Society, 5, p.30-35, 1970.

WENDERLAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish**. Physiological Reviews, Washington, v. 77, n. 4, p. 591-625, 1997.

ZHANG, J. F.; WANG, X.R.; GUO, H.Y.; WU, J.C.; XUE, Y.Q. **Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus***. Ecotoxicology and Environmental Safety v.58(1), 110–116, 2004.

ZINGG, J. M. Vitamin E: **Na overview of major research directions**. Molecular Aspects of Medicine, Oxford, v28, n5/6, p.400-422,2007.

## **CAPÍTULO II**

### **Suplementação dietética com vitamina E: variáveis fisiológicas e avaliação do sistema antioxidante de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da vitamina E (dLatoferol) nas respostas de estresse (cortisol e glicose), do sistema imune inato (atividade respiratória dos leucócitos, sistema complemento e lisozima) e do sistema de defesa antioxidante (catalase (CAT), glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona S-transferase (GST) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Um total de 240 juvenis de pacu foi distribuído aleatoriamente em 24 caixas d'água, cada caixa com 10 exemplares. Após período de aclimação dos peixes às condições experimentais, eles foram alimentados por 30 dias com três diferentes concentrações de vitamina E que constituíram 3 tratamentos: 1) ração comercial sem suplementação de vitamina E; 2) ração comercial suplementada com 150 mg de vitamina E/kg; 3) ração comercial suplementada 500 mg de vitamina E/kg de ração, onde metade foi submetido a estressor crônico no período de 30 dias (perseguido com puçá por 5 minutos duas vezes ao dia) (4 repetições/caixas por tratamento). E outra metade dos peixes (4 repetições/caixas por tratamento) foi mantida sem manipulação pelo período de alimentação. Após o período de alimentação, peixes de cada tratamento foram amostrados para caracterizar a amostragem inicial. Os peixes restantes foram expostos a um estressor (5 minutos de perseguição com puçá) e amostrados em três tempos (1, 6 e 24 h depois do estressor). Nas amostragens foram coletados sangue e fígado. No sangue foram analisados os indicadores de estresse (concentração plasmática de cortisol e glicose) e indicadores da imunidade inata (atividade respiratória dos leucócitos, atividade do sistema complemento e concentração da lisozima no soro) e indicadores do sistema de defesa antioxidante no fígado catalase (CAT); glutathiona S-transferase (GST); glutathiona reduzida (GSH). A vitamina E influenciou na glicose ao longo das amostragens, e em peixes não manipulados a elevação foi maior nos que receberam alimentação com 150mg de vitamina. A atividade respiratória de leucócitos teve elevação reduzida nos peixes que receberam a ração suplementada. A concentração sérica da lisozima não diferiu em ambas as condições, tanto nos peixes com estresse crônico quanto os que sofreram estresse agudo e a atividade hemolítica do sistema complemento aumentou 24h depois do estressor agudo em todos os grupos, nas duas condições.

**Palavras-chave:** Estresse, sistema antioxidante, sistema imune e dLatoferol.

## ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of vitamin E (dLatoferol) on stress responses (glucose and cortisol and glucose), the innate immune system (leukocyte respiratory activity, complement system and lysozyme) and the antioxidant defense system catalase (CAT), reduced glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A total of 240 juveniles of pacu were distributed randomly in 24 boxes of water, each box with 10 specimens. After a period of acclimation of the fish to the experimental conditions, they were fed for 30 days with three different diets that constituted 3 treatments: 1) commercial diet without vitamin E supplementation; 2) commercial feed supplemented with 150 mg vitamin E / kg; 3) commercial diet supplemented 500 mg of vitamin E / kg of feed where half was submitted to chronic stressor in the period of 30 days (pursued with puçá for 5 minutes twice a day) (4 replicates / boxes per treatment). And another half of the fish (4 replicates / boxes per treatment) was maintained without manipulation by the feeding period. After the feeding period, fish from each treatment were sampled to characterize the initial sampling the remaining fish were exposed to a stressor (5 minutes of chase with puçá) and sampled in three times (1, 6 and 24 h after the stressor). Samples of blood and liver were collected. In the blood, stress indicators (plasma cortisol and glucose concentration) and indicators of innate immunity (leukocyte respiratory activity, complement system activity and serum lysozyme concentration) and indicators of the antioxidant defense system in the liver catalase (CAT); glutathione S-transferase (GST); reduced glutathione (GSH). Vitamin E influenced glucose throughout the samplings, and in unmanipulated fish the elevation was higher in those fed with 150mg of vitamin. The leukocyte respiratory activity had a reduced elevation in the fish that received the supplemented feed. The serum concentration of lysozyme did not differ in both conditions, both in fish with chronic stress and those who suffered acute stress and the hemolytic activity of the complement system increased 24 hours after the acute stressor in all groups, under both conditions.

**Key- words:** Stress, antioxidant system, immune system, and dLatoferol.

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é considerada o setor de produção que mais cresce no mundo (Jensen, Nielsen e Nielsen, 2014), para o futuro, o setor continuará apresentando boas perspectivas (FAO, 2018).

O manejo é um agente estressor que ativa uma sequência de respostas fisiológicas denominadas como estresse (Urbinati e Carneiro, 2004). Se a condição estressante perdurar, pode ultrapassar a capacidade adaptativa do organismo, e o direcionamento da energia para órgãos vitais diminui o aporte para atividades como processo reprodutivo, crescimento e função imune (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999). A função imune torna-se deficiente e a imunossupressão expõe os peixes aos patógenos do meio, favorecendo a incidência de doenças, o que pode levar os animais a morte.

O sistema imune dos peixes é formado por elementos humorais e celulares e é dividido em dois componentes: o inato (não específico), que funciona como o primeiro mecanismo de defesa contra infecções, e o adaptativo (específico) (Bernstein *et al.*, 1998; Secombes e Wang, 2012). Alterações no perfil das células e dos componentes humorais do sistema imune inato, decorrentes de estresse, comprometem a defesa do animal facilitando a infecção por microrganismos patogênicos (Cerezuela et al., 2012; Telli *et al.*, 2014). Neste caso, os imunostimulantes podem representar uma ferramenta estratégica antes de manejos estressantes, proporcionando melhores condições de defesa aos peixes (Raa, 2000).

Por outro lado, estudos sugerem que dependendo das concentrações de cortisol e do tempo de exposição, ocorre ativação ou redução das atividades da mitocôndria (Du et al., 2009; Aschbacher et al., 2013). Ambos os tipos de respostas são característicos de condição de alta demanda energética e de metabolismo aeróbico exacerbado, e durante esse processo são formadas diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs) (Oga, 2003).

As EROs são átomos, moléculas ou íons que possuem um ou mais elétrons não pareados nos orbitais mais externas, o que os tornam extremamente reativos, podendo combinar-se de maneira inespecífica com moléculas que integram estruturas celulares, como proteínas, lipídios, DNA entre outros e, então ocorrem reações em cadeia que podem culminar em lesão, e até mesmo morte celular (Slater, 1984; Halliwell, 1986; Jordão Junior et al., 1998;

Halliwell e Gutteridge, 2000; Nordberg e Arner, 2001). De modo a evitar o estresse oxidativo, faz-se necessário o uso de antioxidantes

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, o primário que inibe de maneira preventiva e retarda a geração de EROs ou rouba estas espécies, impedindo proximidade com os alvos celulares e secundário que bloqueia a etapa de propagação da cadeia radicalar e remove, de maneira efetiva, radicais como o peróxil ou alcóxil.

Os peixes também são susceptíveis ao ataque das EROs produzidas pelo metabolismo aeróbio e apresentam sistemas antioxidantes de defesa, 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 extensa maioria das pesquisas tem como foco as modificações do sistema antioxidante frente a exposição dos peixes a poluentes ambientais (Van Deroost, 2003; Lushchak, 2016), mas pouco se sabe da relação do sistema antioxidante dos peixes em relação às respostas de estresse (Faria, 2017; Neyrão, 2017).

Dentre os micronutrientes, a vitamina E é o mais importante antioxidante metabólico presente na membrana celular, protegendo-a da oxidação de ácidos graxos, além de diminuir ou inibir a produção e ação dos radicais livres. Como o efeito da vitamina E sobre a formação de peróxido é limitado primariamente a membrana, ela é necessária para a eliminação eficiente dos peróxidos, constitui um dos principais antioxidantes no organismo (Noguchi, 1973).

Com base no exposto, o presente trabalho investigou os efeitos da vitamina E, com diferentes níveis de inclusão, na resposta de estresse, no sistema imune e sistema antioxidante em juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estressores crônico e agudo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº 018861/17, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP- Jaboticabal.

### **2.1 Rações experimentais**

As dietas foram preparadas pela moagem de ração comercial extrusada (24% PB e 3.600 kcal EB/kg) à qual foi adicionado níveis de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol com 50% de atividade) de cada condição alimentar (150 mg vitamina E/kg de ração e 500 mg vitamina E/kg de ração). Os ingredientes foram pesados, homogeneizados e peletizados na Fábrica de Rações do Centro de Aquicultura da UNESP e secas por 24 horas. A ração controle não foi suplementada, apresentando 100mg vitamina E/kg de ração, segundo especificação do fabricante.

### **2.2 Animais e protocolo experimental**

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Peixes, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, campus Jaboticabal. Foram utilizados 240 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ( $92,29 \pm 13,59$ g e  $16,21 \pm 1,39$  cm), fornecidos pelo Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Os peixes foram mantidos em vinte e quatro caixas de polietileno de 100L (10 peixes/caixa), com renovação constante de água e aeração suplementar. O fotoperíodo foi de 12h luz/12h escuro. Durante trinta dias, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (8:00 e 16:00) com 3% do peso vivo.

Após sete dias de adaptação às condições do laboratório, sendo alimentados com a ração controle, os peixes foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em três tratamentos de acordo com os níveis de inclusão de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol com 50% de atividade) sendo: Tratamento 1: Dieta sem suplementação de vitamina E; Tratamento 2: Dieta com

suplementação de 150 mg vitamina E/kg de ração e Tratamento 3: Dieta com suplementação de 500 mg vitamina E/kg de ração. Cada tratamento teve quatro réplicas, com 10 peixes por réplica (40 peixes/tratamento).



**Fig 1.** Delineamento experimental

Fonte: Raissa de Cássia Pinheiro Ribeiro, 2018.

Em cada tratamento, peixes de quatro caixas foram mantidos sem manipulação (sem agente estressor) durante o período experimental, enquanto os das outras caixas foram manipulados, expostos à estresse crônico, sendo os animais perseguidos com um puçá duas vezes ao dia (10:00 e 18:00) por cinco minutos. Ao final dos 30 dias, após 24 horas sem alimento, dois peixes de cada caixa (n=8), de todos os tratamentos, nas duas condições de manipulação, foram amostrados para caracterizar a amostragem inicial, e os restantes foram submetidos a perseguição com puçá por cinco minutos. Os previamente manipulados caracterizaram o grupo Estressor crônico e não manipulados o grupo Estressor agudo. Após a manipulação, os peixes foram amostrados 1,6 e 24 horas. Durante o período experimental, a água das caixas apresentou temperatura de  $30 \pm 0.26$  °C e concentração de oxigênio dissolvido de  $4.95 \pm 0.44$  mg/L.

### 2.3 Coletas e análises laboratoriais

Em cada amostragem, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (50mg/L) e o sangue retirado por punção de vasos caudais, e separado em microtubos que continham ou não anticoagulante (tubos de ensaio). Em seguida, os peixes foram eutanasiados com sobre dose de anestésico para a retirada de amostras do fígado, que foram mantidas a -80 °C.

### **2.3.1 Análise de indicadores de estresse**

#### **2.3.1.1 Concentração plasmática de cortisol e glicose**

Do sangue total colocado em microtubos com EDTA fluoretado (Glistab - Labtest) e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, foi extraído plasma para quantificação da concentração de cortisol e glicose. Para determinação do cortisol, foi utilizado um kit comercial (DRG (Cortisol ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – 1887), baseado em ligação competitiva, em que anticorpos presentes nas microplacas se ligam a um sítio antigênico na molécula de cortisol. Para determinação da glicose, foi utilizado um kit comercial (Labtest Ref.133), baseado na catálise da oxidação da glicose pela glicose oxidase, formando peróxido de hidrogênio, através de uma reação oxidativa de acoplamento, resultando em uma coloração rosa.

### **2.3.2 Análise de indicadores imunológicos**

#### **2.3.2.1 Atividade respiratória de leucócitos**

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller-Takahashi et al. (2013). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante “nitroblue tetrazolium” (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). Para a análise da produção das EROs, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação, 50 µL da suspensão foi adicionada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugada a 3000 g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, que lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de formazan, liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

Parte do sangue foi mantida à ambiente refrigerado por três horas e centrifugada (10 min. a 3000 g), para separação do soro, que foi armazenado a

-80° C até determinação da concentração de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento.

#### 2.3.2.2 Atividade do sistema complemento

A atividade hemolítica do sistema complemento foi determinada de acordo com Ferriani *et al.* (1990) e Polhill *et al.* (1978) e adaptada por Zanuzzo *et al.* (2015). Para tanto, foi determinado cineticamente o tempo necessário para as proteínas do sistema complemento de cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para preparação desta solução, amostras de sangue de coelho foram misturadas em uma solução de Alséver (pH 6.1) para lavagem e separação das células. A mistura foi incubada por 15 minutos em banho maria a 37°C e centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm por três vezes. O sobrenadante foi descartado e as hemácias ressuspendidas em TEA – Mg<sup>2+</sup>. Em cubeta de 1 mL foram pipetados 75 µL de soro, 125 de tampão TEA – EGTA /Mg<sup>2+</sup>/gelatina 0,1% e 400 µL da suspensão de hemácias. As leituras foram realizadas a cada 20 segundos, durante 20 minutos a 700 nm, em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV -Vis.

#### 2.3.2.3 Determinação da atividade de lisozima

A concentração de lisozima foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Smolelis e Hartsell (1949) modificada por Zanuzzo *et al.* (2015), na qual a bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* é lisada. Para a determinação, 25 µL de soro de pacu (em duplicata) foram colocados em microplacas, seguido da adição de 75 µL de tampão fosfato de sódio e de 100 µL de suspensão de *M. lysodeikticus*. A redução da densidade óptica da solução foi medida em comprimento de onda de 450 nm, a cada cinco minutos durante dez minutos (inicial, 5 e 10 min.), utilizando um leitor de microplacas (ThermoPlate Reader MN). A atividade da enzima foi calculada pela fórmula: UA = ([lisozima]/0,001) /10.

### **2.3.3 Análise de indicadores do sistema antioxidante**

As amostras de fígado congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram utilizadas para determinação das concentrações de proteínas, atividade das enzimas Catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) e para a determinação das concentrações de glutathione reduzida (GSH). As amostras foram pesadas e homogeneizadas com homogeneizador turrax, em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0 (10 vezes o volume do peso do fígado), e então centrifugadas, durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e 13.000 rpm. O sobrenadante foi separado para as análises.

#### 2.3.3.1 Concentrações de proteínas hepáticas

A concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), no qual se utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" G-250. É baseado na interação entre o corante G-250 e macromoléculas de proteínas e utiliza a albumina do soro bovino (BSA) como padrão. O reagente azul brilhante de Coomassie causa mudança de coloração para tons de azul conforme a concentração de proteínas, e a densidade óptica da solução é lida em 595 nm.

#### 2.3.3.2 Atividade da glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Keen et al., (1976), seguindo-se a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB), em 340 nm e expressa em nmol/min/mg de proteína hepática.

#### 2.3.3.3 Atividade da glutathione reduzida (GSH)

A glutathione reduzida (GSH) foi determinada de acordo com a técnica de Beutler (1963), e o princípio da técnica se baseia na reação da glutathione com o DNTB, formando um tiolato (TNB) de cor amarelada. Quanto maior a presença de GSH, mais acentuada a cor. Leitura em 405 nm e expressa em nmol/mg de proteína hepática.

#### 2.3.3.4 Atividade da catalase (CAT)

A catalase foi determinada de acordo com a técnica de Beutler (1975), o princípio do método consiste em catalisar a decomposição rápida do peróxido de hidrogênio em moléculas menos reativas de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pela CAT, observado pelo decaimento da absorvância ao longo do tempo, a 240nm.

### **2.4 Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (2 condições x 3 dietas x 4 períodos), sendo duas condições de estresse (agudo e crônico), três níveis de vitamina E (0,100 e 500 mg/kg) e quatro períodos de coletas (0,1,6 e 24 horas). Com as premissas satisfeitas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste Tukey ( $p < 0,05$ ) pelo software SAS 9.0.

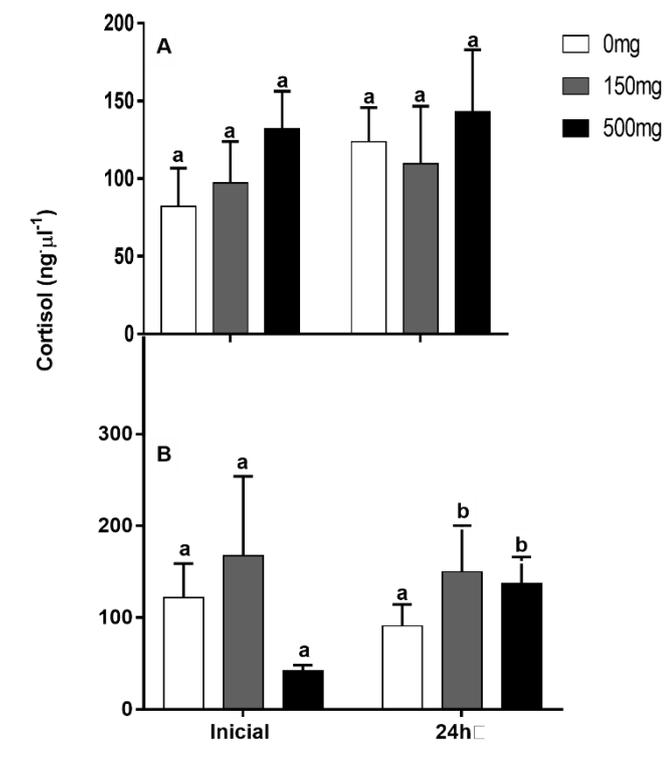
### 3. RESULTADOS

Para avaliar o efeito da suplementação de vitamina E nas respostas de estresse, no sistema imune inato e no sistema antioxidante, nós oferecemos ração suplementada com a vitamina por 30 dias a juvenis de pacu e submetemos os peixes a estressores agudo e crônico. Nós avaliamos, então, as concentrações plasmáticas de cortisol e glicose, a atividade respiratória de leucócitos, atividade do sistema complemento – via alternativa, atividade sérica de lisozima, e a atividade das enzimas hepáticas glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT) e a concentração da glutathione reduzida (GSH). Durante o período experimental, não houve mortalidade de peixes em nenhum dos grupos testados.

#### 3.1 Indicadores de estresse

##### 3.1.1. Concentrações plasmáticas de cortisol

Observamos perfis distintos das concentrações de cortisol nas condições de exposição a estressores estudadas. Na condição A, em que os peixes não foram manipulados durante os 30 dias de alimentação com as dietas experimentais, não observamos alteração significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos de peixes nas duas amostragens (inicial e 24 h depois de um estressor agudo) (Fig. 2 A). Nos peixes que foram manipulados durante 30 dias, observamos que os valores foram encontrados nos peixes que receberam 500mg vit E/kg ( $p < 0,05$ ) estavam reduzidos em relação aos peixes dos outros grupos (Fig. 1 B), enquanto um dia depois não havia diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



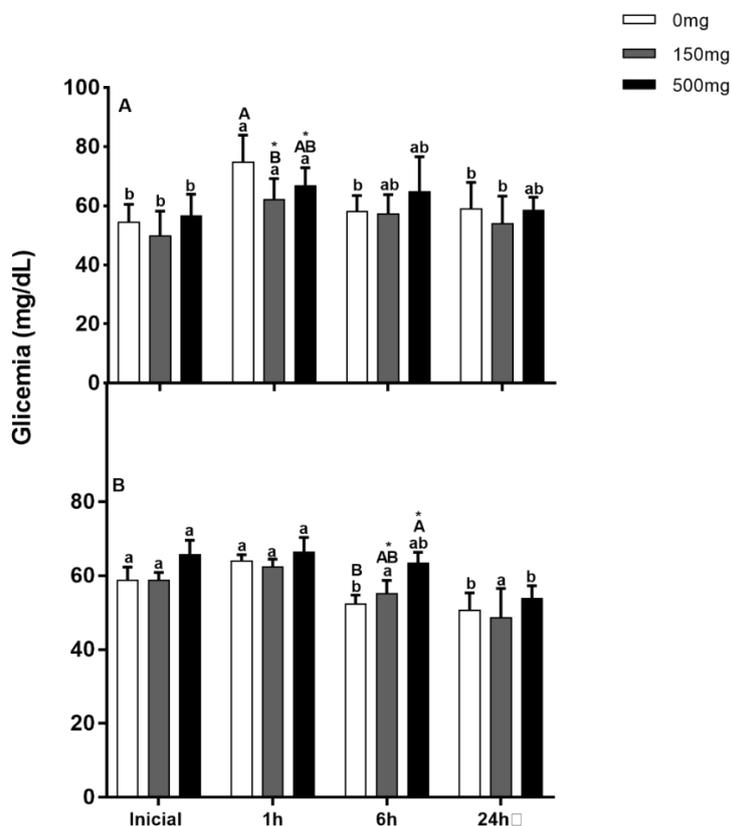
**Fig. 2** Concentração plasmática de cortisol de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes do estressor e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estressor prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estressor crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica falta de diferença estatística.

### 3.1.2. Concentrações plasmáticas de glicose

A concentração plasmática de glicose aumentou uma hora após o estressor, apenas nos peixes não manipulados anteriormente (Fig. 3 A e B) e a elevação foi menor nos peixes que receberam 150mg de vitamina E ( $p < 0,05$ ). Nos peixes que foram estressados diariamente, durante 30 dias, as concentrações de glicose foram menores que os valores iniciais, em todos os grupos, às 24 h ( $p < 0,05$ ). Essa redução foi observada às 6h apenas no grupo controle.

Comparando o perfil da glicemia nos peixes das duas condições, observamos valores mais elevados, 1 h após exposição ao estressor, nos peixes que não manipulados anteriormente, que receberam 150 e 500mg de vitamina E. Observamos também que às 6h, a glicemia nos peixes expostos a estressor

crônico e que receberam as duas concentrações de vitamina são mais elevadas ( $p < 0,05$ ).

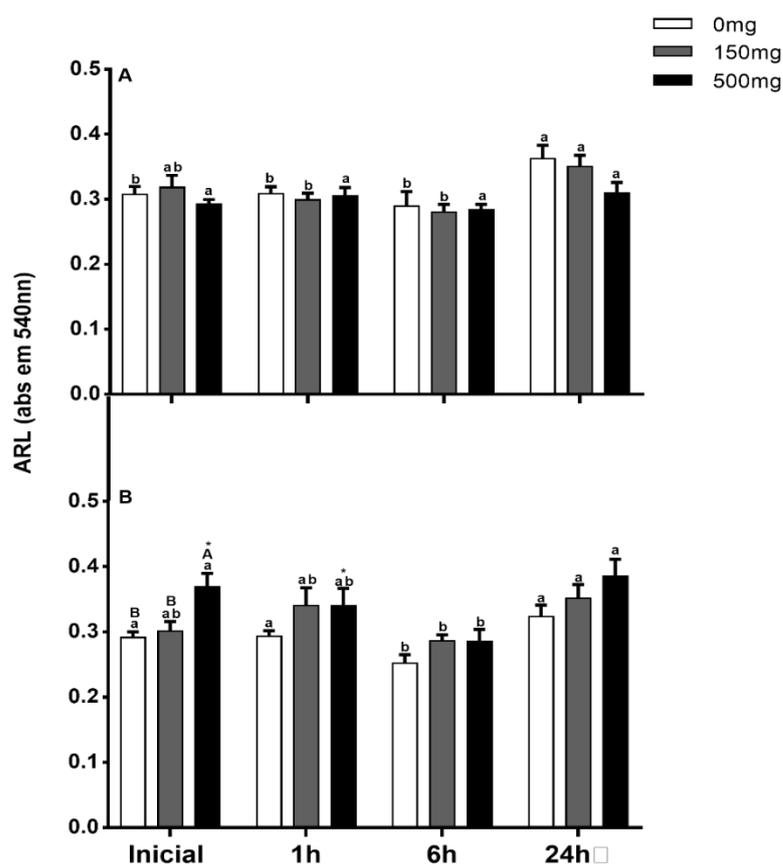


**Fig. 3** Concentração plasmática de glicose de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes do estressor e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estressor prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estressor crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica falta de diferença estatística.

### 3.2 Indicadores de imunidade inata

#### 3.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

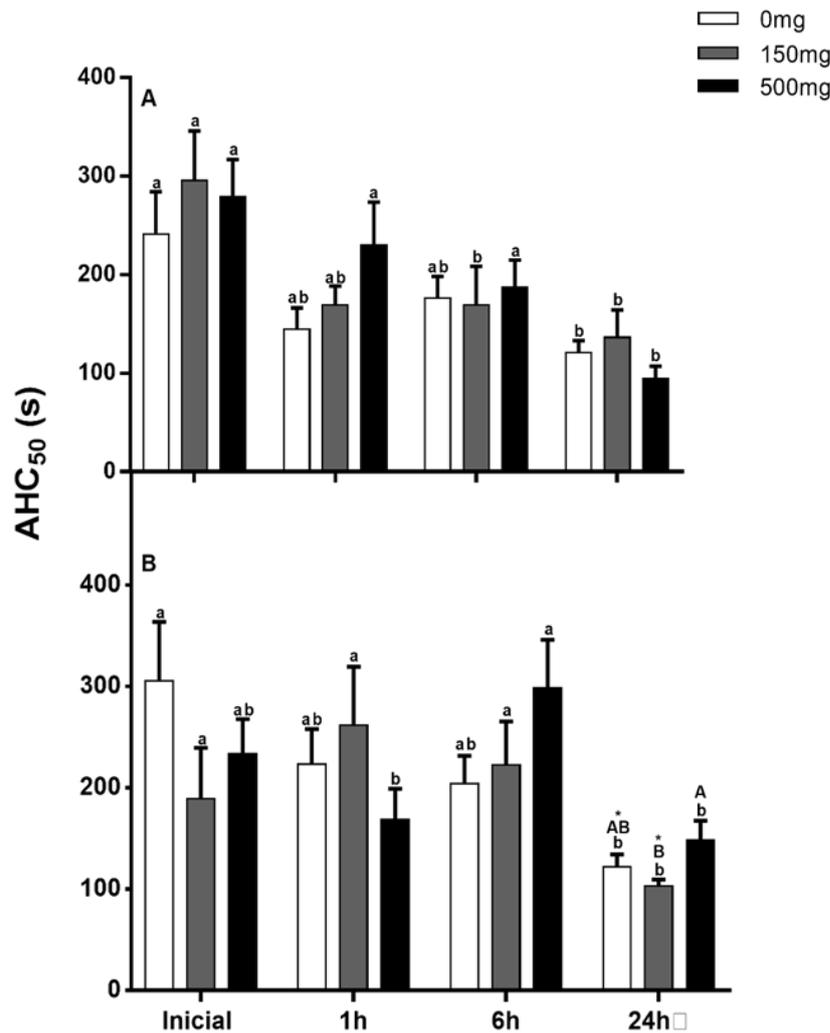
A ARL aumentou 24h depois do estressor agudo, nos peixes controle que não foram previamente manipulados e a elevação foi reduzida nos peixes que receberam suplementação de vitamina E (Fig. 4 A e B). Nos peixes cronicamente manipulados, na amostragem inicial, a ARL estava mais elevada nos peixes que receberam 500 mg ( $p < 0,05$ ) e reduziu em todos os grupos 6 h após exposição ao estressor agudo. Comparando os valores de ARL obtidos nas duas condições de estresse, observamos valores mais elevados nos peixes que receberam 500 mg de vitamina E ( $p < 0,05$ ) na amostragem inicial e uma hora após estressor.



**Fig. 4** Atividade respiratória de leucócitos (ARL) de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estresse prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estresse crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica a falta de diferença estatística.

### 3.2.2 Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC<sub>50</sub>)

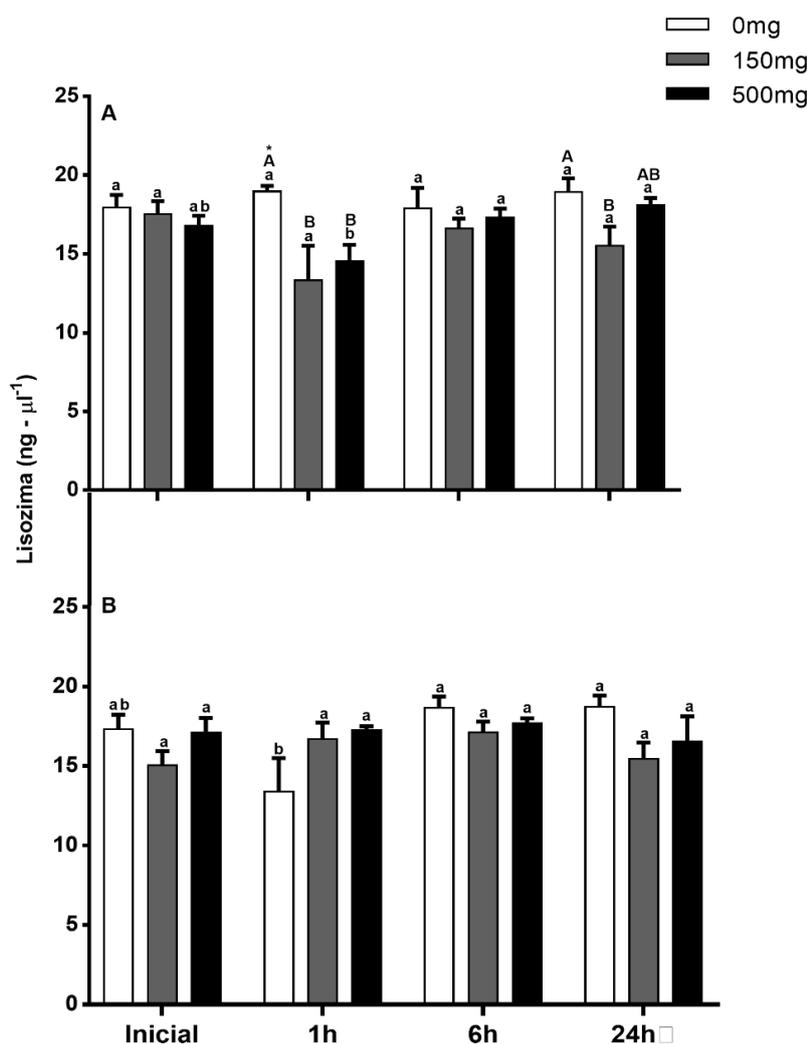
A AHC<sub>50</sub> aumentou (menor tempo) 24 h depois do estressor em todos os grupos, nas duas condições (A e B), sendo que a maior ativação foi observada nos peixes que receberam 150mg de vitamina E ( $p < 0,05$ ) (Fig.5 A e B). Observamos alta variação entre os valores das médias que interferiram na significância.



**Fig 5.** Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estresse prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estresse crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica a falta de diferença estatística.

### 3.2.3 Concentração sérica da lisozima

A concentração sérica de lisozima reduziu nos peixes que receberam 150 e 500 mg de vitamina E 1h depois do estressor agudo nos peixes que não foram expostos a estresse durante 30 dias ( $p < 0.05$ ). Comparando os valores da concentração sérica de lisozima nas duas condições, observamos valores mais elevados nos peixes que não foram suplementados na amostragem inicial e 1h após o estressor ( $p < 0,05$ ).

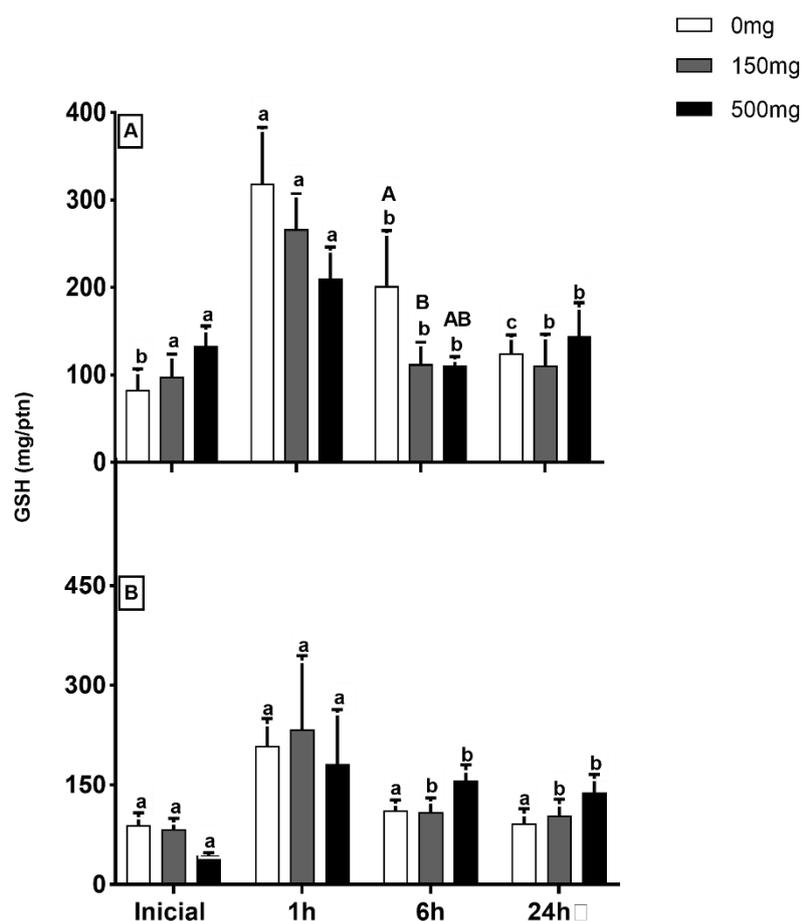


**Fig. 6.** Concentração sérica de lisozima de pacus de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol) antes e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estresse prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estresse crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica a falta de diferença estatística.

### 3.3 Indicadores do sistema antioxidante

#### 3.3.1 Atividade da glutathiona reduzida (GSH)

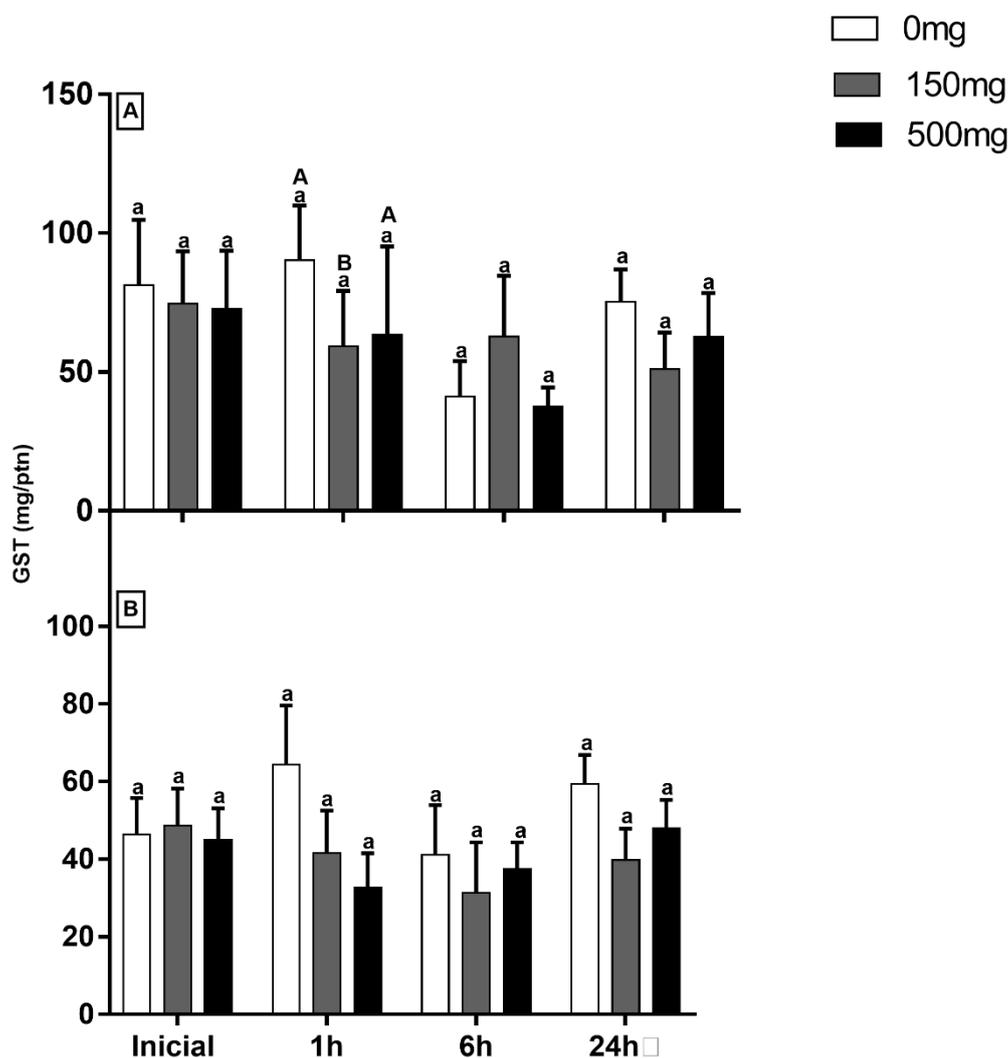
A glutathiona reduzida (GSH) teve sua atividade em ambas condições de estresse. Nos peixes que não foram manipulados durante o período experimental os valores são mais elevados 1h após o estressor ( $p < 0,05$ ). Observamos valores significativamente maior para os peixes alimentados com 150 e 500 mg de vitamina E em ambas as condições de estresse ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 7** Atividade da glutathiona reduzida (GSH) de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes do estressor e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estressor prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estressor crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica falta de diferença estatística.

### 3.3.2 Atividade da glutatona S-transferase (GST)

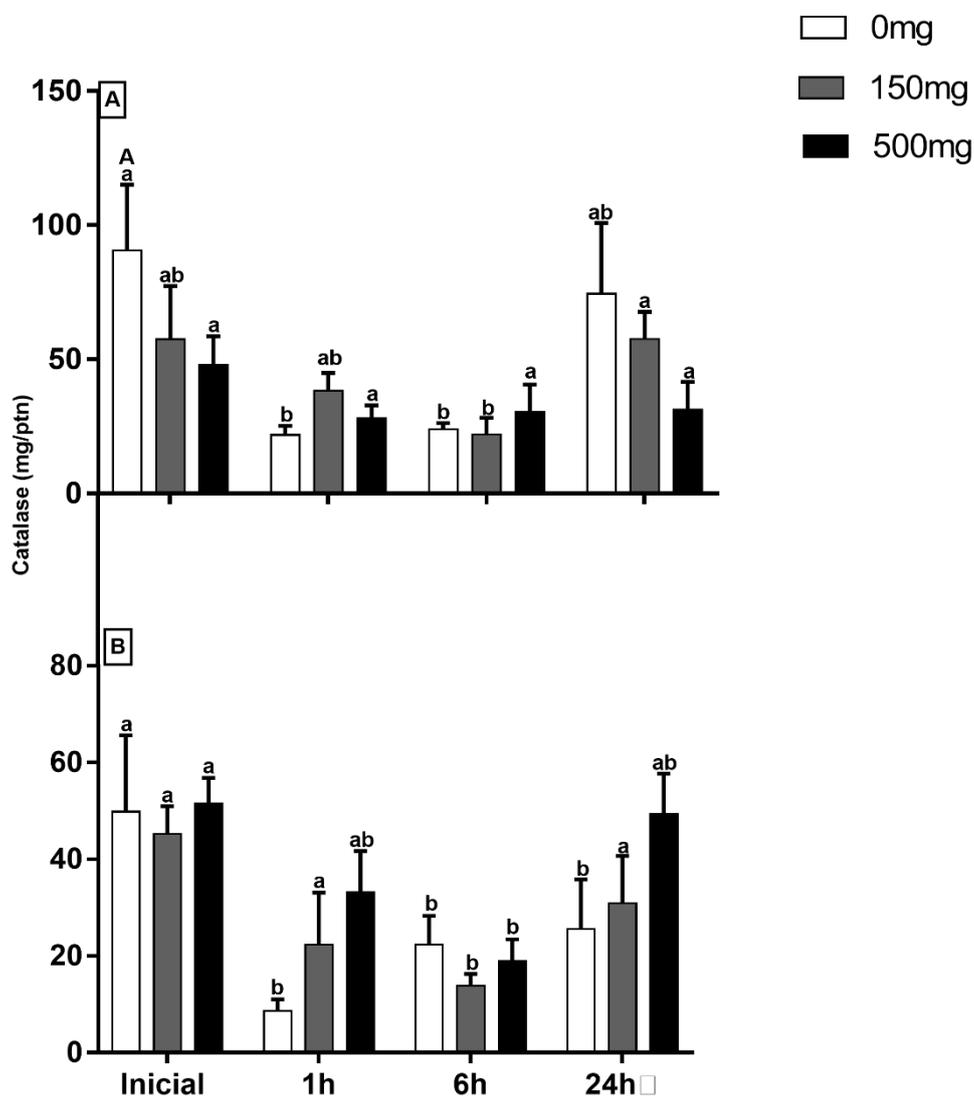
A glutatona-S-transferase (GST) não diferiu em ambas as condições, tanto nos peixes que sofreram estresse agudo quanto os que sofreram crônico ( $p>0,05$ ) (Fig. 8 A e B), exceto por uma diferença quanto ao estresse nos peixes, 1 h depois do estressor agudo.



**Fig. 8** Atividade da glutatona-S-transferase (GST) de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes do estressor e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estressor prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estressor crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p<0,05$ ). Ausência de símbolo indica a falta de diferença estatística.

### 3.3.3 Atividade da catalase (CAT)

A catalase (CAT) teve sua atividade em ambas condições de estresse ( $p < 0,05$ ). Nos peixes que não foram manipulados durante o período experimental os valores são mais elevados 1h após o estressor. Observamos valores significativamente maior para os peixes alimentados com 150 e 500 mg de vitamina E em ambas as condições de estresse ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 9** Atividade da catalase (CAT) de pacus alimentados com dietas contendo 0mg, 150mg e 500mg de vitamina E (dL- $\alpha$ -tocoferol), antes do estressor e 24h após estressor agudo. (A) peixes sem estressor prévio expostos a estressor agudo e (B) peixes sob estressor crônico por 30 dias. Letras minúsculas indicam diferença entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento, letras maiúsculas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo tempo e o asterisco diferença na condição de estresse (A com B) ( $p < 0,05$ ). Ausência de símbolo indica a falta de diferença estatística.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, nós investigamos o uso oral da vitamina E como estratégia para modular respostas de estresse, da imunidade inata e do sistema antioxidante de pacus expostos a estresse agudo, crônico e agudo depois de uma condição crônica. Estressores na aquicultura são inevitáveis, com caráter agudo e crônico, e o objetivo fundamental para o sucesso da produção é reduzir esses efeitos. Estressores que parecem insignificantes, como por exemplo, transporte, temperatura, manejo, a que esses animais estão submetidos podem ter efeitos que venha comprometer na saúde dos mesmos (Shreck, 2016).

No presente estudo o cortisol plasmático e a concentração plasmática de glicose foram medidos. A resposta de estresse inclui elevação das concentrações sanguíneas de cortisol e glicose após a exposição ao estressor (Barton, 2002). A análise do perfil do cortisol foi prejudicada por termos apenas análise 24 h depois do estressor, mas é possível observar, em condições de estresse crônico, que a vitamina E modulou a resposta do hormônio, reduzindo-a na amostragem inicial, sugerindo um efeito protetor da vitamina. Sob estresse repetitivo, “gilthead seabream” (*Sparus aurata*) alimentado com dieta deficiente em vitamina E mostrou elevação mais rápida dos níveis de cortisol em resposta ao estresse que os peixes controle (Montero et al., 2001).

No caso da glicose plasmática, nos peixes sem prévia manipulação, houve elevação da glicemia uma hora depois do estressor, sendo menor nos animais que receberam 150 mg da vitamina E, e essa elevação começou a voltar aos valores iniciais na amostragem seguinte (seis horas). Nos peixes cronicamente manipulados, a elevação em uma hora não é evidente, mas às seis horas a redução só ocorre nos peixes controle. A menor elevação da glicemia nos peixes sem prévia manipulação alimentados com 150 mg da vitamina sugere um papel protetor deste nutriente neste indicador de estresse.

A modulação do sistema imune por vários imunostimulantes na dieta vem sendo apontada como um método de melhorar a saúde do animal (Kiron, 2012) e como redutor de estresse (Pahor Filho et al., 2017).

No presente estudo, a vitamina E, na dose mais elevada, aumentou a ARL nos peixes que foram cronicamente estressados. A ARL tem perfis distintos nas duas condições de estresse, pois ela é aumentada 24 horas nos peixes após

estressor agudo, enquanto no estresse crônico há uma redução seis horas depois do estressor agudo, em ambos os casos independente da vitamina. Em “gilthead seabream” com deficiência de vitamina E, e, repetitivamente estressados, a produção de radicais livres de oxigênio por neutrófilos do sangue foi reduzida (Montero et al., 2001). Considerando estes dados e a resposta que observamos com elevação da ARL em pacus alimentados com suplementação de vitamina E, sugerimos que ela é moduladora da resposta dos leucócitos.

A vitamina E também potenciou a resposta do sistema complemento nos peixes cronicamente estressados (24 horas). O sistema complemento desempenha uma defesa importante sinalizando a presença de potenciais patógenos para o hospedeiro e destruindo esses microrganismos. No estudo anteriormente citado (Montero et al., 2001), dietas deficientes em vitamina E diminuíram a atividade do sistema complemento em “gilthead seabream”. Em outro estudo, Montero et al. (1998) avaliaram a atividade do sistema complemento em “gilthead seabream” sob diferentes condições de estresse (adensamento e perseguição repetitiva) e encontraram redução da atividade quando as dietas oferecidas aos peixes eram deficientes em  $\alpha$ -tocoferol. Os autores sugeriram que a deficiência nutricional, mais que o estresse, foi determinante para a ativação do sistema complemento.

O sistema de defesa antioxidante inclui várias enzimas dentre elas a catalase (CAT), a glutathione-S-transferase (GST) e o produto glutathione reduzida (GSH). As enzimas antioxidantes atuam para garantir a proteção contra o estresse oxidativo, atuando de forma coordenada.

A catalase é encontrada em quase todos os organismos aeróbicos, com exceção de algumas cianobactérias e de algumas bactérias e parasitos helmintos (Halliwell & Gutteridge, 1989). A atividade da catalase avaliada aumentou sua na atividade, diminuindo o dano nas membranas celulares. Após o estresse a enzima CAT apresentou maior atividade e o maior resultado foi observado no grupo suplementado com 150 mg de vitamina E. Devido às condições de estresse por perseguição, provavelmente ocorreram mudanças adaptativas nas funções mitocondriais para garantir a oxigenação tecidual. No entanto, esta adaptação proporciona um aumento de EROs como resultado da oxidação da enzima xantina redutase na xantina oxidase, uma transformação

que visa garantir níveis de oxigênio (Lushchak, 2011; Pörtner, 2002). O aumento das atividades de enzimas antioxidantes também foi relatado para diferentes espécies de organismos aquáticos sob hipóxia, como: atividade de CAT de *Carassius auratus* (Lushchack et al., 2001) e SOD, CAT e GPx de *Litopenaeus vannamei* (Kniffin, Burnett & Burnett, 2014; Parrilla - Taylor & Zenteno-Savin, 2011; Transriña-Arenas et al., 2013).

A GSH está presente na maioria das células e pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesões resultantes da exposição a agentes oxidantes como íons ferro, oxigênio hiperbárico. Além disto, participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação e é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas. No presente estudo, o aumento significativo da GSH nos tempos experimentais de 1h após o estresse em peixes não manipulados e cronicamente manipulados sugere aumento da proteção do organismo contra o eventual estresse oxidativo presente nesta condição e a redução em seguida, nos grupos tratados com vitamina E, indica um possível papel modulador na recuperação do estado redox da célula. Takahashi et al., 2017 avaliaram em pacus alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de selênio (Se), e apresentaram baixa quantidade da GSH. No presente estudo a atividade desta enzima teve sua atividade em ambas condições de estresse.

A GST é considerada uma importante enzima de desintoxicação, por metabolizar grande variedade de compostos xenobióticos orgânicos, por meio da conjugação destes com a glutathiona reduzida (GSH), formando substâncias de baixa toxicidade. No presente trabalho, a atividade desta enzima não diferiu em ambas as condições de estresse, provavelmente pelo alto coeficiente de variação. Biller-Takahashi et al. (2015) mostraram que em pacus alimentados com diferentes concentrações de selênio houve melhora do *status* oxidativo, o que indica maior defesa imunológica.

Geralmente, a suplementação de vitamina E é capaz de prevenir a alterações causadas pela exposição a danos oxidativos. Da mesma forma, Dandapat et al. (2000) sugeriram que a vitamina E na dieta é capaz de reduzir os níveis de LPO e pode modular o antioxidante sistema de defesa (medido pela

recuperação de SOD, CAT, GPx, atividades de GR e níveis de GSH) em hepatopâncreas e brânquias do gigante camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, em doses de 200 e 400 mg de vitamina E / kg de ração. O fígado foi descrito como o mais importante órgão envolvido na regulação do metabolismo redox e é um órgão alvo para danos oxidativos. Portanto, os efeitos protetores da vitamina E são principalmente visíveis em o órgão mais afetado, como o fígado.

## 5 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a vitamina E estimula o sistema imune de pacu, sendo que ambas concentrações promoveram resultados quanto as respostas de imunidade. A concentração de 500 mg de vitamina E promovendo melhores resultados para as atividades dos respiratórias dos leucócitos e sistema complemento. Os estressores aplicados induziram apenas respostas na catalase (CAT) e glutathiona reduzida (GSH), e diminuição da glutathiona-S-transferase.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A.C.D.; DAFRE, A.L.; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M.H.G; DI MASCIO, P. **Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 318, p. 21–30, 2005.
- ALMEIDA, J.A.; DINIZ Y.S.; MARQUES, S.F.; FAINE, L. A.; RIBAS, B.O.; BURNEIKO, R.C.; NOVELLI, E. L. **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.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. **Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling.** General and Comparative Endocrinology, v.164, p.142-150, 2009.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. **Basic haematology and serology for fish health programs.** In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1995.
- ASCHBACHER K; O'DONOVAN A; WOLKOWITZ OM; DHABHAR FS; SU Y, EPEL E. **Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity.** Psychoneuroendocrinology;38: 1698–1708, 2013.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K.; **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** Review of fish Diseases, v.1, p. 3-26, 1991.
- 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.
- BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. **Immunity.** In: EVANS, D. H. (Ed.). The physiology of fishes. Boca Raton: CRC Press, p.215-242, 1998.
- BIESALSKI, H.K. **The role of antioxidants in nutritional support.** Nutrition, v. 16, p. 593-596, 2000.
- BILLER-TAKAHASHI JD; TAKAHASHI L. S; MINGATTO FE ;URBINATI EC. **The immune system is limited by oxidative stress: dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*.** Fish Shellfish Immunology v. 47 p. 360-367, 2015.
- BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; SABIONI, R.E.; URBINATI, E.C. **Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, n.2, p.237-241, 2012.

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

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 & Shellfish Immunology, London, v.20, p. 239 – 262, 2006.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of proteindye binding assay**. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. **Biochemical and physiological biomarkers in Prochilodus lineatus submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil**. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21: 61-69. 2006.

CEREZUELA, R.; FUMANAL, M.; TAPIA-PANIAGUA, S.T.; MESEGUER, J.; MORIÑIGO, M.A.; ESTEBAN, M.A. **Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae**. Cell and Tissue Research, v.350, n.3, p.477-489, 2012.

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.

DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. **Regulation of cellular glutathione**. American Journal of Physiology, v.257, p. 163-173, 1989.

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

ELLIS, A.E. **Immunity to bacteria in fish**. Fish & Shellfish Immunology, v.9, p.291-308, 1999.

ELLIS, A.E. **Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria**. Developmental and Comparative Immunology, v.25, p.827-839, 2001.

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, SOFIA. 2018.

FARIA, C. F. P. **Estresse e modulação do sistema antioxidativo pelo glutamato dietético em juvenis de pau (*Piaractus mesopotamicus*)**.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura – CAUNESP) – Centro de aquicultura da UNESP- Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 2017.

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.

FERRIANI, V.P.L.; BARBOSA, J.E.; DECARVALHO, I.F. **Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy age related changes.** Acta Paediatrica Scandinavica, v.79, p.322-327, 1990.

GALLAGHER, E.P.; GROSS, T.S.; SHEEHY, K.M. **Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*).** Aquatic Toxicology., 55: 223-237. 2001.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. **Effect of mild iron overload on liver and kidney lipid peroxidation.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research Res. 27: 2.349-2.358, 1994.

GIULIO, R.T.D.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. **Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress.** Environmental Toxicology and Chemistry v.9, p. 1103-1123, 1989.

H. BOSHRA, J. LI, J.O. Sunyer, **Recent advances on the complement system of teleost fish,** Fish & Shellfish Immunology. 239 e 262, 2006.

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. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 246, p. 501-514, 1986.

JENSEN, F.; NIELSEN, M.; NIELSEN, R. **Increased competition for aquaculture from fisheries: Does improved fisheries management limit aquaculture growth?** Fisheries Research, v. 159, p. 25-33, 2014.

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.

KLEIN, J. **Immunology.** Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. 311-334, 1990.

KNIFFIN, C. D., BURNETT, L. E., & BURNETT, K. G. **Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: Impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*.** Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology, 170, 43– 49, 2014.

LUSHCHAK, V. I. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.** Aquatic Toxicology, 101, 13 – 30, 2011.

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. **Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation.** American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 280, 100– 107, 2001.

LUSHCHAK, V.I. **Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach.** Fish Physiology and Biochemistry. 42(2):711-747, 2016.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. **Glutathione.** Annual Review of Biochemistry 52: 711-60, 1983.

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

NEYRÃO, I. M. **Mediação de respostas imunes e do sistema de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Dissertação (Mestrado em Aquicultura – CAUNESP) – Centro de aquicultura da UNESP-Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 2017.

NOGUCHI, T. et al. **Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks.** The Journal of Nutrition v.103, p.1502-1511, 1973.

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.

PARRILLA-TAYLOR, D. P., & ZENTENO-SAVÍN, T. **Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation.** Aquaculture, 318, 379– 383, 2011.

PARRILLA-TAYLOR, D. P., & ZENTENO-SAVÍN, T. **Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation.** Aquaculture, 318, 379– 383, 2011.

PICKERING, A.D. **Growth and stress in fish production.** Aquaculture. v. 111, p. 51-63, 1993.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, R.B. **Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system.** Experimental and Mathematical Analyses. Journal of Immunology, v.121, p.363-370, 1978.

PORTNER, H. O. **Climate variation and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular & Integrative Physiology, 132A, 739– 761, 2002.

RAA, J. **The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds.** In: CRUZ SUÁREZ, L.E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M.A. CIVERA-CERECEDO, R. (Ed.) Avances em Nutrição Acuícola V. Memórias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México. 2000.

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

SECOMBES, C.J.; WANG, T. **The innate and adaptive immune system of fish. In: Infectious disease.** In: Aquaculture Prevention and Control, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p.3-68, 2012.

SLATER, T. F.; BENEDETTO, C.; BURTON, G. W.; CHEESEMAN, K. H.; INGOLD, K. U.; NODES, J. T. **Incosanoids and cancer** (THALER-DAO, H., CRASTES DE PAULET, A. & PAOLETTI, R., EDS.), pp. 21-29, Raven Press, New York. 1984.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. **The determination of lysozyme.** Journal of Bacteriology, v.58, p.731-736, 1949.

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 & Shellfish Immunology, 60, 311–317, 2017.

TELLI, G.S.; RANZANI-PAIVA, M.J.; DIAS DDE, C.; SUSSEL, F.R.; ISHIKAWA, C.M.; TACHIBANA, L. **Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities.** Fish & Shellfish Immunology, v.39, n.2, p.305-311, 2014.

TRASVIÑA-ARENAS, C. H.; GARCIA-TRIANA, A.; PEREGRINO-URIARTE, A. B.; YEPIZ PLASCENCIA, G. **White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 164, 44–52, 2013.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A. **Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities.** Aquaculture 229: 389-400, 2004.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D. **ESTRESSE E SISTEMA IMUNE EM PEIXES.** IN: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C (ED.). BIOLOGIA E FISILOGIA DE PEIXES NEOTROPICAIS DE ÁGUA DOCE. JABOTICABAL: FUNEP. CAP. 5, 87-105, 2014.

URBINATI, E.C; CARNEIRO, P.C.F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.** In: CYRINO, J.E.P; URBINATI, E.C. et al (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt cap. 6, p171-194, 2004.

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, n. 2, p. 57-149, 2003.

VIG, E.; NEMCSOK, J. **The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L.** Journal of Fish Biology, 35, 23–25, 1989.

WENDERLAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish.** Physiological Reviews, Washington, v. 77, n. 4, p. 591-625, 1997.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R. C. **Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847).** Aquaculture, 244, 349–357, 2005.

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Suplementação dietética com vitamina E: variáveis fisiológicas e avaliação do sistema antioxidante de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**", protocolo nº 018861/17, sob a responsabilidade da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabeth Criscuolo Urbinati, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	01/01/2018 a 01/12/2018
Espécie / Linhagem	<i>Piaractus mesopotamicus</i>
Nº de animais	240
Peso / Idade	80 g
Sexo	Indefinido
Origem	Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.

  
**Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo**  
Vice-Coordenador – CEUA