

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE HEMATÓCRITO,
GLICEMIA, COMPORTAMENTO ALIMENTAR E PERFIL
ELETROFORÉTICO PLASMÁTICO EM TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) (LINNAEUS, 1759).**

FERNANDO HENRIQUE RODRIGUES BORIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE HEMATÓCRITO,
GLICEMIA, COMPORTAMENTO ALIMENTAR E PERFIL
ELETROFORÉTICO PLASMÁTICO EM TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) (LINNAEUS, 1759).**

FERNANDO HENRIQUE RODRIGUES BORIN

ORIENTADOR: PROF. DR. JOEL MESA HORMAZA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

**BOTUCATU – SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Borin, Fernando Henrique Rodrigues.

Efeitos da radiação gama sobre comportamento alimentar, hematócrito, glicemia e perfil eletroforético plasmático em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)(Linnaeus,1759) / Fernando Henrique Rodrigues Borin. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Joel Mesa Hormaza

Capes: 20903006

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Eletroforese. 3. Raios gama. 4. Glicemia. 5. Radiação ionizante. 6. Sistema imune.

Palavras-chave: Eletroforese; Glicemia ; Hematócrito ; Radiação gama; Tilápia do Nilo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fernando e Rosana, a minha avó Ernestina e meu avô Pedro, pelo apoio e todo esforço na minha formação pessoal e profissional, ensinando os melhores valores e motivando sempre que me faltavam forças. Sempre buscando a formação de um caráter idôneo para a vida social. A minha irmã Melina e minha namorada Fernanda pela paciência e companheirismo. Ao meu filho Kaio pela compreensão dos momentos que estive ausente para realização deste trabalho. Amo todos vocês!

Ao Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza por aceitar um risco ao decidir que eu poderia ser seu orientado e aceitar tal aposta transmitindo-me os ensinamentos necessários para a formação do meu caráter científico.

Ao meu amigo Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos pelos ensinamentos na iniciação no estudo da eletroforese que foi determinante para minha continuidade na área e ingresso no mestrado.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Rodrigues Fernandes pelo apoio e aprendizagem na área da radiação ionizante. E também por permitir que uma das etapas desse trabalho fosse concluída.

Ao Prof. Dr. Helton Carlos Delício pelos ensinamentos e responsabilidade pela minha iniciação no estudo de comportamento animal e me autorizar a trabalhar em seu laboratório.

A Profa. Dra. Denise Rangel da Silva Sartori pela permissão em realizar testes de glicemias em seu laboratório e ensinamentos na área.

Ao Técnico Antonio Carlos de Barros Tardivo pelo apoio e ajuda quando necessário.

Ao Prof. Tit. Marcos Roberto Mattos Fontes pelas oportunidades concedidas.

A Profa. Dra. Claudia Helena Pellizzon pelas sugestões.

Aos Departamentos de Física e Biofísica, Fisiologia e Morfologia, pela autorização para utilizar os laboratórios.

A Seção de Pós-Graduação e seus funcionários pela atenção.

Por fim, a todos pelos momentos de descontração e superação das dificuldades que apareceram no decorrer do trabalho.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

Os peixes são encontrados em ambientes passíveis de contaminação, dentre as quais se destaca a radiação decorrente de descartes inadequados de material radiativo ou mesmo de acidentes como de Chernobyl na Ucrânia e, mais recentemente, Fukushima no Japão. Poucos trabalhos são encontrados na literatura com o emprego de radiações ionizantes como agente estressor em peixes. Neste trabalho pretende-se quantificar o impacto de diferentes doses de radiação gama em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no comportamento alimentar, em parâmetros bioquímicos, tais como, hematócrito, glicemia e proteinograma plasmático, assim como no comprometimento na sobrevivência. Neste trabalho foram utilizados 105 exemplares machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com o comprimento padrão médio de $11,11 \pm 0,44$ cm e peso médio de $40,56 \pm 3,64$ gramas; divididos em seis grupos experimentais de 15 peixes cada e expostos à radiação gama de corpo inteiro de dose única através de um aparelho de telecobaltoterapia nas doses de 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy e 32 Gy, e um grupo Controle sem irradiação. Foram coletados, em média, 0,3 mL de sangue com o auxílio de agulhas e seringas heparinizadas através de punção cardíaca. Posteriormente, foram determinados os parâmetros de hematócrito, glicemia e proteinograma plasmático, por técnicas usuais, para se avaliarem os efeitos da radiação. Observou-se a diminuição da ingestão de alimento, devido à ocorrência de irritação na mucosa oral em doses mais elevadas de radiação. A porcentagem de hematócrito foi a variável mais sensível aos efeitos da radiação gama. Os níveis glicêmicos variaram dependendo das doses de radiação gama em função do tempo. Elevadas doses de radiação gama provocaram alterações metabólicas que modificaram os padrões das diferentes classes protéicas. A tilápia do Nilo demonstrou-se resistente às doses de 1 a 8 Gy, possivelmente devido à eficiência do sistema de reparo. Acredita-se que, no grupo de 16 e 32 Gy, a mortalidade ocorrida foi devida à infecção por agentes oportunistas e susceptibilidade do sistema imune.

ABSTRACT

Fish are found in susceptible to contamination environments, among which stands out the radiation arising from inadequate disposal of radioactive material or even accidents like Chernobyl in Ukraine and, more recently, Fukushima in Japan. Few studies are found in the literature with the use of ionizing radiation as a stressor in fish. This work aims to quantify the impact of different doses of gamma radiation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in eating behavior, biochemical parameters, such as, hematocrit, glucose and plasma protein electrophoretic pattern, as well as the commitment on survival. In this work we used 105 males of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), with the average standard length of 11.11 ± 0.44 cm and average weight of 40.56 ± 3.64 grams; divided into six experimental groups of 15 fish each and exposed to gamma radiation full-length single dose, by the use of a telecobaltoterapia apparatus in doses of 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy and 32 Gy, and a group Control without irradiation. They were collected, on average, 0.3 ml of blood with the aid of needles and heparinized syringes by cardiac puncture. Subsequently, they determined the parameters hematocrit, blood glucose and plasma protein electropherogram by standard techniques, to assess the effects of radiation. There was a decrease in food intake due to the occurrence of irritation on oral mucosa in higher doses of radiation. The percentage of hematocrit was the most sensitive variable to the effects of gamma radiation. Glucose levels varied depending on the doses of gamma radiation as a function of time. High doses of gamma radiation caused metabolic alterations that changed the standards of different protein classes. The Nile tilapia shown to be resistant to doses of 1 to 8 Gy, possibly due to repair system efficiency. It is believed that in the group of 16 and 32 Gy, mortality was occurring due to infection by opportunistic agents and susceptibility of the immune system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>), Controle (a) e exposto à 32 Gy (b) logo após a irradiação.	12
Figura 2: Tilápia exposta a 32 Gy (<i>Oreochromis niloticus</i>) após manuseio.....	12
Figura 3: Lesões na boca de <i>Oreochromis niloticus</i> , uma possível mucosite.....	13
Figura 4: Variabilidade dos padrões eletroforéticos em gel de agarose de proteínas plasmáticas de tilápias do Nilo.	21
Figura 5: Padrões eletroforéticos em gel de agarose de proteínas sanguíneas de tilápia irradiadas com 32 Gy, nos períodos de parâmetros basais do grupo, 7, 14, 21 e 28 dias.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos (g) da tilápia do Nilo, grupos Controle e expostas a irradiação de 1 e 2 Gy....9

Tabela 2: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos (g) da tilápia do Nilo, grupos Controle e expostas a irradiação de 4 e 8 Gy....9

Tabela 3: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos (g) da tilápia do Nilo, grupos Controle e expostas a irradiação de 16 e 32 Gy.
.....9

Tabela 4: Comparações múltiplas de ingestão de alimento, entre tratamentos, Controle, 4 e 8 Gy, durante o período compreendido entre 8 e 14 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H). 10

Tabela 5: Comparações múltiplas de ingestão de alimento entre tratamentos, Controle, 16 e 32 Gy, durante o período compreendido entre 8 e 14 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H). 10

Tabela 6: Comparações múltiplas de ingestão de alimento entre tratamentos, Controle, 16 e 32 Gy, durante o período compreendido entre 15 e 21 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H). 11

Tabela 7: Comparações múltiplas de ingestão de alimento entre tratamentos, Controle, 16 e 32 Gy, durante o período compreendido entre 22 e 28 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H). 11

Tabela 8: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) do hematócrito no sangue de tilápias do Nilo expostas à irradiação nos períodos experimentais, comparações entre as médias ao longo do tempo, de acordo com o teste T. 14

Tabela 9: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 1 Gy. 14

Tabela 10: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 2 Gy.....	15
Tabela 11: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 4 Gy.....	15
Tabela 12: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 8 Gy.....	16
Tabela 13: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 32 Gy.....	16
Tabela 14: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da concentração plasmática de glicose (mg/dl) nas tilápias expostas à irradiação nos períodos experimentais, comparações entre as médias ao longo do tempo, de acordo com o teste T.....	17
Tabela 15: Comparações múltiplas de concentração plasmática de glicose durante os períodos das colheitas, em tilápias do Nilo irradiadas com 4 Gy pelo teste de Kruskal-Wallis (H).	18
Tabela 16: Quadro de análise de variâncias dos dados de concentração plasmática de glicose de tilápias do Nilo irradiados com 8 Gy.....	18
Tabela 17: Comparações múltiplas de concentração plasmática de glicose da tilápia do Nilo entre tratamentos de 16 Gy durante os períodos das coletas pelo teste de Kruskal-Wallis (H).	19
Tabela 18: Comparações múltiplas de concentração plasmática de glicose da tilápia do Nilo entre tratamentos de 32 Gy durante os períodos das colheitas pelo teste de Kruskal-Wallis (H).	20
Tabela 19: Estatística descritiva, médias, desvios padrão, variâncias e intervalos de confiança 0,5, dos valores médios basais da posição das mobilidades relativas (rf) e valores densitométricos (%), das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias não submetidas à irradiação gama.....	21

Tabela 20: Estatística descritiva dos valores médios densitométricos (%), das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias do Nilo não irradiadas, nos períodos experimentais.	22
---	----

Tabela 21: Estatística descritiva dos valores médios densitométricos (%), das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias do Nilo irradiadas com 32 Gy, nos períodos experimentais; comparações entre as médias ao longo do tempo, de acordo com o teste T.	22
---	----

Tabela 22: Quadro de análise de variâncias teste F, dos valores médios densitométricos albumina (%) de tilápias do Nilo irradiadas com 32 Gy.	23
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Efeitos Biológicos da Radiação	1
1.2 Tilápia do Nilo.....	3
1.3 Comportamento Alimentar, Hematócrito, Glicemia e Eletroforese de Proteínas Plasmáticas.....	3
2 OBJETIVOS.....	5
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1 Animais e Grupos Experimentais	6
3.2 Colheita de Amostras.....	7
3.3 Irradiação	7
3.4 Hematócrito, Glicemia e Proteínas Plasmáticas.....	8
3.5 Proteinograma por Eletroforese.....	8
3.6 Análises Estatísticas	8
4. RESULTADOS	9
4.1 Comportamento Alimentar	9
4.2 Hematócrito.....	13
4.3 Glicemia	17
4.4 Eletroforese de Proteínas Plasmáticas	20
5 DISCUSSÃO	24
5.1 Comportamento Alimentar	24
5.2 Hematócrito.....	26
5.3 Glicemia	27
5.4 Eletroforese de Proteínas Plasmáticas	28
6 CONCLUSÕES	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

8 APÊNDICES	39
8.1 Apêndice 1: Certificado do Comitê de Ética.....	39

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são encontrados em ambientes passíveis de contaminação, dentre as quais se destaca a radiação decorrente de descartes inadequados de material radiativo ou mesmo de acidentes como de Chernobyl na Ucrânia e mais recentemente Fukushima no Japão.

Quanto ao acidente de Fukushima, o mais recente até agora, a maior parte do esforço de descontaminação tem se concentrado em estabilizar os reatores danificados na usina nuclear, que continuam vazando e liberando materiais radioativos no oceano Pacífico, conforme Featherstone (2015). Esses materiais liberados podem ter meia vida de segundos até bilhões de anos, inviabilizando toda a vida no entorno das usinas nucleares.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura com resposta biológica aos efeitos da radiação ionizante em altas taxas de doses em peixes ou mesmo como agente estressor. Entretanto, vários trabalhos são encontrados empregando peixes tropicais relacionando modificações bioquímicas com estresse ambiental, como se pode observar: *Prochilodus lineatus* (RANZANI-PAIVA; GODINHO, 1986), *Piaractus mesopotamicus* (KRIEGER-AZZOLINI et al., 1989; MARTINS, 2000; MARTINS et al., 2002), *Oreochromis niloticus* (BARCELLOS et al., 1997; VIJAYAN et al., 1997), *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* (MOURA et al., 1994), *Bryconcephalus* (CARNEIRO; URBINATI, 1998; CARNEIRO et al., 2002), *Rhamdia aquelen* (BARCELLOS et al., 2001), no híbrido Tambacu *P. mesopotamicus* x *C. macropomum* (MARTINS et al., 2001; MARTINS et al., 2002) e *C. macropomum* (TAVARES-DIAS et al., 2001; GOMES et al., 2003).

1.1 Efeitos Biológicos da Radiação

Os mecanismos de ação das radiações ionizantes podem ser classificados em direto ou indireto. O mecanismo direto ocorre quando a ação da radiação se processa diretamente sobre uma molécula biologicamente importante, como por exemplo, o DNA, causando danos letais ou subletais à célula atingida. Cerca de 1 a 2 Gy de dose absorvida de raios X produzem ao redor de 500 a 1000 quebras de uma fita, de 1000 a

2000 alterações de bases e 40 quebras de duas fitas em uma única célula de mamífero. 1 Gy é a unidade de dose absorvida no sistema internacional, é se define a partir da razão entre energia depositada e a massa do alvo, ou seja 1 J/Kg.

O mecanismo indireto acontece quando a radiação interage com a molécula de água ou de oxigênio, transferindo energia suficiente para rompê-la, ocasionando a formação de radicais livres (DURÁN, 2003; OKUNO; YOSHIMURA, 2010), que irão provocar sucessivas reações com os componentes intracelulares alterando a composição celular, ou mesmo rompendo a membrana citoplasmática, o que pode também provocar a morte celular.

Danos nos tecidos ou órgãos que resultam em morte celular em grandes números são chamados reações teciduais (ICRP, 2007). Estas, por sua vez, são classificadas em imediatas ou tardias. As reações teciduais imediatas surgem pouco tempo após a exposição à radiação, isto é, algumas horas ou mesmo em algumas semanas. Essas reações são do tipo inflamatório, o que resulta de alteração na permeabilidade celular e liberação de histaminas, como resposta a radiação podemos citar o eritema (queimaduras), mucosite (inflamação da mucosa de revestimento do trato gastrointestinal) e escamação da epiderme (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Sabe-se também que o dano infringido em células quando estão em processo de divisão é maior, tornando os respectivos tecidos e órgãos mais radiosensíveis que outros constituídos por células que pouco ou nunca se dividem.

Em humanos, o conjunto e a sucessão de sintomas que aparecem em vítimas de acidentes, envolvendo doses elevadas de radiação, são denominados de síndrome aguda da radiação. Uma pessoa exposta 1 a 2 Gy de radiação, pode ter sintomas como náuseas, vômitos, depleção no sistema hematopoiético e sistema imune. Com doses de 2 a 4 Gy, evidenciam-se os sintomas anteriormente citados e infecções causadas por agentes oportunistas. De 4 a 6 Gy podem ocorrer depleção severa da função medular e hemorragias. De 6 a 7 Gy danos no sistema gastrointestinal e acima de 10 Gy danos no sistema nervoso e cardiovascular, levando o indivíduo a morte (OKUNO; YOSHIMURA, 2010; TAUHATA et al., 2003; XAVIER et al., 2010).

1.2 Tilápia do Nilo

As tilápias do Nilo, originárias da África, foram introduzidas no Brasil em 1971, espalhando-se por todo o país (PROENÇA; BITTENCOURT, 1994). A grande vantagem das espécies exóticas sobre as nativas é o conhecimento técnico e científico disponível. A tilápia é um dos peixes com maior potencial para aquicultura por apresentarem rápido crescimento, resistência a doenças e responderem com a mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem vegetal e animal. São tolerantes ao baixo oxigênio dissolvido e possuem capacidade fisiológica de adaptarem-se em diferentes ambientes (SCHIMITTOU, 1995; ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004) além de crescerem e se reproduzirem em águas salobras.

1.3 Comportamento Alimentar, Hematócrito, Glicemia e Eletroforese de Proteínas Plasmáticas

Um dos efeitos evidentes do estresse na alimentação em peixes é a supressão da ingestão de alimentos (GREGORY; WOOD, 1999; JOVLING; WANDSVICK, 1983). O estresse social, como exemplo, eleva os níveis de cortisol plasmático (CORRÊA et al., 2003; DOYON et al., 2003; NOAKES; LEATHERLAND, 1977; SCHRECH, 1981; ZAYAN, 1991), um hormônio que aumenta os valores de glicose e de aminoácidos no sangue, o que poderia explicar uma eventual supressão da ingestão do alimento (GREGORY; WOOD, 1999).

O hematócrito é um fator importante no diagnóstico de diferentes doenças e indicador dos efeitos de diversos fatores ambientais a que os peixes estão submetidos, o Eritrograma por sua vez, é o índice que apresenta menor coeficiente de variação (SCHUETT et al., 1997). Estas variáveis podem sofrer alterações em decorrência de dietas (KLINGER et al., 1996), ação de toxinas (LUMBERTDACHA et al., 1995), enfermidades e outras situações estressantes (SILVEIRA; RIGORES, 1989).

A elevação plasmática de cortisol e glicose é reconhecida como a principal resposta ao estresse, sendo amplamente utilizada como indicador (ADAMANTE, 2005; NAVARRO, 2010).

Segundo Barton (2002), o estresse pode ser considerado como um conjunto de respostas não específicas do organismo a situações que ameaçam o equilíbrio da sua homeostase. Dependendo do estressor, a homeostase pode sofrer alterações e muitas vezes levam ao aumento dos níveis glicêmicos produzindo efeitos deletérios sobre a saúde dos peixes (MOSCONI et al., 2005).

Contudo, se os peixes estiverem sujeitos a agentes estressores intensos ou prolongados, a resposta pode se tornar mal adaptativa, com conseqüências negativas para seu estado de saúde. De fato, o estresse pode ser considerado como um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência de doenças e altas mortalidades em aquicultura (CONTE, 2004).

O equilíbrio orgânico, tendo como base o metabolismo protéico, pode ser avaliado através da concentração de proteínas totais e metabólitos plasmáticos. Determinadas enfermidades podem causar alterações no perfil protéico plasmático. Tais alterações são avaliadas através da eletroforese de proteínas caracterizando-as como hipo ou hiperproteinemia.

A determinação do perfil eletroforético é uma ferramenta útil na avaliação de diferentes globulinemias. As frações alfa, beta e gama-globulinas, podem elevar-se em doenças infecciosas, sendo que os anticorpos migram primariamente na a fração gama. A fração alfa-globulina pode aumentar em decorrência da necrose tecidual e diminuir com grave doença hepática, má nutrição e má absorção (THRALL et al., 2004). Estas alterações podem ocorrer numa situação de exposição à radiação ionizante, visto que o tecido hematopoiético é altamente sensível.

A Albumina é a principal fração do soro sanguíneo, representando até 60 % da proteína total, variando conforme a espécie animal. A associação da eletroforese à densitometria pode demonstrar alterações nessa fração, relacionadas às hepatopatias, desnutrição, deficiências na absorção de nutrientes, nefropatias e enteropatias.

2 OBJETIVOS

No presente trabalho pretende-se verificar a validade das seguintes hipóteses:

- 1- Tilápias irradiadas com diferentes doses de radiação gama apresentam alterações no comportamento alimentar;
- 2- Tilápias irradiadas com diferentes doses de radiação gama apresentam alterações nos valores medidos de parâmetros bioquímicos, hematócrito, glicemia e proteinograma plasmático, de modo semelhante aos mamíferos;
- 3- Tilápias irradiadas com diferentes doses de radiação gama apresentam comprometimento na sobrevivência, de modo semelhante aos mamíferos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

No presente experimento, aprovado pela comissão de ética no uso de animais do IBB-Unesp com o número do protocolo 471 (Apêndice 1), foram utilizados 105 exemplares machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), selecionados através do método de identificação macroscópica do sexo por meio da evidência da papila urogenital com a solução de Azul de Metileno (1 %), com o comprimento padrão médio de $11,11 \pm 0,44$ cm e peso médio de $40,56 \pm 3,64$ gramas.

Os peixes foram divididos em seis grupos experimentais de 15 indivíduos cada, expostos à radiação gama de corpo inteiro de dose única em aparelho de telecobaltoterapia nas doses de 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy e 32 Gy, além de um grupo Controle sem irradiação.

Inicialmente, foram aclimatados no biotério de peixes do Departamento de Fisiologia - IBB durante 30 dias em tanques de 2000 litros de água, mantendo-se as condições de temperatura entre 25 e 27 °C, pH em torno de 7 e teor de amônia <0,04 ppm.

Empregou-se um sistema de filtro biológico e recirculação, com fluxo constante de água desclorificada, mantendo-se fotoperíodo de 12 h claro x 12 h escuro com auxílio de timer e luz fluorescente artificial. Os peixes foram alimentados *ad libitum* uma vez por dia com ração peletizada (35 % de PB, Purina Ltda).

Após este período, as tilápias foram transferidas para o Laboratório de Fisiologia Digestória e Comportamento de Peixes do IBB e acondicionadas individualmente em aquários de vidro com capacidade de 19 L ($22 \times 22 \times 40$ cm³) onde permaneceram por 28 dias.

Neste período, a qualidade da água foi monitorada semanalmente a fim de se manterem os parâmetros físico-químicos estáveis e ideais para a espécie. A alimentação foi oferecida duas vezes por dia, na proporção de 3 % da biomassa de peixes, permanecendo disponível por uma hora. A ingestão de alimento foi quantificada todos os dias através da diferença entre a quantidade de pellets oferecida e a sobra no aquário. Os dados foram posteriormente agrupados em intervalos semanais, de acordo com o período de colheita de amostras de sangue.

3.2 Colheita de Amostras

Para a determinação dos parâmetros basais de hematócrito, glicemia e proteínas plasmáticas, foram colhidos, através de punção cardíaca, em média 0,3 mL de sangue com o auxílio de agulha e seringa heparinizadas (ISHIKAWA et al, 2010). Para tanto, os peixes foram anestesiados em solução anestésica de benzocaína (12 %).

Sete dias após este procedimento, os Grupos Experimentais e o Controle, foram transferidos, individualmente, dos seus aquários de origem para recipientes plásticos identificados, com capacidade de 1,5 L (17 x 13 x 11,5 cm³).

3.3 Irradiação

Após acondicionamento, as tilápias foram transferidas para setor de telecobaltoterapia e expostas à irradiação gama nas doses anteriormente citadas.

A dose empregada para cada grupo experimental foi aferida mediante o emprego de câmara de ionização calibrada para a energia de radiação do ⁶⁰Co, tendo um rendimento pontual da fonte de 101,358 cGy/min, seguindo o Protocolo de Dosimetria TRS-398 da Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), (IAEA, 2000).

Para uma melhor distribuição da irradiação, o procedimento foi realizado em duas etapas. Metade da dose foi aplicada do lado direito e outra metade do lado esquerdo, determinando o cálculo da dose no ponto médio da distância latero-lateral, com distância fonte superfície (DFS) de 80 cm, com campo de irradiação 30 x 30 cm² e com isso garantindo a homogeneidade na distribuição da dose de radiação.

Para a dose de 1 Gy os peixes ficaram expostos ao ⁶⁰Co por 36 segundos de cada lado, na dose 2 Gy; 1 minuto e 11 segundos, 4 Gy; 2 minutos e 21 segundos, 8 Gy; 4 minutos e 41 segundos, 16 Gy; 9 minutos e 22 segundos e 32 Gy; 18 minutos e 44 segundos.

Ao término da irradiação das tilápias, elas retornaram ao laboratório para os seus aquários de origem. A cada sete dias uma nova amostra de sangue foi retirada até o 28º dia, sendo que a ingestão de alimento foi quantificada diariamente.

3.4 Hematócrito, Glicemia e Proteínas Plasmáticas

Para a determinação do Hematócrito foram empregados microtubos de vidro previamente heparinizados, conforme Hudson et al; 2008. Após a determinação do hematócrito (%) nas amostras de sangue, elas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos em microcentrifuga refrigerada. As amostras de plasma assim obtidas foram transferidas para frascos tipo Eppendorf e armazenadas em - 80° C para análises posteriores.

Os níveis plasmáticos de glicose foram determinados através do método enzimático colorimétrico, sem desproteinização, com o uso de kits comerciais Glucose Likuicolor Kit (InVitro), de acordo com instruções do fabricante.

3.5 Proteinograma por Eletroforese

A determinação dos proteinogramas foi feita mediante a técnica de eletroforese em gel de agarose CELM-GEL® (Filme de Agarose Geral) conforme instruções do fabricante; as frações protéicas foram quantificadas (%) empregando-se a densitometria em VDS (PHARMACIA).

3.6 Análises Estatísticas

Para a análise estatística empregou-se o programa computacional ASSISTAT, segundo Silva e Azevedo (2009). Foi empregada a estatística descritiva: média, desvio padrão, erro padrão, variância e intervalo de confiança segundo Berquó et al. (1980). Foram aplicados também os testes de homogeneidade de variâncias (F) e o de comparação de médias (T-Student). Quando o teste de variância informava que os dados não estavam sob a distribuição normal, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H) para a comparação das médias.

4. RESULTADOS

4.1 Comportamento Alimentar

A estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos em gramas (g), das tilápias expostas à irradiação nos períodos experimentais está apresentada abaixo (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos (g) da tilápia do Nilo, grupos Controle e expostas a irradiação de 1 e 2 Gy.

Dose	Períodos			
	1 – 7 dias	8 – 14 dias	15 – 21 dias	22 – 28 dias
Controle	1,22 $\pm$ 0,00	1,17 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,03
1 Gy	1,18 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,03
2 Gy	1,19 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,04	1,13 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,02

Tabela 2: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos (g) da tilápia do Nilo, grupos Controle e expostas a irradiação de 4 e 8 Gy.

Dose	Períodos			
	1 – 7 dias	8 – 14 dias	15 – 21 dias	22 – 28 dias
Controle	1,22 $\pm$ 0,00	1,22 $\pm$ 0,00	1,20 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,01
4 Gy	1,20 $\pm$ 0,01	1,18 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,03
8 Gy	1,20 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,03

Tabela 3: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da ingestão de alimentos (g) da tilápia do Nilo, grupos Controle e expostas a irradiação de 16 e 32 Gy.

Dose	Períodos			
	1 – 7 dias	8 – 14 dias	15 – 21 dias	22 – 28 dias
Controle	1,21 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,00	1,22 $\pm$ 0,00	1,22 $\pm$ 0,00
16 Gy	1,19 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,06
32 Gy	1,21 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,15

Não foi constatada variação significativa na ingestão de alimentos (g), dos peixes expostos à irradiação de 1, 2 e 4 Gy, nos períodos em estudo, em relação ao grupo Controle.

No grupo exposto a 8 Gy observou-se variação significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Controle, no período compreendido entre 8 e 14 dias, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Comparações múltiplas de ingestão de alimento, entre tratamentos, Controle, 4 e 8 Gy, durante o período compreendido entre 8 e 14 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Cont. X 4 Gy	5,79	14,58	Não
Cont. X 8 Gy	14,48	13,60	Sim
4 Gy X 8 Gy	8,70	12,5	Não

Cont. = Controle

Difer. Crít = Diferença Crítica

H = 7,07 H crítico = 5,99

Alfa = 0,05

Nas doses de 16 e 32 Gy observou-se variação significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Controle, nos períodos compreendidos entre 8 e 14 dias, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Comparações múltiplas de ingestão de alimento entre tratamentos, Controle, 16 e 32 Gy, durante o período compreendido entre 8 e 14 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Cont. X 16 Gy	35,75	19,39	Sim
Cont. X 32 Gy	38,29	19,69	Sim
16 Gy X 32 Gy	2,53	17,27	Não

Cont. = Controle

Difer. Crít = Diferença Crítica

H = 25,61 H crítico = 5,99

Alfa = 0,05

Nas doses de 16 e 32 Gy observou-se variação significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Controle, nos períodos compreendidos entre 15 e 21 dias, conforme Tabela 6.

Tabela 6: Comparações múltiplas de ingestão de alimento entre tratamentos, Controle, 16 e 32 Gy, durante o período compreendido entre 15 e 21 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Cont. X 16 Gy	35,75	19,39	Sim
Cont. X 32 Gy	38,29	19,69	Sim
16 Gy X 32 Gy	2,53	17,27	Não

Cont. = Controle

Difer. Crít = Diferença Crítica

H = 25,61 H crítico = 5,99

Alfa = 0,05

Nas doses de 16 e 32 Gy observou-se variação significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo Controle, nos períodos compreendidos entre 22 e 28 dias, conforme Tabela 7.

Tabela 7: Comparações múltiplas de ingestão de alimento entre tratamentos, Controle, 16 e 32 Gy, durante o período compreendido entre 22 e 28 dias pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Cont. X 16 Gy	25,51	12,15	Sim
Cont. X 32 Gy	23,04	16,32	Sim
16 Gy X 32 Gy	2,48	15,87	Não

Cont. = Controle

Difer. Crít = Diferença Crítica

H = 27,38 H crítico = 5,99

Alfa = 0,05

Evidenciou-se uma diferença de coloração entre o grupo Controle e o grupo exposto por 32 Gy, logo após a irradiação (Figura 1).



Figura 1: Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Controle (a) e exposto à 32 Gy (b) logo após a irradiação.

Observou-se que a perda das listras características da tilápia continuou até ocorrer o manuseio para coleta de sangue sete dias após a irradiação (Figura 2). Verificou-se também que a tilápia, mesmo retornando à sua coloração característica após o manuseio, apresentou manchas amareladas nas extremidades, assemelhando-se a queimaduras.



Figura 2: Tilápia exposta a 32 Gy (*Oreochromis niloticus*) após manuseio.

Foram observadas lesões macroscópicas na boca (possível mucosite) a partir do 8º dia após a irradiação em alguns peixes expostos 16 a 32 Gy de irradiação gama (Figura 3).



Figura 3: Lesões na boca de *Oreochromis niloticus*, uma possível mucosite.

4.2 Hematócrito

A estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) do hematócrito no sangue de tilápias do Nilo expostas à irradiação nos períodos experimentais está apresentada abaixo (Tabela 8).

Tabela 8: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) do hematócrito no sangue de tilápias do Nilo expostas à irradiação nos períodos experimentais, comparações entre as médias ao longo do tempo, de acordo com o teste T.

Dose	Dias				
	Par. Basais	7	14	21	28
Controle	22,58 $\pm$ 0,74 ^a	22,48 $\pm$ 0,73 ^a	22,69 $\pm$ 0,95 ^a	22,49 $\pm$ 0,94 ^a	23,89 $\pm$ 0,72 ^a
1 Gy	23,19 $\pm$ 0,87 ^a	20,30 $\pm$ 0,87 ^{ab}	16,21 $\pm$ 0,81 ^{c*}	18,01 $\pm$ 1,38 ^{bc*}	18,50 $\pm$ 1,58 ^{bc*}
2 Gy	23,70 $\pm$ 0,65 ^a	19,65 $\pm$ 1,09 ^{bc*}	17,10 $\pm$ 1,30 ^{c*}	22,34 $\pm$ 1,01 ^{ab}	20,18 $\pm$ 1,23 ^{abc}
4 Gy	23,90 $\pm$ 1,01 ^{bc}	19,89 $\pm$ 0,75 ^{d*}	21,39 $\pm$ 0,99 ^{cd}	25,77 $\pm$ 1,46 ^{ab}	28,15 $\pm$ 1,14 ^{a*}
8 Gy	21,78 $\pm$ 0,74 ^c	17,82 $\pm$ 0,76 ^{d*}	20,05 $\pm$ 0,90 ^{cd}	25,03 $\pm$ 1,28 ^{b*}	28,75 $\pm$ 0,85 ^{a*}
16 Gy	23,07 $\pm$ 0,99 ^a	22,01 $\pm$ 0,71 ^a	22,08 $\pm$ 1,52 ^a	21,30 $\pm$ 2,07 ^a	20,09 $\pm$ 3,04 ^a
32 Gy	21,83 $\pm$ 0,70 ^a	19,98 $\pm$ 0,91 ^{ab}	18,36 $\pm$ 0,93 ^{bc*}	14,65 $\pm$ 2,41 ^{c*}	15,71 $\pm$ 4,29 ^{bc*}

Par. Basais = Parâmetros Basais

* $p < 0,05$ teste T

Com relação aos dados de hematócrito não houve variação significativa no grupo Controle ao longo do tempo, de acordo com a análise de variâncias e com o teste de comparação de médias. Já no grupo que recebeu a dose de 1 Gy observou-se variação significativa na análise de variâncias ($p < 0,01$), conforme Tabela 9, assim como entre as médias de tratamento ($p < 0,05$), demonstrado pelo teste T, conforme descrito na Tabela 8. Foram observadas diminuição nos 14º, 21º e 28º dias em relação aos parâmetros basais do grupo.

Tabela 9: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 1 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	362,96	90,74	5,29**
Resíduo	60	1029,70	17,16	
Total	64			

** significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$)

F crítico = 3,65

Constatou-se também, no grupo que recebeu a dose de 2 Gy, variação significativa ($p < 0,01$) no teste F, conforme Tabela 10 e ($p < 0,05$) no teste T, de acordo com a Tabela 8, entre as médias de tratamento, com diminuição no 7º e 14º dias em relação aos parâmetros basais do grupo.

Tabela 10: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 2 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	296,24	74,06	4,39**
Resíduo	58	977,82	16,86	
Total	62			

** significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$)

F crítico = 3,66

No grupo que recebeu a dose de 4 Gy observou-se variação significativa ($p < 0,01$) no teste F, Tabela 11, e ($p < 0,05$) no teste T, Tabela 8, entre as médias de tratamento, diminuição no 7º dia em comparação aos parâmetros basais do grupo, e um aumento no 28º dia.

Tabela 11: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 4 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	470,65	117,66	9,39**
Resíduo	52	651,72	12,53	
Total	56			

** significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$)

F crítico = 3,70

Já nos peixes que foram expostos a 8 Gy, verificou-se que, através do teste F ($p < 0,01$), Tabela 12, e do teste T ($p < 0,05$), Tabela 8, diminuição no 7º dia entre as médias de tratamento em comparação aos parâmetros basais do grupo e um aumento nos 21º e 28º dias.

Tabela 12: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 8 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	954,60	238,65	22,75**
Resíduo	62	650,35	10,49	
Total	66			

** significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$)

F crítico = 3,64

No grupo que recebeu a dose de 16 Gy não se detectou variação significativa. Por fim, no grupo irradiado com 32 Gy observou-se variação significativa demonstrada pelo teste F ($p < 0,01$), Tabela 13, e entre as médias de tratamento reveladas pelo teste T ($p < 0,05$), Tabela 8. Observaram-se diminuição nos 14º, 21º e 28º dias em comparação com os parâmetros basais do grupo.

Tabela 13: Quadro de análise de variâncias dos dados de hematócrito de peixes irradiados com 32 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	191,91	47,98	4,57**
Resíduo	38	399,30	10,51	
Total	42			

** significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$)

F crítico = 3,86

Além disso, neste experimento, verificou-se mortalidade na colheita de sangue dos peixes nas diferentes doses de irradiação ao longo do tempo. Nos grupos Controle, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy e 8 Gy a mortalidade foi de aproximadamente 20 % ao longo do experimento. Na dose de 16 Gy a mortalidade foi em torno de 40 % e no grupo exposto a 32 Gy de aproximadamente 86 %.

4.3 Glicemia

A estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da concentração plasmática de glicose (mg/dl) nas tilápias expostas a irradiação nos períodos experimentais, estão apresentadas abaixo (Tabela 14).

Tabela 14: Estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) da concentração plasmática de glicose (mg/dl) nas tilápias expostas à irradiação nos períodos experimentais, comparações entre as médias ao longo do tempo, de acordo com o teste T.

Dose	Dias				
	Par. Basais	7	14	21	28
Controle	47,31 $\pm$ 4,58	48,93 $\pm$ 4,22	45,41 $\pm$ 2,22	45,63 $\pm$ 4,18	41,56 $\pm$ 5,44
1Gy	42,27 $\pm$ 3,60	50,60 $\pm$ 3,86	35,08 $\pm$ 2,61	52,71 $\pm$ 2,24	53,12 $\pm$ 10,25
2Gy	41,24 $\pm$ 3,98	41,58 $\pm$ 2,75	41,90 $\pm$ 1,97	46,73 $\pm$ 3,72	37,61 $\pm$ 2,50
4Gy	48,30 $\pm$ 3,19	42,70 $\pm$ 2,34	31,83 $\pm$ 2,67	29,04 $\pm$ 3,51	40,09 $\pm$ 7,46
8Gy	43,75 $\pm$ 2,94 ^a	41,48 $\pm$ 3,29 ^a	32,45 $\pm$ 3,22 ^{b*}	29,81 $\pm$ 3,04 ^{b*}	29,90 $\pm$ 3,37 ^{b*}
16Gy	46,97 $\pm$ 4,54	62,40 $\pm$ 4,99	68,88 $\pm$ 10,40	100,92 $\pm$ 26,37	258,74 $\pm$ 56,02
32Gy	47,30 $\pm$ 5,41	53,70 $\pm$ 5,80	124,06 $\pm$ 56,21	214,76 $\pm$ 55,41	86,52 $\pm$ 36,01

Par. Basais = Parâmetros Basais

* $p < 0,05$ teste T

Com relação aos dados do grupo Controle, 1 e 2 Gy da concentração plasmática de glicose (mg/dl) detectados nas tilápias do Nilo, não houve variação significativa.

No grupo que recebeu a dose de 4 Gy observou-se variação significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os períodos das colheitas entre os parâmetros basais do grupo com 14 dias e parâmetros basais do grupo com 21 dias (Tabela 15).

Tabela 15: Comparações múltiplas de concentração plasmática de glicose durante os períodos das colheitas, em tilápias do Nilo irradiadas com 4 Gy pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Par. Basais X 7 dias	5,92	17,55	Não
Par. Basais X 14 dias	20,83	19,17	Sim
Par. Basais X 21 dias	22,75	18,66	Sim
Par. Basais X 28 dias	13,33	19,17	Não
7 dias X 14 dias	14,91	18,09	Não
7 dias X 21 dias	16,83	17,55	Não
7 dias X 28 dias	7,41	18,09	Não
14 dias X 21 dias	1,92	19,17	Não
14 dias X 28 dias	7,5	19,67	Não
21 dias X 28 dias	9,42	19,17	Não

Difer. Crít = Diferença Crítica

Par. Basais = Parâmetros Basais

H = 17,17 H crítico = 9,49

Alfa = 0,05

Já nos peixes que foram expostos a 8 Gy, verificou-se a ocorrência de diminuição significativa entre as médias de tratamento nos 14º, 21º e 28º dias em comparação aos parâmetros basais do grupo, através dos testes F ($p < 0,01$), Tabela 16, e T ($p < 0,05$), Tabela 14.

Tabela 16: Quadro de análise de variâncias dos dados de concentração plasmática de glicose de tilápias do Nilo irradiados com 8 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	2517,72	629,43	4,40**
Resíduo	66	9440,73	143,04	
Total	70			

** significativo ao nível de 1 % de probabilidade ($p < 0,01$)

F crítico = 3,62

Nas tilápias que foram expostas a 16 e 32 Gy, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$), Tabelas 17 e 18 ($p < 0,1$) nos períodos das colheitas comparando os parâmetros basais do grupo com 28 dias e parâmetros basais do grupo com 21 dias.

Tabela 17: Comparações múltiplas de concentração plasmática de glicose da tilápia do Nilo entre tratamentos de 16 Gy durante os períodos das coletas pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Par. Basais X 7 dias	10,91	18,48	Não
Par. Basais X 14 dias	9,32	18,48	Não
Par. Basais X 21 dias	15,60	18,94	Não
Par. Basais X 28 dias	26,00	18,94	Sim
7 dias X 14 dias	1,59	18,48	Não
7 dias X 21 dias	4,69	18,94	Não
7 dias X 28 dias	15,09	18,94	Não
14 dias X 21 dias	6,28	18,94	Não
14 dias X 28 dias	16,68	18,94	Não
21 dias X 28 dias	10,40	19,38	Não

Difer. Crít = Diferença Crítica

Par. Basais = Parâmetros Basais

H = 15,79 H crítico = 9,49

Alfa = 0,05

Tabela 18: Comparações múltiplas de concentração plasmática de glicose da tilápia do Nilo entre tratamentos de 32 Gy durante os períodos das colheitas pelo teste de Kruskal-Wallis (H).

Comparação	Diferença	Difer. Crít.	Diferentes
Par. Basais X 7 dias	3,96	11,33	Não
Par. Basais X 14 dias	9,46	11,33	Não
Par. Basais X 21 dias	13,67	13,09	Sim
Par. Basais X 28 dias	8,04	17,31	Não
7 dias X 14 dias	5,5	13,09	Não
7 dias X 21 dias	9,71	14,63	Não
7 dias X 28 dias	4,08	18,51	Não
14 dias X 21 dias	4,21	14,63	Não
14 dias X 28 dias	1,42	18,51	Não
21 dias X 28 dias	5,63	19,63	Não

Difer. Crít = Diferença Crítica

Par. Basais = Parâmetros Basais

Alfa = 0,1

4.4 Eletroforese de Proteínas Plasmáticas

Foi encontrado um total de 9 diferentes bandas protéicas, distribuídas em 4 diferentes padrões. Os valores referentes às mobilidades relativas e aos valores densitométricos, bem como a estatística descritiva estão relacionadas na Tabela 19. Na Figura 4 está representada a variabilidade de padrões eletroforéticos de proteínas plasmáticas encontradas da tilápia do Nilo. Foram detectadas variações individuais de 4 a 7 bandas protéicas: 4,31 % com 4 bandas, 26,08 % com 5 bandas, 17,38 % com 6 bandas e 52,17 % com 7 bandas.

Tabela 19: Estatística descritiva, médias, desvios padrão, variâncias e intervalos de confiança 0,5, dos valores médios basais da posição das mobilidades relativas (rf) e valores densitométricos (%), das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias não submetidas à irradiação gama.

Mobilidade Relativa (rf)					Densitometria (%)			
Bandas	Média	Desv. Pad.	Var	Int. con. 0.5	Média	Desv. Pad.	Var	Int. con. 0.5
r1	0,21	$7,42 \times 10^{-03}$	$5,50 \times 10^{-05}$	$1,12 \times 10^{-03}$	2,96	2,40	5,76	0,36
r2	0,27	$4,18 \times 10^{-03}$	$1,75 \times 10^{-05}$	$6,31 \times 10^{-04}$	9,15	4,19	17,59	0,63
r3	0,34	$1,34 \times 10^{-02}$	$1,80 \times 10^{-04}$	$2,02 \times 10^{-03}$	30,63	2,54	6,45	0,38
r4	0,46	$1,47 \times 10^{-02}$	$2,17 \times 10^{-04}$	$2,22 \times 10^{-03}$	13,95	4,60	21,19	0,69
r5	0,52	$5,48 \times 10^{-03}$	$3,00 \times 10^{-05}$	$8,26 \times 10^{-04}$	16,67	0,87	0,76	0,13
r6	0,58	$1,48 \times 10^{-02}$	$2,20 \times 10^{-04}$	$2,24 \times 10^{-03}$	24,94	2,52	6,36	0,38
r7	0,67	$1,17 \times 10^{-02}$	$1,37 \times 10^{-04}$	$1,77 \times 10^{-03}$	18,55	1,53	2,34	0,23
r8	0,76	$7,07 \times 10^{-03}$	$5,00 \times 10^{-05}$	$1,07 \times 10^{-03}$	10,55	1,59	2,54	0,24
r9	0,94	$4,47 \times 10^{-03}$	$2,00 \times 10^{-05}$	$6,74 \times 10^{-04}$	10,60	1,88	3,55	0,28

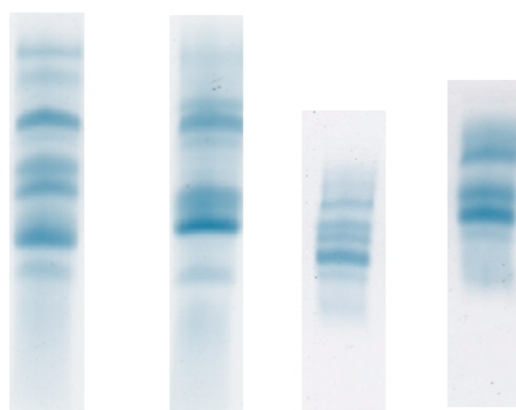


Figura 4: Variabilidade dos padrões eletroforéticos em gel de agarose de proteínas plasmáticas de tilápias do Nilo.

A estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) dos valores médios densitométricos (%) do grupo Controle, separando-as em frações como γ -globulina, α + β -globulina e albumina, estão representadas na Tabela 20. Nestas divisões não houve diferença significativa de acordo com os testes F e T, nos períodos experimentais.

Tabela 20: Estatística descritiva dos valores médios densitométricos (%), das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias do Nilo não irradiadas, nos períodos experimentais.

Controle	Par. Basais	7	14	21	28
γ -globulina (%)	7,18 $\pm$ 1,07 ^a	15,64 $\pm$ 6,79 ^a	14,51 $\pm$ 6,34 ^a	15,51 $\pm$ 3,09 ^a	11,62 $\pm$ 2,43 ^a
α + β -globulina (%)	31,65 $\pm$ 7,55 ^a	29,80 $\pm$ 9,6 ^a	39,10 $\pm$ 5,01 ^a	34,90 $\pm$ 10,4 ^a	43,64 $\pm$ 4,12 ^a
Albumina (%)	60,80 $\pm$ 8,69 ^a	43,08 $\pm$ 8,52 ^a	34,72 $\pm$ 12,98 ^a	49,45 $\pm$ 13,35 ^a	30,65 $\pm$ 17,1 ^a

Par. Basais = Parâmetros Basais

As análises referentes à interação tempo versus dose de radiação mostraram que não houve diferenças significativas entre as doses de 1 à 16 Gy, exceto para a dose de 32 Gy. A estatística descritiva (média $\pm$ desvio padrão da média) dos valores médios densitométricos (%) do grupo exposto a 32 Gy, estão representadas na Tabela 21.

Tabela 21: Estatística descritiva dos valores médios densitométricos (%), das proteínas plasmáticas sanguíneas de tilápias do Nilo irradiadas com 32 Gy, nos períodos experimentais; comparações entre as médias ao longo do tempo, de acordo com o teste T.

32 Gray	Par. Basais	7	14	21	28
γ -globulina (%)	13,34 $\pm$ 3,76 ^a	12,60 $\pm$ 2,82 ^a	25,63 $\pm$ 9,93 ^a	12,69 $\pm$ 5,16 ^a	15,24 $\pm$ 2,98 ^a
α + β -globulina (%)	44,40 $\pm$ 5,51 ^a	51,34 $\pm$ 1,05 ^{ab}	56,47 $\pm$ 13,48 ^{ab}	78,33 $\pm$ 7,43 ^{ab}	82,19 $\pm$ 2,67 ^{b*}
Albumina (%)	38,02 $\pm$ 2,18 ^a	33,51 $\pm$ 1,99 ^{ab}	17,79 $\pm$ 10,49 ^{bc*}	7,83 $\pm$ 3,36 ^{c*}	2,51 $\pm$ 1,23 ^{c*}

Par. Basais = Parâmetros Basais

* p< 0,05 teste T

Quando se realizaram as divisões por frações, não se constatou variação significativa na fração gama-globulinas nos peixes expostos a 32 Gy. Já nas frações alfa + beta-globulinas detectou-se variação (p<0,05) no teste T, entre as médias de tratamento com um aumento no 28º dia (Tabela 21).

Na albumina (%) observou-se uma diminuição gradativa nos tempos experimentais, essa diferença foi detectada pelo teste F ($p < 0,05$) Tabela 22, entre os tratamentos, e ($p < 0,05$) pelo teste T, Tabela 21. Estas diferenças estão ilustradas na Figura 5.

Tabela 22: Quadro de análise de variâncias teste F, dos valores médios densitométricos albumina (%) de tilápias do Nilo irradiadas com 32 Gy.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1932,01	483,00	8,85*
Resíduo	5	272,78	54,56	
Total	9			

* significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$)

F crítico = 5,19

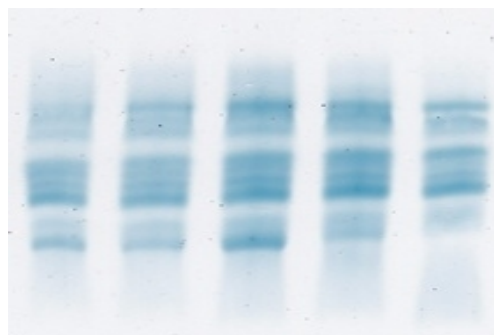


Figura 5: Padrões eletroforéticos em gel de agarose de proteínas sanguíneas de tilápia irradiadas com 32 Gy, nos períodos de parâmetros basais do grupo, 7, 14, 21 e 28 dias.

5 DISCUSSÃO

5.1 Comportamento Alimentar

A diminuição na ingestão do alimento nos peixes expostos a 8 Gy foi observada no período entre o 8º e 14º dias após a irradiação. Nas tilápias expostas a 16 e 32 Gy observou-se o mesmo, porém com permanência até o último período experimental.

Quando oferecido o alimento, os peixes se dirigiam até ele, tentavam degluti-lo, mas não conseguiam, jogando-o para fora repetidas vezes. Não foi evidenciada irritação na mucosa bucal das tilápias expostas a 8 Gy. Acredita-se que a irritação da mucosa neste grupo danificou uma menor quantidade de células em comparação às doses de 16 e 32 Gy.

Provavelmente, o grupo de 8 Gy obteve maior sucesso na reparação dos danos. Se o reparo no DNA é eficiente em tempo curto, o mesmo pode voltar à sua composição original, sem conseqüências posteriores (TAUHATA et al., 2003). Quanto aos grupos submetidos a 16 e 32 Gy, por conta da gravidade das lesões, os efeitos permaneceram.

Sabe-se que a parede do trato digestório dos peixes é histologicamente semelhante à dos vertebrados superiores. Na boca, na faringe e no esôfago existem células mucosas, cuja função é lubrificar grandes partículas de alimento, auxiliando na deglutição (WEATHERLEY; GILL, 1987) e também com a função de proteção (BUDDINGTON et al., 1997).

O esôfago tem presença de musculatura estriada de contração voluntária permitindo, quando necessário, maior capacidade de regurgitar o alimento, devido ao tamanho, textura ou sabor.

A mucosite oral é evidenciada em pacientes que sofrem de tumores de cabeça e pescoço que são submetidos a tratamento quimioterápico e radioterápico (SUTHERLAND; BROWMAN, 2001). Humanos que realizam esse tipo de tratamento com radiação ionizante, se queixam de muita dor. Esse estado gera dificuldade para se alimentar, podendo gerar desnutrição, desidratação prolongada, suscetibilidade a infecções e diminuição da qualidade de vida resultando até em morte do indivíduo

(DISCHE et al., 1997; TEO et al., 1996; CARTER et al., 1999; CENGIZ et al., 1999; TROTTI, 2000).

Trabalhos realizados por Borin et al. (2014), empregando as doses de 40 e 80 Gy, constataram uma irritação na mucosa da tilápia do Nilo com uma maior evidência macroscópica. Por consequência dessa irritação, evidenciou-se a diminuição na ingestão do alimento, sendo uma resposta proporcional à dose. Danos no trato gastrointestinal também são visto em humanos expostos, acidentalmente, de corpo inteiro, a doses entre 5 a 15 Gy (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

Os peixes, no ambiente aquático, estão expostos a agentes infecciosos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários e sua interação pode levar à reduzida sobrevivência ou até morte do animal. Este desempenho depende diretamente da resposta dos sistemas imune inato e específico (BALFRY; HIGGS, 2001).

A superfície do corpo do peixe representa uma barreira mecânica para microrganismos e, nos organismos aquáticos, o muco externo e as superfícies epiteliais internas contêm compostos antimicrobianos que incluem lectinas, complemento, lisozima e peptídeos bactericidas (BALFRY; HIGGS, 2001).

O canal alimentar também atua como uma barreira contra a entrada de microrganismos, pois seu conteúdo de ácidos, sais biliares e enzimas criam um ambiente hostil para microrganismos nocivos. Na maioria dos casos, as barreiras tegumentares são suficientes para proteger do organismo invasor, entretanto, caso este penetre nos tecidos e circulação, ele será reconhecido por componentes celulares e humorais do sistema imune (ELLIS, 1999).

A existência de mecanismos para evitar a entrada e instalação dos microrganismos aumenta a possibilidade de sobrevivência dos peixes (BAYNE; GERWICK, 2001; ELLIS, 2001). Dentre as tilápias que foram submetidas às doses de 16 e 32 Gy, algumas vieram a morrer. Acredita-se que seja por consequência de uma infecção, por suas barreiras físicas estarem vulneráveis.

Comparando com humanos que foram expostos acidentalmente à irradiação, pelo relatório da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) sobre o acidente de Goiânia, ocorreram 4 óbitos, entre eles, 2 pessoas morreram por hemorragia e 2 por

infecção (GRIPPI, 2006; OKUNO, 2007). Nos peixes acredita-se também que a infecção teve como porta de entrada possivelmente a região da mucosa. Em humanos, devido à mucosite, observa-se que 23% dos pacientes apresentavam bacteremias da cavidade oral (SCHIMPFF et al., 1978) aumentando-se o risco de infecções associadas com o aumento da morbidade e mortalidade (EPSTEIN e SCHUBERT, 1999; PLEVOVA, 1999).

Além disso, estudos sobre diferentes tipos de linfócitos humanos parecem indicar que a radiação ionizante diminui a função do linfócito T, produzindo uma condição de imunodeficiência adquirida (ABRAMS, 1986). Em adição, pessoas submetidas à radiações ionizantes possuem baixa resistência imunológica (TAUHATA et al., 2003).

5.2 Hematócrito

Os dados de hematócrito no grupo Controle da tilápia do Nilo apresentaram valores médios em torno de 22,83 %, semelhante a outros estudos como *Trematomus bernacchii* (22,6 7 %), *Echeneis nauchrates L.* (21 %) e *Epinephelus merra Block* (21,9 %) (HUDSON et al., 2008; WELLS; BALDWIN, 1990).

A exposição a diferentes doses de radiação aguda aplicada no corpo todo na tilápia do Nilo promoveu alterações significativas nos dados do hematócrito. Quando se utilizou a dose de 1 Gy na tilápia, ocorreu uma diminuição ao longo do tempo. Ao aumentarem-se as doses para 2 Gy, 4 Gy e 8 Gy, percebeu-se uma diminuição já num período anterior.

Essa resposta à irradiação, assemelha-se aos relatados em humanos que, submetidos as doses de 0,25 à 3 Gy, apresentam uma depleção no sistema hematopoiético (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Nestas doses também se observou uma recuperação ao longo do experimento. Segundo Tauhata et al. (2003), numa exposição à radiação X ou gama, pode ocorrer uma redução de leucócitos, hemácias e plaquetas e, após algumas semanas, tudo retorna aos níveis anteriores de contagem destes elementos no sangue.

Ao observar a resposta dos dados de hematócrito a essas doses, acredita-se que seu efeito é proporcional à dose absorvida, pois quanto maior o tempo de exposição à

radiação, maior será a quantidade de células danificadas. A proporcionalidade da resposta pela dose foi evidenciada na ingestão de alimentos e morte (BORIN et al., 2014) e também em alterações histológicas no fígado (BUKHARI et al., 2012).

Os peixes submetidos a 4 e 8 Gy demonstraram uma capacidade notável de recuperação, e até mesmo um aumento significativo aos parâmetros basais do grupo. As células expostas à irradiação podem morrer ao tentarem se dividir, ou conseguir realizar reparos mediados por enzimas (TAUHATA et al., 2003).

Deve-se mencionar também que existem evidências experimentais relacionando irradiação a baixas doses com o estímulo de determinadas funções celulares. Destaca-se aqui o mecanismo de reparo e o próprio sistema imunológico com vistas ao fortalecimento dos mecanismos de defesa do corpo. Estes efeitos benéficos são conhecidos por “hormesis”, entretanto, em decorrência das dificuldades estatísticas associadas a baixas doses de radiação, são considerados inconclusivos (XAVIER et al., 2010).

No grupo de 16 Gy não ocorreu variação. Já no grupo de 32 Gy ocorreu uma diminuição ao longo do experimento. Nestes grupos citados, acredita-se que a lesão na medula óssea tenha sido muito severa, pois os peixes demonstraram uma mortalidade na colheita de sangue de 20 % no grupo de 16 Gy e 66 % no grupo de 32 Gy a mais que o Controle e as demais exposições. A colheita de sangue em tilápias, quando realizadas por punção cardíaca no período entre 2 e 3 minutos, não promove morte dos animais em decorrência deste procedimento (DELICIO; VICENTINI PAULINO, 1993).

Em humanos o dano na medula óssea se torna presente em exposições a doses de 3 a 5 Gy, com tempo de sobrevida entre 30 a 60 dias (OKUNO; YOSHIMURA, 2010). Dados obtidos em estudos realizados por Borin et al. (2014) revelaram mortalidade em torno de 62 % no grupo exposto a 40 Gy e 100 % nos peixes expostos à dose de 80 Gy, no período do 8º ao 18º dias.

5.3 Glicemia

Os níveis de glicemia obtidos pelo experimento no grupo Controle da tilápia do Nilo apresentaram valores médios em torno de 45,18 mg/dl, semelhante a outros

estudos que ficam em torno de 44,00 mg/dl no Matrinchã (*Brycon amazonicus*) (URBINATI et al., 2004), 45,00 mg/dl, em jundiá (*Rhamdia quelen*) (BARCELLOS, 2001) e 46,19 mg/dl em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (DELICIO; VICENTINI PAULINO, 1993).

Nos grupos expostos a 4 e 8 Gy, acredita-se que essa diminuição tenha ocorrido por conta da quantidade de células danificadas no hepatopâncreas pela irradiação e comprometimento do tecido sanguíneo, conforme descrito acima. A exposição do peixe de água doce *Oreochromis mossambicus* ao ^{60}Co , nas doses de 3 mGy, 30 mGy e 300 mGy, resultou em diversas variações histológicas no fígado (BUKHARI et al., 2012).

Nas doses de 16 e 32 Gy a glicemia apresentou aumento significativo. De fato, o estresse tem sido reportado em elevar os níveis plasmáticos de cortisol e glicemia (MARTINEZ-PORCHAS et al., 2009). Alguns estudos relacionam a alta taxa de glicemia no sangue com infecções (PATTERSON et al., 1995; COLLIN et al., 1998; MANGAN et al., 2000).

5.4 Eletroforese de Proteínas Plasmáticas

No fracionamento de proteínas plasmáticas em tilápia do Nilo, constataram-se diferentes padrões na mesma espécie, essa condição dificultou as análises em comparação aos tempos experimentais. Por esse motivo, foram utilizadas divisões entre γ -globulina (%), $\alpha + \beta$ -globulina (%) e Albumina (%) (MELO et al., 2009).

Na porcentagem da fração albumina, com os peixes expostos a 32 Gy, observou-se uma diminuição ao longo dos tempos experimentais. A albumina é extremamente sensível a lesões/doenças hepáticas, sua síntese pode ser modificada de acordo com os nutrientes ingeridos, alterações hormonais e mudanças no metabolismo hepático, além do estresse (HASEGAWA et al., 2002).

Considerando-se que no grupo experimental em questão percebeu-se o aparecimento de uma irritação na mucosa oral que, por consequência, gerou uma diminuição na ingestão de alimento, este evento possivelmente está relacionado com a alteração na fração da albumina. Além disso, acredita-se que as células do fígado também possam estar danificadas, pois, em estudos histológicos em peixes expostos à

radiação gama, observou-se um aumento de vacúolo (BUKHARI et al., 2012), esta condição é geralmente acompanhada por atrofia nuclear (HIBIYA, 1982) estando relacionada com inibição da síntese de proteína e esgotamento de energia (HINTON; LAUREN, 1990).

Foi constatado também um aumento nos valores densitométricos da fração alfa + beta-globulina. O aumento, da fração alfa-globulina por si só, não tem muita validade quando se considera a clínica em mamíferos. Usualmente, obtém-se esse tipo de resposta em situações referentes a inflamações agudas (THRALL, 2007). Porém, diminuição das albuminas e aumento da alfa + beta-globulinas, quando ocorrem em humanos, revela a presença de infecções, processos inflamatórios e imunológicos (MACPHERSON, 1999; LARSON, 1974; GUIMARÃES; GUERRA, 1983).

6 CONCLUSÕES

A diminuição da ingestão de alimentos observada se deveu à ocorrência de uma irritação na mucosa oral, em doses mais elevadas de radiação.

O hematócrito foi a variável mais sensível aos efeitos da radiação estudada neste trabalho, considerando que apenas um grupo não apresentou variação significativa.

Os níveis glicêmicos variam de acordo com as doses de radiação gama em função do tempo.

Existem diferentes padrões eletroforéticos de proteínas plasmáticas em tilápias do Nilo. Elevadas doses de radiação gama podem, em função do tempo, provocar alterações metabólicas que modificam os padrões das diferentes classes protéicas.

E por fim, a tilápia do Nilo demonstrou-se resistente às doses de 1 a 8 Gy, possivelmente devido à eficiência do sistema de reparo. No grupo de 16 a 32 Gy, a causa da mortalidade foi, possivelmente, infecção por agentes oportunistas e susceptibilidade do sistema imune.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAMS, H. L. How radiation victims suffer. Chernobyl, the emergency story. *Bulletin of the Atomic Scientists*, v.43. p.13-14. Aug.-Sept. 1986
- ADAMANTE, W. B. *Estresse de alevinos de dourado e mandi sob diferentes densidades e tempos de transporte*. 2005. 39 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Santa Catarina. 2005.
- BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A., Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: *Nutrition and Fish Health*. New York: Webster editors. 2001. p 213-225.
- BARTON, B. A.; Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Interactive and Comparative Biology*. v. 42, p. 517-525, 2002.
- BARCELLOS, L. G.; SOUZA, S. M. G.; LUCERO, L.F. Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 24, p. 239-245, 1997.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture Research*, v. 32, p. 121-123, 2001.
- BAYNE, C. J.; GERWICK, L. The acute phase response and innate immunity of fish. *Development and Comparative Immunology*, v. 25, p. 725-743, 2001.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D.,. *Bioestatística*. São Paulo, Editora Pedagógica Universitária. 1980, p 325.
- BORIN, F. H. R. et al. Changes in feed intake, weight, body size and appearance of lesions in tilapias (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus, 1759) subjected to gamma radiation- In: 60TH INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY – ICoMST, 2014 Punta del Este. *Resumos...* Punta del Este 2014. P. 214.

BUDDINGTON, R. K.; KROGDHAL, A.; BAKKE-MCKELLEN, A. M. The intestine of carnivorous fish: Structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica* v. 161, p. 67-80, 1997.

BUKHARI, A. S. et al. Histological variations in liver of freshwater fish *Oreochromis mossambicus* exposed to ^{60}Co gamma irradiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, v. 113, p. 57-62, 2012.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. In: AQUICULTURA BRASIL '98, 1998, Recife. *Anais...* Recife, 1998. v.2, p. 609-620.

CARNEIRO, P. C. F.; MARTINS, M. L.; URBINATI, E. C.. Effect of sodium chloride on physiological response and the gill parasite, *Piscino odinium* sp., in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. *J. Aquac. Trop.*, v. 1, n. 4, p. 337-348, 2002.

CARTER, D. L. et al. Double blind randomized trial of sucralfate vs placebo during radical radiotherapy for head and neck cancers. *Head Neck.*, v. 21, p. 760-766, 1999.

CENGİZ, M. et al. Sucralfate in the prevention of radiation-induced oral mucositis. *J Clin Gastroenterol*, v. 28, p. 40-43, 1999.

COLLIN, H. L. Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*, v. 69, p. :962-6, 1998.

CONTE, F. S., Stresse and the welfare of culture fish. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 86, p. 205-223. 2004.

CORREIA, A. S. et al. Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, n. 12, p. 1725-1731, 2003.

DELICIO, H. C.; VICENTINI PAULINO, M. L. 2 desoxyglucose induced food intake by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 26, n. 3, p. 327-331, 1993.

DISCHE, S. et al. A randomized multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol*, v. 44, p. 123-136, 1997.

DOYON, C. et al. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are elevated in the preoptic area of socially subordinate rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, v. 133, p. 260-271, 2003.

DURÁN, J. E. R., *Biofísica, Fundamentos e Aplicações*, São Paulo; Prentice Hall, 2003, 318p.

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

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

EPSTEIN, J. B.; SCHUBERT, M. M. Oral mucositis in myelo-suppressive cancer therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 88, p. 273-76, 1999.

FEATHERSTONE, S. Andorinhas de Fukushima. *Scientific American Brasil*, v. 12, n. 154, p. 60-67. 2015.

GOMES, L. C. et al. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquac. Soc.*, v. 34, n. 1, p. 76-84, 2003.

GREGORY, T. R.; WOOD, C. M. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behavior, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 72, n. 3, p. 286-295, 1999.

GRIPPI, S. Energia Nuclear: Os Bastidores do Programa Nuclear Brasileiro e seus Reflexos na Sociedade e na Economia Nacional, Rio de Janeiro: Interciência, 2006. 129p.

GUIMARÃES, R. X.; GUERRA, C. C. C. *Clínica e Laboratório: Interpretação Clínica De Provas Laboratoriais*. 3a ed., São Paulo, Sarvier, 1983, p.147-64.

HASEGAWA, M. Y., FONTEQUE, J. H., KOHAYAGAWA, A. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus Gallus domesticus*) da linhagem Avian Farm. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 4, p. 203- 207, 2002.

HIBIYA, J. *An Atlas of fish histology: Normal and pathological conditions*. New York: Kodansha Ltd Gustav-Fisher- Verlag, Stuttgart, 1982, p. 82-98.

HINTON, D. E.; LAUREN, D. J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. *Am. Fish. Soc. Symp.*, v. 8, p. 51-66, 1990.

HUDSON, H. A. et al. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic Wsh, *Trematomus bernacchii*. *Polar. Biol.*, v. 31, p. 991-997, 2008.

IAEA, International Atomic Energy Agency. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: an international code of practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water. Technical Reports Series no. 398. Vienna: II-179. 2000

ICRP-2007, anexo A. Biological and epidemiological information on health risks attributable to ionizing radiation: a summary of judgments for the purposes of radiological protection of humans. Published for The International Commission on Radiological Protection by Elsevier. *Annals of the ICRP*, v. 37, p. 2-4, 2007.

ISHIKAWA, M. M. et al. *Procedimentos Básicos para Colheita de Sangue em Peixes*. Circular Técnica. Dourados, Mato Grosso do Sul: EMBRAPA, 2010, 7p.

JOBLING, M.; WANDSVICK, A. Effect of social interactions on growth rates and conversion efficiency of Arctic charr, *Salvelinu salpinus* L. *Journal of Fish Biology*, v. 22, p. 577-584, 1983.

KLINGER, R. E.; BLAZER, V. S.; ECHEVARRIA, C. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, v. 47, p. 225-253, 1996.

KRIEGER-AZZOLINI, M.H., et al. A time-course study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). *Braz. J. Med.Biol. Res.*, v. 22, p. 1019-1022, 1989.

- LARSON P. H. Serum proteins: diagnostic significance of electrophoretic patterns. *Hum Pathol.* **Nov**; v. 5, n. 6, p. 629-40, 1974.
- LUMLERTDACHA, S. et al. Growth, hematology, and histopathology of *channel catfish*, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. *Aquaculture*, v. 130, p. 201-218, 1995.
- MACPHERSON R. A. et al. Proteínas específicas. In: HENRY J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 18 ed. São Paulo: Manole: 1999. p. 245-60.
- MANGAN, D.; SELWITZ, R. H.; GENCO, R. Infections associated with diabetes mellitus. *N Engl J Med*, v. 342, p. 896, 2000.
- MARTINEZ-PORCHAS, M.; MARTINEZ-CORDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and glucose: reliable indicators of stress. *Pan Am J Aquat Sci*, v. 4, p. 158–178, 2009.
- MARTINS, M. L. et al. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, Paraná, v. 22, n. 2, p. 545-552, 2000.
- MARTINS, M. L. et al. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. *Rev. Ictiol., Corrientes*, v. 9, n. 1-2, p. 25-31, 2001.
- MARTINS, M. L. et al. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 195-204, 2002.
- MELO, D. C. et al. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 5, p. 1183-1190, 2009.

- MOSCONI, G.; CARDINALETTI, G.; CAROTTI, M. Neuroendocrine mechanisms regulating stress response in cultured teleost species. In: REINECKE M.; ZACCONE G.; KAPOOR B. G. 492 *Fish Physiol Biochem* v. 37, p. 485–493, 2011. (eds) *Fish Endocrinology*, v. 2. Science Publisher, Enfield, NH, USA, p. 693–720, 2005.
- MOURA, M. A. F.; FARIAS, I. P.; VAL, A. L. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 27, p. 1589-1598, 1994.
- NAVARRO, F. K. S. P. Efeito do fotoperíodo na atividade locomotora e parâmetros fisiológicos em fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*). 2010. 79p. (Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, 2010.
- NOAKES, D. L. G., & LEATHERLAND J. F. Social dominance and interregional cell activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Pisces, Salmonidae). *Environmental Biology of Fishes*, v. 2, p. 131-136, 1977.
- OKUNO, E.; YOSHIMURA, E., 2010. *Física das radiações*. São Paulo: Oficina de Textos, 2010. 296p.
- OKUNO, E. *Radiação: Efeitos, Riscos e Benefícios*, São Paulo: Harbra, 2007. 69p.
- PATTERSON, J. E.; ANDRIOLE, V. T. Bacterial urinary tract infections in diabetes. *Inf Dis Clin N Amer*, v. 9, p. 25-51. 1995
- PLEVOVA, P. Prevention and treatment of chemotherapy and radiotherapy-induced oral mucositis: a review. *Oral Oncol*, v. 35, p. 453-70. 1999.
- PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. *Manual de Piscicultura Tropical*. Brasília: IBAMA, 1994. 196p.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; & GODINHO, H. M. Hematological characteristics of the curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 115-120. 1986.

SCHIMPF, S. C.; GAYA, H.; KLASTERSKY, J.; TATTERSAL, M. H.; ZINNER, S. H.; Three antibiotic regimens in the treatment of infection in febrile granulocytopenic patients with cancer. The EORTC international antimicrobial therapy project group. *J Infect Dis*, v. 137, p. 14-29, 1978.

SCHMITTOU, H. R. *Produção de Peixes em Alta Densidade em Tanques-rede de Pequeno Volume*. São Paulo, Mogiana Alimentos S.A., 1995.78p.

SCHRECK, C. Stress and compensation in teleostean fishes: Responses to Social and Physical Factors. *Stress and Fish*. Academic Press, London, UK. 1981. p. 295-321.

SCHUETT, D. A. et al. Hematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*, blood parameters and light microscopy of blood cells. *J Appl Ichthyol.*, v. 13, p. 83–89, 1997.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: *World Congress On Computers In Agriculture*, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 2009.

SILVEIRA, R.; RIGORES, C. Características hematológicas normais de *Oreochromis aureus* em cultivo. *Revista Latina Acuicultura*, v. 39, p. 54-56, 1989.

SUTHERLAND, S. E.; BROWMAN, G. P. Prophylaxis of oral mucositis in irradiated head-and-neck cancer patients: a proposed classification scheme of interventions and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, v. 49, p. 917-930, 2001.

TAUATA, L. et al. *Radioproteção e dosimetria: fundamentos*, Rio de Janeiro: Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2003. 239p.

TAVARES-DIAS, M. et al. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.

THRALL, M. A. et al. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams and Wilkins. 2004.

THRALL, M. A., *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

TEO, P. M.; KWAN, W. H.; LEUNG, S. F. Early tumor response and treatment toxicity after hyper fractionated radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Radiol.*, v. 69, p. 241-248, 1996.

TROTTI, A. Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 47, p. 1-12, 2000.

URBINATI, E. C. et al. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, v. 229, p. 389-400, 2004.

VIJAYAN, M. M. et al. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, v. 116 C, n. 1, p. 89-95, 1997.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. *The Biology of Fish Growth*. San Diego, USA: Academic Press, 1987.

WELLS, R. M. G., & BALDWIN, J. Oxygen transport potential in tropical reef fish with special reference to blood viscosity and haematocrit. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 141, p. 131-143, 1990.

XAVIER, A. M. et al. *Princípios básicos de segurança e proteção radiológica*, 3 ed. rev. ampl., Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2010, 248p.

ZAYAN, R. C. The specificity of social stress. *Behavioural Processes*, v. 25, p. 81-93, 1991.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Editores), *Tópicos Especiais em Psicicultura de Água Doce Tropical Intensiva*, São Paulo: TecArt, 2004, p.239-266.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice 1: Certificado do Comitê de Ética

