UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

RESPOSTAS METABÓLICAS E DOS SISTEMAS IMUNE INATO E ANTIOXIDANTE EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM *Aloe vera* EM PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E PULSADA

Julyana Cristyna da Silva

Zootecnista

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

RESPOSTAS METABÓLICAS E DOS SISTEMAS IMUNE INATO E ANTIOXIDANTE EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM *Aloe vera* EM PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E PULSADA

Julyana Cristyna da Silva

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinárias- Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal no Programa de Pós-Graduação em Ciência animal.

2024

S586r

Silva, Julyana Cristyna da

Respostas metabólicas e dos sistemas imune inato e antioxidante em pacus (Piaractus mesopotamicus) alimentados com dieta suplementada com Aloe vera em protocolo de alimentação contínua e pulsada / Julyana Cristyna da Silva. -- Jaboticabal, 2024

47 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

1. Metabolismo. 2. Sistema imune. 3. Enzimas antioxidantes. 4. Aloe vera. 5. Pacu. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este estudo visa oferecer uma contribuição significativa ao campo da aquicultura, particularmente no que diz respeito à saúde e ao bem-estar dos peixes. Ao demonstrar os efeitos positivos da *Aloe vera* na redução do estresse oxidativo, na modulação da resposta imune e na melhoria do perfil metabólico dos pacus, é possível sugerir a adoção de estratégias similares nos peixes utilizados na aquicultura. Além disso, ao considerar os potenciais benefícios econômicos da utilização de imunoestimulantes naturais, como a *Aloe vera*, acreditamos que nossa pesquisa possa contribuir para o desenvolvimento de práticas mais sustentáveis e economicamente viáveis na indústria da piscicultura. Ao oferecer uma alternativa aos aditivos medicamentosos tradicionais, esperamos que a adoção generalizada dessa prática possa não só melhorar a saúde dos peixes, mas também reduzir os custos de produção. Em resumo, o objetivo geral dessa pesquisa não é apenas ampliar nosso entendimento sobre os benefícios da *Aloe vera* na aquicultura, mas também inspirar práticas éticas, sustentáveis e economicamente viáveis na criação de peixes, contribuindo assim para o desenvolvimento sustentável do setor e para o bem-estar geral dos animais e da sociedade. Esta investigação está alinhada com vários Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), incluindo Fome Zero (ODS 2), Saúde e Bem-Estar (ODS 3), Trabalho Decente e Crescimento Económico (ODS 8) e Vida Abaixo da Água (ODS 14).

THE POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study aims to offer a significant contribution to the field of aquaculture, particularly concerning the health and well-being of fish. By demonstrating the positive effects of Aloe vera in reducing oxidative stress, modulating immune response, and improving the metabolic profile of pacus, the data suggest the adoption of similar strategies in fish farmed aquaculture. Furthermore, considering the potential economic benefits of using natural immunostimulants such as Aloe vera, we believe our research can contribute to the development of more sustainable and

economically viable practices in the fish farming industry. By providing an alternative to traditional medicinal additives, we hope that widespread adoption of this practice can not only improve fish health but also reduce production costs. In summary, the overarching goal of this research is not only to expand our understanding of the benefits of Aloe vera in aquaculture but also to inspire ethical, sustainable, and economically viable fish farming practices, thereby contributing to the sustainable development of the sector and the overall well-being of animals and society. This research is aligned with several Sustainable Development Goals (SDGs), including Zero Hunger (SDG 2), Health and Wellbeing (SDG 3), Decent Work and Economic Growth (SDG 8) and Life Below Water (SDG 14).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTAS METABÓLICAS E DOS SISTEMAS IMUNE INATO E ANTIOXIDANTE EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM *Aloe vera* EM PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO CONTÍNUA E PULSADA

AUTORA: JULYANA CRISTYNA DA SILVA
ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Fisiologia e Bem Estar Animal pela Comissão Examinadora:

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

gov.br Documento assinado digitalmente
ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Data: 23/03/2024 13:58:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. MARIANA MALULI MARINHO DE MELLO (Participaçao Virtual)
SESI, Ribeirão Preto-SP

gov.br Documento assinado digitalmente
MARIANA MALULI MARINHO DE MELLO
Data: 04/04/2024 17:27:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. JANESSA SAMPAIO DE ABREU RIBEIRO (Participaçao Virtual)
Departamento de Zootecnia e Extensão Rural / Universidade Federal do Mato Grosso

gov.br
JANESSA SAMPAIO DE ABREU RIBEIRO
Data: 26/03/2024 12:18:09-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Jaboticabal, 23 de março de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Julyana Cristyna da Silva, filha de Carlos Alberto Silva e Odilza Ana da Costa Silva, nasceu em 16 de novembro de 1998, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Em 2016, ingressou no curso de Bacharelado em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), onde obteve o título de Zootecnista em março de 2022. Em janeiro do mesmo ano, deu início ao mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, dedicando-se à área de Fisiologia de peixes, com foco no sistema imunológico e antioxidante.

DEDICATÓRIA

Aos pilares da minha existência, Carlos, Odilza e Junior. A bússola que me guiou durante essa trajetória e a âncora que me mantém sempre firme.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família, Odilza, Carlos e Junior, a quem devo tudo que sou. Obrigada por estarem comigo em cada etapa, comemorando as alegrias e dando suporte nos piores momentos. Em especial ao meu irmão, por me incentivar a entrar nesse desafio, me mostrando que sou capaz e que *"o caminho é árduo. Por vezes solitário, mas gratificante*", sem o seu apoio nada disso seria possível. Meu amor e admiração por vocês é imensurável!

Agradeço ao meu suporte emocional, minha alegria, melhor amigo, companheiro e confidente, Luiz Matheus. Você é singular, sinônimo de pureza e amor! Obrigada pela paciência, por todo companheirismo, por me mostrar o meu verdadeiro valor, me fazer sentir tão amada, pelas infinitas vídeos chamadas como tentativa de aliviar a dor da saudade. Você tornou essa caminhada menos solitária, te amo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati. Obrigada por todo apoio, incentivo! Por ser tão humana, compreensiva e entender sobre os nossos limites emocionais. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada e por realizar este trabalho. A senhora é especial e sempre será lembrada com muito carinho.

Agradeço a Raíssa Ribeiro, Adriane Bido, Welitom Vilhalba, Júlia Diez e Karol Delgado. Obrigada por todos ensinamentos, risadas, desabafos e apoio, vocês tornaram a caminhada mais leve e descontraído!

Á Thais Lucato, por me receber na cidade e ajudar muito nas atividades diárias do experimento, análises e estatística.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE), Allana Feitoza, Aurea Veras, Fabio Gonçalez, Yasmin (Suzi), Camila Faria e Damares Perecim. Obrigada por toda ajuda durante as coletas e análises.

Aos colegas do Caunesp, Thaise Mota, Douglas (Dadinho), Magdiel, Daniel,Hélio e Raphael, obrigada por toda ajuda sempre que precisei!

Agradeço também ao Valdecir Lima e Marcio Reche pela coleta e transportedos peixes do experimento e outros apoios que foram fundamentais.

Ao Prof. Dr. Leonardo Susumo Takahashi, pela disponibilização de materiais utilizados neste experimento. Ao Prof. Sergio, por disponibilizar o

Laboratório deReprodução de peixes inúmeras vezes para as análises.

Agradeço por toda ajuda aos funcionários do Departamento Fisiologia e Morfologia Animal, Ângela, Euclides e Rodrigo.

À Dra. Mariana Malluli, Dr. Raphael Barbetta, Prof. Dr. João Batista e Profa. Janessa por compartilharem o seu conhecimento e por todas as contribuições no projeto e qualificação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

CEUA I

RESUMO II

ABSTRACT IV

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 2

2.1 PACU (*PIARACTUS MESOPOTAMICUS*) 2

2.2 SISTEMA IMUNE 4

2.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE 6

2.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) 7

2.5 *ALOE VERA* COMO IMUNOESTIMULANTE EM PEIXES 8

2.6 ESTRATÉGIA ALIMENTAR – ALIMENTAÇÃO PULSADA 10

3. OBJETIVO 10

4. MATERIAL E MÉTODOS 10

4.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 11

4.2 PREPARAÇÃO DAS DIETAS 12

4.3 COLETAS E ANÁLISES 12

4.4 ANÁLISES METABÓLICAS 13

4.4.1 ANÁLISES METABÓLICAS SANGUÍNEAS 13

4.4.2 CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO 14

4.4.3 CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDIO HEPÁTICO E MUSCULAR 14

4.5 BIOMARCADORES DE IMUNIDADE 15

4.5.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS 15

4.5.2 CONCENTRAÇÃO DE LISOZIMA 15

4.5.3 ATIVIDADE DO SISTEMA COMPLEMENTO 16

4.6 PERFIL DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CIRCULANTES....16
4.7 BIOMARCADORES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE....17
4.7.1 CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA HEPÁTICA....17
4.7.2 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD),....17
4.7.3 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)....18
4.7.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)....18
4.7.5 CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)....18
4.7.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA....18
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA....19
5. RESULTADOS....19
5.1 INDICADORES METABÓLICOS SANGUÍNEOS E TECIDUAIS....19
5.1.1 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE....19
5.1.2 CONCENTRAÇÃO SANGUÍNEA DE TRIGLICERÍDEOS, COLESTEROL E PROTEÍNAS TOTAIS....20
5.1.3 CONCENTRAÇÃO TECIDUAIS DE GLICOGÊNIO E LIPÍDEO....21
5.1.4 ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS) E GORDURA VÍSCERO-SOMÁTICA (IGVS)....22
5.2 INDICADORES DE IMUNIDADE INATA....23
5.2.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS (ARL), ATIVIDADE SÉRICA DALISOZIMA, ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO SISTEMA COMPLEMENTO (AHC)....23
5.3 PERFIL DE CÉLULAS CIRCULANTES....25
5.3.1 HEMATÓCRITO (HCT), NÚMERO DE ERITRÓCITO (RBC), VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM)....25
5.3.2 CONTAGEM DIFERENCIAL DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS....26
5.4 INDICADORES DO SISTEMA ANTIOXIDANTE....28

5.4.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT) E GLUTATIONA S-TRANSFERASE 28

5.4.2 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) ... 29

6. DISCUSSÃO 30

7. CONCLUSÃO 36

8. REFERÊNCIAS 36

CEUA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação das respostas do sistema imune inato e do sistema antioxidante em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada"**, protocolo nº 6601/22, sob a responsabilidade da Profa. Dra. 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 14 de setembro de 2022.

Vigência do Projeto	01/10/2022 a 30/11/2023
Espécie / Linhagem	*Piaractus mesopotamicus*
Nº de animais	240
Peso / Idade	50 gramas
Sexo	Indefinido
Origem	Centro de Aquicultura da Unesp - Caunesp

Jaboticabal, 14 de setembro de 2022.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

RESUMO

No contexto diversificado da aquicultura, os peixes enfrentam diariamente uma série de desafios que alteram seu equilíbrio homeostático, gerando desarranjos nos sistemas metabólico, antioxidante e imune. Nesse cenário, estratégias são exploradas para auxiliar na restauração da homeostase, preparando os animais para enfrentar futuros desafios, sejam eles ambientais ou patológicos. Uma dessas estratégias em foco é o uso de imunoestimulantes naturais, como a *Aloe vera*. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar as alterações metabólicas, respostas do sistema imune inato e do sistema antioxidante de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com *A. vera* (1%), em diferentes protocolos, e depois injetados intraperitonialmente com LPS (Lipopolissacarídeo derivado da *Escherichia coli*). Foram utilizados 160 juvenis de pacu (54,71 ± 9,24g), distribuídos em 16 caixas de 100 litros, submetidos a quatro protocolos alimentares ao longo de 29 dias, sendo alimentação contínua com ração comercial, alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias e outra alternada a cada 7 dias. Os peixes foram amostrados para coleta de material biológico após a aplicação dos protocolos e após a injeção de LPS. Os resultados deste estudo mostraram que a suplementação dietária com *Aloe vera* em juvenis de pacu, desafiados com LPS após o período de alimentação de 28 dias, independente do protocolo utilizado, modulou os indicadores estudados. No caso das respostas metabólicas, reduziu as concentrações de lipídeo hepático; no sistema imune, reduziu a atividade respiratória após uma resposta inicial de ativação, ativou a atividade serica da lisozima e hemolítica do sistema complemento, logo após o desafio, e minimizou a linfopenia e

promoveu o aumento de monócitos; por fim, ativou também o sistema antioxidante, aumentando a atividade hepática da SOD, CAT, GST, bem como a concentração do substrato das enzimas, a GSH, reduzindo, por fim, o estresse oxidativo, com menor peroxidação lipídica. Com isso, é possível concluir que, independentemente do protocolo alimentar adotado, a suplementação dietética de *A. vera* (1%) foi benéfica para as respostas imunes e antioxidantes em pacus.

Palavra-chave: Imunidade, Enzimas antioxidantes, Imunoestimulante, Pacu.

ABSTRACT

In the diverse context of aquaculture, fish face a myriad of challenges on a daily basis that disrupt their homeostatic balance, causing disturbances in metabolic, antioxidant, and immune systems. In this scenario, strategies are explored to assist in restoring homeostasis, preparing the animals to face future challenges, whether environmental or pathological. One such focused strategy is the use of natural immunostimulants, such as *Aloe vera*. Thus, this study aimed to evaluate the metabolic alterations, responses of the innate immune system, and antioxidant system of pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) fed with a diet supplemented with *A. vera* (1%), under different protocols, and then intraperitoneally injected with LPS (lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli*). One hundred and sixty juvenile pacus (54.71 ± 9.24g) were used, distributed in 16 tanks of 100 liters, subjected to four feeding protocols over 29 days, including continuous feeding with commercial feed, continuous feeding with commercial feed supplemented with *Aloe vera*; pulsed feeding with commercial feed supplemented with *A. vera* alternated every 15 days and another alternated every 7 days. Fish were sampled for biological material collection after the application of the protocols and after LPS injection. The results of this study showed that dietary supplementation with *Aloe vera* in juvenile pacus, challenged with LPS after a 28-day feeding period, regardless of the protocol used, modulated the studied indicators. In terms of metabolic responses, it reduced hepatic lipid concentrations; in the immune system, it reduced respiratory activity after an initial activation response, activated the serum lysozyme and hemolytic activity of the complement system shortly after the challenge, and minimized lymphopenia while promoting an increase in monocytes; finally, it also activated the antioxidant system, increasing hepatic

activity of SOD, CAT, GST, as well as the concentration of enzyme substrates, GSH, ultimately reducing oxidative stress with lower lipid peroxidation. Therefore, it can be concluded that, regardless of the adopted feeding protocol, dietary supplementation of *A. vera* (1%) was beneficial for immune and antioxidant responses in pacus.

Keywords: Immunity, Antioxidant enzymes, Immunostimulant, Pacu.

1. INTRODUÇÃO

A produção de pescados no ano de 2021 totalizou 841.005 toneladas, parte desse número é resultante da produção de peixes nativos, o que representa no total 31,2%. Desse total, tem-se uma importante participação do tambaqui e pacu (*Piaractus mesopotamicus)* (PEIXEBR, 2023).

Esse crescimento, que se destaca a cada ano, só é possível por meio de ferramentas desenvolvidas que buscam otimizar a produção de peixes. Uma delas é o uso de imunoestimulantes, que visa tornar o animal mais resistentee preparado para os desafios de agentes estressores, aos quais são expostos diariamente. Os imunoestimulantes naturais são ferramentas consideradas economicamente viável, que tem origem das plantas medicinais, como a *Aloe vera* (Bach e Lopes, 2007).

Conhecida popularmente como “Babosa”, apresenta diversas propriedades medicinais benéficas, incluindo propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras e antioxidantes naturais (Hamman, 2008; Rajeswari et al., 2014; Sánchez-Machado et al., 2017). Isso se dá devido as inúmeras substâncias que a compõem. Mais de 200 compostos bioativos foram encontrados no gel de *Aloe vera* (Ahlawat e Khatkar, 2011), como é o caso da vitamina C, E que atuam nos sistemas antioxidante e imune do animal, (Kayet al., 1986; Gomes et al., 2022) de diversos aminoácidos, enzimas e polímeros que conferem à planta suas principais características de ação (Barbosa Filho et. al., 2022).

Entretanto, apesar das características citadas acima, pouco se sabe sobre sua ação em peixes, bem como a melhor forma de administração do extrato da planta em respostas ao metabolismo energético, sistema imune e antioxidante. Dessa forma, se faz necessário o estudo do efeito da *A. vera* administrada na alimentação de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), nestes sistemas biológicos, utilizando diferentes protocolos alimentares como a oferta pulsada e contínua.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu tem uma grande representatividade cultural principalmente nos estados do Centro-oeste e Norte, além de ter grande aceitação em outros estados (Peixe BR, 2022). Tem origem na América do Sul, se distribui pela região neotropical e pode ser encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai. Essa espécie pertence a ordem Characiformes, da família Characidae, subfamília Myleinae e gênero *Piaractus* (Urbinati & Takahashi, 2020). Seu hábito alimentar é caracterizado como onívoro, ele se alimenta principalmente de frutas, flores, sementes, folhas e eventualmente de insetos, moluscos e outros peixes disponíveis no ambiente (Bicudo et al., 2016).

No seu ambiente, o pacu é exposto a diversos desafios diariamente. Como variações na qualidade físico-química da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade) que podem exercer uma série de respostas fisiológicas que desencadeiam diversas respostas prejudiciais ao seu desempenho e imunidade. Além das descritas anteriormente, em condições de sistemas produção, os peixes de cultivos são expostos a outros agentes estressores como: seleção de indivíduos, transporte, biometrias periódicas, exposição aérea, patógenos, entre outros, todos que podem gerar um impacto ainda maior para integridade do animal quando não executadas da maneira adequada (Barton et al., 2002; Bacchetta et al., 2020).

Frente a condições estressoras, o organismo do peixe passa por uma série de reações com o intuito de contornar aquele desafio, se adaptar e manter a sua integridade e homeostase, o que caracteriza o processo de estresse (Wendelaar Bonga, 1997). Quando o animal reconhece o agente estressor, inicia uma série de reações no sistema nervoso central (SNC) por duas diferentes vias ou eixos que caracterizam a resposta primária. Inicialmente, através das fibras simpáticas, ocorre o estímulo das células cromafins (localizadas no rim cefálico) que liberam catecolaminas. Em seguida, é ativado o eixo do hipotálamo, o qual irá produzir e liberar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a liberação de corticotropina (ACTH) na hipófise, que, por sua vez, estimula as células

interrenais para liberação de glicocorticoides (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

Os glicocorticoides (cortisol) e catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) são os responsáveis por iniciar a resposta secundária, marcada como a fase em que o animal tenta se adaptar à condição adversa e ativa mecanismos de ajuste como forma de restabelecer a homeostase, por meio do aumento do fluxo e permeabilidade branquial, aumento no número de eritrócitos, concentração glicose plasmática e batimentos cardíacos (via catecolaminas) ou redução da proteína muscular e da função imune e aumento do glicogênio hepático (via glicocorticoides). Todos esses processos irão garantir energia e oxigenação para os tecidos se manterem durante o desafio causado pelo agente estressor (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati etal., 2014).

Em situações em que o agente estressor atua de modo constante ou por longos períodos, as respostas secundárias deixam de ser benéficas e com caráter adaptativo e passam a ser disfuncional de modo a causar inúmeros danos como a piora nos parâmetros de desempenho e reprodução, prejuízosà saúde do animal como comprometimento do seu sistema imune é comprometido (Mommsen et al., 1999; Urbinati e Carneiro, 2004).

O excesso de cortisol na circulação sanguínea é o fator resultante do comprometimento do sistema imune do animal. O mesmo, é capaz de prejudicaro funcionamento de órgãos linfopoieiticos (fígado, baço e rim), assim diminuir a produção de células brancas e linfócitos (Ellis, 1981; Ellsaesser e Clem, 1987). Para garantir o bom funcionamento desse sistema, outro importante mecanismo é levado em consideração, o metabolismo energético.

O metabolismo energético é o mecanismo responsável por garantir substratos para sustentar o bom funcionamento dos demais sistemas fisiológicos (Godoy et al., 2008), pois a partir dele ocorrem as primeiras alterações e adaptações após os desafios. O metabolismo energético e a mobilização de diferentes reservas energéticas são indicadores da condição fisiológica do animal e de como ele irá enfrentar a adversidade (Gimbo,et al.,2015).

2.2 Sistema imune

Um importante sistema biológico responsável pela preservação da saúde do animal é o sistema imune, composto por uma série de estratégias que visam preparar o organismo contra a ação de patógenos, toxinas e microrganismos que, de alguma forma, possam prejudicar o seu equilíbrio interno (Bayne e Gerwick, 2001; Tizard, 2002).

O sistema imune possui dois componentes: inato e específico. Ambos apresentam o mesmo fundamento, que consiste no reconhecimento do corpo estranho e na defesa realizada pela ação em conjunto entre células e fatores humorais, os quais irão eliminá-los ou realizar a ativação de um próximo mecanismo de defesa (Secombes e Wang, 2012). A diferença é que o inato é acionado imediatamente diante do agente estranho e o específico em reinfecção, quando a memória da resposta é ativada.

O sistema imune inato é composto por parâmetros físicos, humorais e celulares, que em conjunto formam a primeira barreira que age de forma rápida contra a presença de patógenos e componentes estranhos ao corpo. O parâmetro físico é o tegumento: associação da pele, escamas e muco, queage como uma proteção física e recobre todo o corpo do peixe (Dalmo et al., 1997; Urbinati et al., 2014). Além disso, o muco protege também as brânquias e o epitélio do trato gastrointestinal (TGI). Essa proteção só é possível devido a composição do muco, que contém inúmeras proteínas do sistema complemento, peptídeos bactericidas e lisozima, com ação antimicrobiana, sendo, geralmente, efetivos nesse processo (Ellis, 2001).

Entretanto, quando essa barreira é ultrapassada e o agente consegue atingir tecidos e corrente sanguínea, elas serão reconhecidas e combatidas pelos componentes celulares: trombócitos, leucócitos, macrófagos, granulócitos (neutrófilo, eosinófilo e basófilos) e células citotóxicas (*natural killers*) (Ellis, 2001; Urbinati et al., 2014). Na corrente sanguínea, mais precisamente no soro, os componentes humorais notam a presença da infecção e aumentam suas concentrações com objetivo de conter a

proliferação do patógeno em outros tecidos, vasos e evitar danos. Fazem parte desses componentes humorais: lisozima, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos, proteínas do sistema complemento, transferrina e antiproteases (Ellis, 2001).

A lisozima, componente humoral produzido por leucócitos, normalmente é encontrada em tecidos linfoides, soro, plasma, pele, boca, brânquias e TGI (Murray e Fletcher, 1976; Lie et al., 1989). Tem a capacidade de agir contra parasitas, vírus e é responsável pela lise da parede celular de bactérias gram-positivas. Entretanto, ao agir juntamente com as proteínas do sistema complemento são capazes de destruir também, bactérias gram-negativas. Dessa forma, análises de concentração e/ou atividade de lisozima, permitem determinar a condição imune do animal (Paulsen et al., 2003).

Outro mecanismo importante para o é a atividade respiratória de leucócitos ("burst oxidativo"). Esse processo ocorre devido ao aumento no nível de oxigênio molecular, originado da atividade fagocitária de algumas células, o qual posteriormente será reduzido em H_2O_2 e em sequência de outras Espécies reativas de oxigênio (EROs), substânciascom potencial bactericida e capaz de agir contra patógenos (Rauta et al., 2012; Biller-Takahashi et al., 2015).

As proteínas do sistema complemento, um conjunto de 35 proteínas solúveis no plasma, exercem seu papel a partir da fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação das toxinas liberadas pelas bactérias. Esses mecanismos são ativados a partir de três vias: via clássica, via alternativa e via lectina (Urbinati et al., 2014). Entre todas, a mais comum e mais importante em peixes é via alternativa, a qual é ativada através da identificação de componentes da superfície de microrganismo e é por meio desse mecanismo que se avalia o sistema imune do animal (Yano, 1996). Entretanto, após a ativação das proteínas de cada uma das vias o efeito cascata é o mesmo: lise celular resultado de ações prévias de determinados peptídeos; macrófagos e neutrófilos direcionados para o local da infecção e a inativação das toxinas ou vestígios de parte do antígeno (Holland e Lambris, 2002).

O outro importante mecanismo de defesa é realizado pelo sistema imune adaptativo. Ele se baseia em uma resposta mais lenta ao agente patogênico e sua proteção depende de uma infecção anterior (Carey et al., 1999). Todo esse processo também é arranjado a partir de componentes celulares (linfócitos) e humorais. Essa resposta se inicia após a identificação do patógeno pelas células apresentadoras de antígenos (macrófagos ou células dendríticas) que irão fagocitá-lo e apresentar seus fragmentos para o linfócitoT auxiliar, que irá estimular, por meio de citocinas, a atividade do linfócito T citotóxico para promover a destruição do patógenos e estimular a produção de anticorpos (fagócito e linfócito B) (Cruvinel et al., 2010; Yada e Tort, 2016).

2.3 Sistema antioxidante

Uma das ferramentas que o animal utiliza para manter a homeostase é o sistema antioxidante, responsável pelo mecanismo que inativa os produtos resultantes de processos metabólicos aeróbicos, como a cadeia transportadora de elétrons e oxidação de ácidos graxos. Que geram moléculas com elétrons desemparelhados e significativo magnetismo, as chamadas EROs (Barreiros e David, 2006; Hoseinifar etal., 2020).

Estas moléculas podem variar a sua conformação e a sua reatividade. As espécies reativas mais produzidas diariamente são o ânion superperóxido, radical de hidroxila e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Naturalmente produzidas na mitocôndria em processos metabólicos que envolvem oxigênio, todas estas moléculas têm alta capacidade de se ligar a tecidos, carboidratos, células ou outras moléculas de modo a causar diversos prejuízos ao organismo do animal, até mesmo a morte celular (Burton e Traber, 1990; Barreiros e David, 2006; Hoseinifar et al., 2020). Entretanto, esses danos maiores normalmente ocorrem após o animal passar por condições de estresse, nos quais ele produz uma quantidade maior de espécies reativas que o seu sistema consegue metabolizar e é esse desequilíbrio a principal causa de piores danos (Barbosa et al., 2010).

Ao ocorrer o desequilíbrio na produção de ERO's, uma das alternativas

para ajudar na redução da produção e reatividade dessas substâncias é através da implementação de componentes antioxidantes. Esses componentes muitas vezes são produzidos pelo organismo do animal (mecanismos enzimáticos) ou adquiridos através da dieta (mecanismo não enzimático) (Wang et al. 2013; Franco e Mart ÿnez-Pinilla 2017). O ascorbato (vitamina C), α- tocoferol (vitamina E) e pró-vitaminas A (carotenoides α-caroteno, β- caroteno e criptoxantina), tioredoxina e glutationa. Além de de outros nutrientes, como selênio, zinco, cobre e manganês (Holmgren,1985; Kay et al., 1986; Machlin e Bendich, 1987; Monsen, 2000; Dickinson e Forman, 2002; Mishra et al., 2015; Peña-Llopis et al., 2002); e 2) o mecanismo enzimático, que depende de enzimas específicas atuantes (Birben et al., 2012; Mishra et al. 2015 Hoseinifar et al., 2020). Uma delas é o superóxido dismutase (SOD), responsável por catalisar a formação do peróxido de hidrogênio(H_2O_2) através do ânion superóxido. Esta enzima está presente em todos os tecidos animais e a sua carência pode comprometer a sobrevivência do animal. Nessa cadeia de reações está a enzima catalase, que é capar de degradar o H_2O_2 e produzir moléculas de O_2 e H_2O (Zhang et al., 2004; Dorr et al., 2008).

A glutationa peroxidase (GPX), grupo de enzimas que contêm variações quanto a sua composição e as EROs que serão alvo da degradação (Halliwell e Gutteridge, 1986). De maneira geral, as GPXs são capazes de catalisar diferentes peróxidos: hidroperóxido lipídico, cumeno hidroperóxido e tert-butil hidroperóxido e H_2O_2. Ademais, há outras importantes enzimas que compõem o sistema antioxidante dos peixes, como: glutationa S-transferase (GST), glutationa redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), peroxiredoxinas (Prx), tioredoxina redutase (TrxR), glutaredoxinas (Grx). Cada uma participa de uma forma na quebra e inativação de determinados espécies reativas de oxigênio e sempre busca da plena homeostase (Hermes-Lima, 2004; Bastos et al., 2007).

2.4 Lipopolissacarídeo (LPS)

Uma das formas encontradas como desafio do sistema imune inato e adaptativo do peixe é por meio da administração dos lipopolissacarídeos (LPS) (Swain et al., 2008; Shepherd et al., 2018; Nguyen et al., 2022). Eles são compostos por um polissacarídeo, lipídeo (responsável pela maior ação antigênica) e um núcleo. São parte da estrutura da parede de bactérias gram negativas, como: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas veronii*, *Escherichia coli*, entre outros (Goetz et al., 2004). Ao serinoculado, o LPS é reconhecido e resulta em uma série de respostas inflamatórias como as produzidas quando o organismo reconhece uma bactéria gram negativa (Bi *et al.,* 2018).

Dessa forma, o LPS é uma ferramenta para se estudar o sistema imune de animais sem expô-lo a patógenos (Swain et al., 2008; Shepherd et al., 2018; Nguyen et al., 2022) ou quando estimulados por substâncias ativadoras das respostas do sistema.

2.5 *Aloe vera* como imunoestimulante em peixes

Devido a redução do uso de antibióticos para animais de produção, uma da possíveis alternativas para suprir essa substituição, é o uso de imunoestimulantes, substâncias usadas com intuito de aumentar a imunocompetência do animal e, assim, sua resistência contra doenças e infecções. Elas podem ser encontradas nas formas sintética, química, componentes bactericidas e até naturais/biológicas (Saurabh e Sahoo, 2008).

Os imunoestimulantes encontrados em plantas medicinais ganham cada vez mais espaço no mercado e é objetivo de vários estudos nos últimos anos. Essa preferência se dá devido ao preço, facilidade de acesso, complexo de substâncias químicas benéficas presente na sua composição e sua capacidade de estimulação das respostas imunes do animal (Silva e Fernandes-Junior, 2010), além de participarem como agente antimicrobiano, antioxidantes, promotores de crescimento, estimularem o apetite e controlarem a infestação parasitária, como é o caso do alho (*Allium sativum*), manjericão (*Ocimum basilicum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), gengibre (*Zingiber officinale*), colminho preto (*Nigella sativa*), Babosa (*Aloe vera*), entre

outros (Siwicki et al., 1994; Sakai, 1999; Zanuzzo et al., 2017).

Com uma importante e tradicional participação na cultura das antigas civilizações, a *Aloe vera*, tem inúmeros benefícios medicinais que até hoje estão sendo descobertos. A planta é nativa do sudeste da Índia, da família Liliaceae que apresenta mais de 15 gêneros e 800 espécies diferentes (Stevens, 1999; Habeeb et al., 2007).

Sabe-se que as suas propriedades medicinais são abrangentes, como atividades antiflamatórias, antioxidantes, anticancerígena, imunoestimulantese fungicida. Isso se dá graças às substâncias que compõem sua estrutura como: glicoproteínas, aloe-emodina, lupeol, antraquinona, manose-6-fosfato, polissacarídeos, aloesina, B-sitosterol e outras substâncias como vitaminas, enzimas, açúcares e acemanano (Ascaño et al., 2010). O acemanano é considerado o principal polissacarídeo armazenado na estrutura da *A. vera*. Ele se destaca por sua capacidade de estimular a produção de fibroblastos, macrófagos, fatores de crescimento e produção de colágeno (Krahwinkel e Boothe, 2006).

Estudos com peixes abordam particularmente a ação imunomoduladora da *A. vera*. Juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus)* transportados com adição do extrato de *A. vera* na água apresentaram maior atividade de macrófagos que indica o seu potencial imunoestimulante (Zanuzzo et al., 2012). Em tilápia do Nilo, foi possível observar que a suplementação da babosa juntamente com o extrato de própolis durante 15 dias promoveu maior eficácia contra parasitos (Dotta et al., 2014). Além disso, foi observado por Assis e Urbinati (2020) que pacus suplementados durante 7 dias com *A. vera* apresentaram efeitos redutores de estresse e aumento das respostas no sistema imune inato. Dessa forma, essas evidências confirmam o potencial a *A. vera* na produção aquícola devido ao efeito mititgador do estresse e na ativação do sistema imune de diferentes espécies de peixes (Zanuzzo et al., 2017).

Apesar do número de estudos sobre a ação da *A. vera* em peixes ter aumentado em anos recentes, ainda são poucos e os protocolos experimentais em espécies de peixes são bastante distintos, com doses do produto e tempo de administração diferentes. Assim, é necessário que

estudos sejam desenvolvidos para se estabelecer as melhores estratégias para uso desta planta como suplemento alimentar em peixes, explorando seu potencial imunoestimulante e antioxidante.

2.6 Estratégia alimentar – alimentação pulsada

São várias as estratégias alimentares estudadas com destaque na literatura, desde diferentes níveis de inclusão de ingredientes alternativos, diferentes relações de energia e proteína até a frequência de administração de suplementos alimentares (contínua ou pulsada) (Santos et al. 2013; Tachibana et al., 2020; Ferreira et al, 2021). Por meio de um esquema alimentar que alterna a oferta da dieta suplementada com a dieta controle, como é o caso de alimentação pulsada, testa-se tempo de oferta, a suspensão e possível efeito residual do produto. Sobre isso, de nosso conhecimento, muito poucos estudos foram realizados abordando a estratégia durante a fase larval de “yellow founder” (Rabe e Brown, 2000), em juvenis de tilápia-do-Nilo (Ampham et al., 2019; Tachibana et al., 2020) e no camarão *Litopenaeus vannamei* (Kesselring et al., 2019).

3. OBJETIVO

Com base no exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar respostas metabólicas, do sistema imune inato e do sistema antioxidante em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolos de alimentação contínua e pulsada, com alternância da oferta a cada 15 ou sete dias e, em seguida, desafiados com injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho seguiu os preceitos da Lei 11.794 de outubro de 2008 e normas editada pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp- Câmpus de Jaboticabal-SP, sob o protocolo nº 6601/22.

4.1 Animais e Delineamento Experimental

Um total de 160 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi fornecido pelo Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), com um peso médio de 54,71± 9,24 gramas. Antes do iniciar o experimento os peixes passaram por uma aclimatação ao sistema de 16 caixas de 100 litros com sistema aberto de renovação de água e foram distribuídos 10 peixes por unidade experimental. Neste período, os peixes foram alimentados até a saciedade aparente com ração comercial peletizada às 9:00h e 16:00h.

Eles foram submetidos a quatro tratamentos (4 unidades experimentais/ tratamento) que consistiriam em duas dietas, com suplementação de Aloe vera e sem suplementação (controle) em protocolos de alimentação contínua e pulsada (oferecimento alternado das dietas experimentais em 7 e 15 dias). A programação dos protocolos alimentares durante o período experimental está descrita na Tabela 1. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais até a saciedade aparente, sendo registrado a cada unidade experimental a quantidade de alimento ofertada. Após a aplicação dos protocolos, os peixes foram submetidos a um desafio imunológico, por administração intraperitonial com LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* O26:B6 – Lote 3755) emsolução salina (0,6%) em concentração previamente estabelecida (1,5 mg kg^{-1}) (Mello et al., 2019).

Os parâmetros físicos e químicos da água das caixas foram monitorados semanalmente e permaneceram dentro dos valores indicados para a espécie, o oxigênio dissolvido (5,56± 0,472mg L^{-1}) foi monitorado através do multiparametro, temperatura 29,97± 0,252ºC, amônia não ionizada 0,014± 0,007 mg L^{-1} e submetidos a um fotoperíodo de 12h de claro e 12h de escuro.

Tabela 1. Estratégias para alimentação de juvenis de pacu (*P.*

mesopotamicus) com suplementação pulsada de *A. vera* durante 29 dias.

	Duração do experimento			
Tratamento	**1ª sem**	**2ª sem**	**3ª sem**	**4ª sem**
Contr. Contínua	RC	RC	RC	RC
Aloe Contínua	RC + *A. vera*	RC + *A. vera*	RC + *A. vera*	RC + *A. vera*
Pulsada/ 15	RC	RC	*A. vera*	*A. vera*
Pulsada/ 7	RC	*A. vera*	RC	*A. vera*

RC= ração comercial; Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias.

4.2 Preparação das dietas

As dietas experimentais foram produzidas pela moagem de uma ração comercial extrusada (28% PB e 3.600 kcal EB kg^{-1}) em partículas menores que 0,8 mm. Para o preparo da dieta suplementada houve adição de 1% do extrato em pó de *Aloe vera barbadensis* (MINATURE® Organic Aloe vera powder Batch No.: MI/ALV/001), sendo então, homogeneizada em misturador manual, submetida ao processo de peletização e armazenada a -20,0°C até o momento de sua utilização. A dieta sem suplementação passou pelo mesmo procedimento utilizado no preparo das dietas experimentais, porém sem adição do extrato.

4.3 Coletas e Análises

Após a aplicação dos protocolos por 29 dias, foram selecionados dois peixes por caixa por caixa (n =8/ tratamento). Esses peixes foram anestesiados com benzocaína (50 mg/L, Synth® – Ref. 41592, São Paulo, Brasil), seguido de pesagem, medição e amostragem por punção da veia caudal para coleta de sangue. O sangue foi separado em microtubos de 2 mL com e sem anticoagulantes (heparina e Glistab – Labtest Ref.: 29/29E). Parte do sangue coletado com heparina foi utilizado paraa determinação da Atividade Respiratória de Leucócitos (ARL). Após a coleta, uma alíquota de sangue foi centrifugada para

obtenção do plasma e realização de análises metabólicas (glicose e triglicerídeos).

Parte do sangue total sem anticoagulante foi direcionada para análisedo perfil de células sanguíneas circulantes (Eritrócito, Hematócrito e Volume corposcular médio). Enquanto, a outra alíquota foi armazenada em tubos de vidro em ambiente refrigerado e permaneceram em repouso por 3 horas, após isso sangue foi centrifugado (10 min a 3000 rpm) para retirada do soro. O soro foi utilizado para a análise de Proteína Tota, Colesterol e uma parte foi armazenada a -20ºC para análise da Atividade de Lisozima e a outra armazenada a -80ºC para analise da Atividade do Sistema Complemento.

Os peixes foram eutanasiados com uma alta dose de benzocaína após a coleta de sangue. Parte do músculo foi retirada para análise de Glicogênio e Lipídeo muscular. Em seguida, os peixes foram abertos ventralmente para a das vísceras, que foram pesadas para cálculo do índice Gorduro viscerossomático (IGVS = colocar a fórmula de cálculo). O fígado foi separado das vísceras e pesado para cálculo do índice Hepatossomático (IHS = colocar a fórmula de cálculo). Parte do fígado foi armazenado a -80ºC para avaliações posteriores da concentração de lipídeo e e glicogênio hepático e sistema antioxidante.

Após a coleta basal, os oito peixes restantes de cada unidade foram inoculados intraperitonealmente com LPS e amostrados após 3, 6 e 24 horas (dois por coleta por unidade, n=8/tratamento). Os mesmos procedimentos e análisesmencionados anteriormente foram realizados, com exceção das análises metabólicas (triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, lipídeo hepático e muscular, glicogênio hepático e dos índices Gorduro viscerossomático e Hepatossomático).

4.4 Análises metabólicas

4.4.1 Análises metabólicas sanguíneas

A determinação das concentrações de glicose e triglicerídeos no plasma foi realizada utilizando um Kit comercial da Labtest® (Ref. 133 para glicose e Ref. 87 para triglicerídeos). Já para a porção sérica, as análises incluíram a avaliação

do colesterol e das proteínas totais, utilizando os Kits Labtest® (Ref. 76 e Ref. 99, respectivamente).

4.4.2 Concentração de glicogênio hepático

A concentração de glicogênio no fígado foi medida de acordo com o método de Perry et al. (1988). As amostras de tecido armazenadas a -80 ºC foram descongeladas, homogeneizadas e desproteinizadas com ácido perclóricoa 6%. Para neutralização, foi adicionado carbonato de potássio (3M) à solução. Após centrifugação a 2885 rpm por 15 minutos a 10ºC, o sobrenadante foi hidrolisado com amiloglicosidase e incubado à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, acrescentou-se ácido perclórico 6%, seguido de neutralização com carbonato de potássio (2,25 M). Após centrifugação a 2885 rpm por 10 minutos a 10ºC, a leitura foi realizada com o reagente de cor do kit de glicose, utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240 a 505nm. As concentrações de glicogênio no fígado foram calculadas com base na curva padrão de glicogênio (extraído de fígado bovino, Ref. G0885, Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO) e expressas em porcentagem.

4.4.3 Concentração de lipídio hepático e muscular

Foram utilizadas amostras de fígado e músculo para medir as concentrações de lipídios totais hepáticos e musculares, seguindo a técnica de Frings et al. (1972). Nesse procedimento, os tecidos foram misturados em uma solução de clorofórmio-metanol-água (2:1:0,5). Após a centrifugação a 180 rpm por 5 minutos, identificaram-se três fases usando a técnica da dupla pipeta. As amostras de lipídios foram coletadas e armazenadas em outro tubo, repetindo esse processo três vezes, com a adição de 1 mL de clorofórmio a cada repetição. Os tubos foram secos em estufa a 60ºC para remover o solvente. O resíduo lipídico seco dos tecidos de fígado e músculo foi ressuspenso com 1 mL de clorofórmio. Dessa mistura, 100 µL foram retirados e solubilizados com 200 µL de ácido sulfúrico concentrado a 100ºC por 10 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 5 mL do reagente de fosfovanilina (vanilina 0,6%, ácido sulfúrico

concentrado e água destilada na proporção de 7:12/1, v/v/v) e os tubos foram mantidos em banho a 37ºC por 15 minutos. As absorbâncias foram lidas em uma leitora de microplacas (ThermoPlate Reader MN) a 550 nm. A concentração de lipídios totais nos tecidos foi calculada a partir da curva padrão de ésteres metílicos de óleo de fígado de bacalhau (Sigma Diagnostics INS, St. Louis, MO)e expressa em mg/g.

4.5 Biomarcadores de imunidade

4.5.1 Atividade respiratória de leucócitos

Para avaliar a atividade respiratória dos leucócitos, foi seguido o protocolo proposto por Anderson e Siwicki (1994), com adaptações feitas por Biller-Takahashi et al. (2013). Seguindo essa abordagem, as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas durante o "burst" oxidativo foram quantificadas por meio de ensaio colorimétrico utilizando o corante "nitroblue tetrazolium" (NBT), que, ao reagir com as EROs, formou precipitados insolúveis, resultando em grânulos de formazan de coloração azul escura no interior dos fagócitos, conforme descrito por Klein (1990).

Para conduzir essa análise, foi utilizado 0,1 mL de sangue, ao qual adicionamos 0,1 mL de NBT (Sigma, St Louis, MO, EUA). A solução resultante foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Em seguida, foi adicionado 50 µL da suspensão a um tubo de vidro contendo 1 mL de N, N-dimetilformamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, EUA) e centrifugado a 3000 g por 5 minutos. Durante esse processo, o DMF foi responsável por lisar as paredes celulares dos leucócitos e dos grânulos de formazan, permitindo a liberação do corante NBT reduzido, cuja concentração foi determinada pela leitura da absorvância a 540 nm em um espectrofotômetro.

4.5.2 Concentração de lisozima

A avaliação da concentração de lisozima seguiu o método proposto por Smolelis e Hartsell (1949), com modificações feitas por Zanuzzo et al. (2015), que envolve a lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*. Para

realizar essa determinação, 25 µL de soro de pacu (em duplicata) foram adicionados em microplacas, seguidos 75 µL de tampão fosfato de sódio de 100 µL de suspensão de *M. Lysodeikticus.* A redução da densidade óptica da solução foi medida a cada cinco minutos ao longo de dez minutos (nos momentos inicial, 5 e 10 minutos), foi utilizado um leito de microplacas (ThermoPlate Reader MN) com comprimento de onda de 450 nm. A atividade enzimática foi calculada usando a fórmula: UA = ([lisozima]/0,001) /10.

4.5.3 Atividade do sistema complemento

A execução da atividade hemolítica do sistema complemento seguiu o procedimento delineado por Ferriani et al. (1990) e Polhill et al. (1978), com adaptações propostas por Zanuzzo et al. (2015). Foi determinado cineticamenteo tempo necessário para que as proteínas do sistema complemento de cada amostra de soro lisassem 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para preparar essa solução, amostras de sangue de coelho foram mescladas em uma solução de Alséver (pH 6.1) para a lavagem e separação das células. A mistura foi incubada por 15 minutos em banho-maria a 37°C e submetida a centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm, repetindo esse processo por três vezes. O sobrenadante foi descartado, e as hemácias foram ressuspendidas em TEA – Mg^{2+}. Em uma cubeta de 1 mL, foram pipetados 75 µL de soro, 125 µL de tampão TEA – EGTA /Mg^{2+}/gelatina 0,1%, e 400 µL da suspensão de hemácias. As leituras foram realizadas a cada 20 segundos, durante 20 minutos, a 700 nm, utilizando um espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV -Vis. A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada conforme as diretrizes estabelecidas por Zanuzzo et al. (2017).

4.6 Perfil de células sanguíneas circulantes

O sangue total com heparina foi empregado para a medição do hematócrito (Hct) após ser centrifugado em tubos capilares. A contagem de eritrócitos (RBC) foi conduzida conforme a metodologia delineada por Oliveira et al. (2008), com algumas adaptações. Para tanto, 10 µL de sangue total foi diluído

em 2 mLde Formol-Citrato e misturado suavemente. Posteriormente, a contagem dos eritrócitos (CE) foi realizada em uma câmara de Neubauer em 5 áreas de 0,04 mm2. Os valores obtidos foram inseridos na fórmula: CE x 5 x 10 x 200/1000000ou CE x 10.000/1000000.

Amostras de sangue diretamente da seringa foram empregadas para a elaboração de extensões sanguíneas. Após a secagem, as extensões sanguíneas foram coradas utilizando a técnica de Rosenfeld (1947), para a contagem total e diferencial de leucócitos por método indireto, em que células foramquantificadas a cada 200 leucócitos.

4.7 Biomarcadores do sistema antioxidante

As amostras de fígado congeladas a -80ºC foram utilizadas para determinação das concentrações de proteínas, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), para a determinação das concentrações de glutationa reduzida (GSH) e da Peroxidação lipídica (LPO). 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°C e 13.000 rpm. O sobrenadante foi separado para as análises.

4.7.1 Concentrações de proteína hepática

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-250e 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. Concentração expressa em mg/mL

4.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD),

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com McCord et al. (1969), baseado na inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, a 550 nm. Expresso em U/mg proteína.

4.7.3 Atividade da catalase (CAT)

A avaliação da catalase seguiu a metodologia proposta por Beutler (1975). O princípio desse método envolve a aceleração da rápida decomposição do peróxido de hidrogênio em moléculas menos reativas de O_2 e H_2O pela catalase (CAT). Esse processo é observado pelo decréscimo da absorbância ao longo do tempo, medido a 240nm. Atividade foi expressa em µmol de H_2O_2 min^{-1} mg de $proteína^{-1}$.

4.7.4 Atividade da glutationa S-transferase (GST)

A determinação da atividade da glutationa-S-transferase (GST) seguiu o protocolo estabelecido por Keen et al., (1976). Esse método envolve a formação de complexo entre a glutationa reduzida (GSH) e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB), sendo a leitura realizada a 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína hepática.

4.7.5 Concentração da glutationa reduzida (GSH)

A análise da concentração de glutationa reduzida (GSH) seguiu a metodologia estabelecida por Beutler (1963). O princípio dessa técnica fundamenta-se na reação da glutationa com o DNTB, resultando na formação de um tiolato (TNB) de coloração amarelada. A intensidade da cor está diretamente relacionada à quantidade de GSH presente, sendo que uma cor mais pronunciada indica maior presença de GSH. A leitura foi realizada a 405 nm, e os resultados expressos em nmol/mg de proteína hepática.

4.7.6 Peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada por meio da quantificação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Camejo et al. (1998). Concentrações foram expressas em nmol MDA mg/proteína.

4.8 Análise estatística

O experimento realizado em um esquema fatorial 4x4 (quatro tratamentos e quatro repetições). Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade (Brown-Forsythe). Quando aceitas as premissas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias foi realizada a partir do teste de Tukey (significancia de 5%) pelo software SAS (versão 9.0).

5 RESULTADOS

Durante os 29 dias de aplicação dos protocolos experimentais e da administração do LPS, não houve mortalidade.

5.1 Indicadores metabólicos sanguíneos e teciduais

5.1.1 Concentração plasmática de glicose

Independente do protocolo aplicado, 3 h após a inoculação com LPS houve um aumento significativo das concentrações de glicose plasmática ($p=0,0019$), e os valores reduziram a partir de 6h. Ao comparar os tratamentos em cada tempo de amostragem, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de glicose entre os diferentes protocolos ($p=0,2243$) (Figura 1).

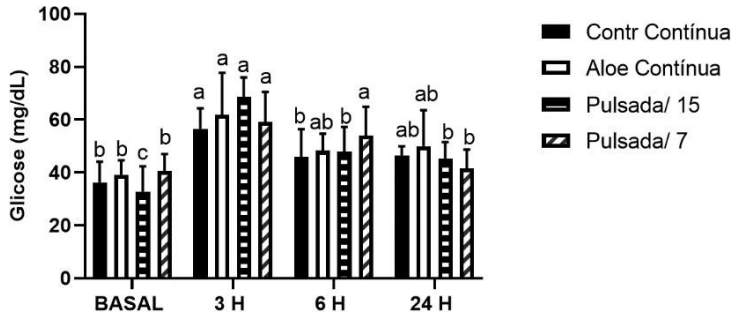

Figura 1. Concentração plasmática de glicose em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada, inoculados como LPS e amostrados 3, 6 e 24 horas após inoculação. Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativa entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

5.1.2 Concentração sanguínea de triglicerídeos, colesterol e proteínas totais

A concentração plasmática de triglicerídeos não diferiu significativamente após a aplicação dos diferentes protocolos alimentares ($p=0,4825$) (Figura 2A). Entretanto, foi observada uma diferença significativa ($p=0,0032$) entre os peixes que receberam alimentação pulsada, sendo que aqueles que tiveramalimentação alternada a cada sete dias (pulsada/7) apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol mais elevadas que aqueles quereceberam alimentação alternada a cada 15 dias (pulsada/ 15), sendo que emambos os protocolos a *A. vera* era oferecida na última semana ou nos últimos 15 dias (Figura 2B).

A concentração sérica de proteínas totais não apresentou diferença estatística após a aplicação dos protocolos alimentares ($p=0,2192$) (Figura 2C).

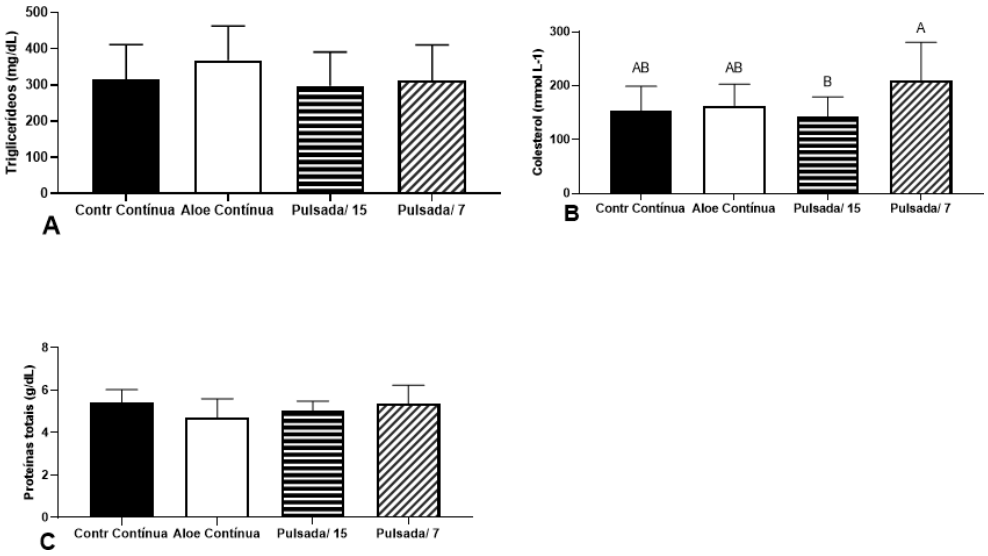

Figura 2. Concentração plasmática de triglicerídeos(A), concentração sérica de colesterol (B)e proteínas totais (C) de juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo: Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativa entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

5.1.3 Concentração teciduais de glicogênio e lipídeo

A concentração de glicogênio hepático (Figura 3A) e de lipídeo muscular (Figura 3C) não diferiu significativamente após a aplicação dos protocolos alimentares ($p= 0,4370$ e $p = 0,8594$, respectivamente), mas a concentração de lipídeo muscular (Figura 3B) foi maior nos peixes que receberam a ração controle continuamente em relação aos que receberam a ração suplementada com A. vera continuamente ($p=0,0451$) (Figura 3B).

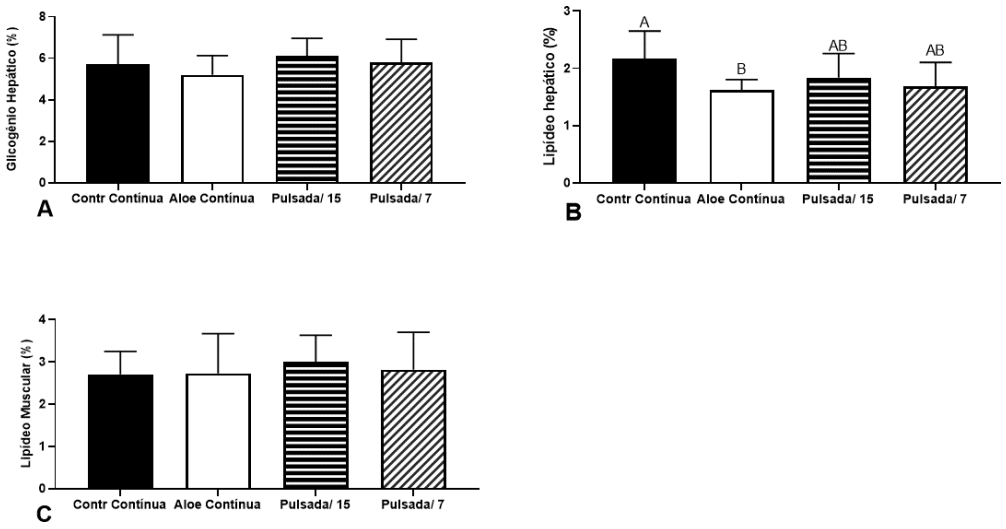

Figura 3. Concentração de glicogênio hepático (A), lipídeo hepático (B) e muscular (C) em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo: Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças significativa entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p<0,05$).

5.1.4 Índice hepatossomático (IHS) e gordura víscero-somática (IGVS)

Os índices morfométricos (IHS e IGVS) não diferiram significativamente após a aplicação dos protocolos alimentares ($p=0,6376$ e $p=0,5727$, respectivamente) (Figura 4).

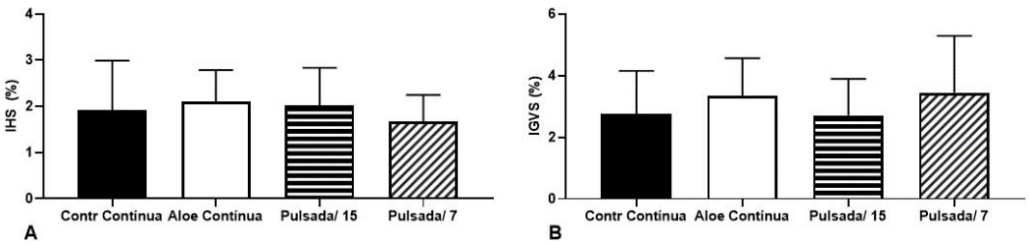

Figura 4. Índice hepatossomático (IHS) (A) e Índice gordura viscero-somática (IGVS) (B) de juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo: Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias.

5.2 Indicadores de imunidade inata

5.2.1 Atividade respiratória de leucócitos (ARL), atividade sérica da lisozima, atividade hemolítica do sistema complemento (AHC)

De modo geral, após o desafio, notou-se um aumento da atividade respiratória de leucócitos em peixes de todos os tratamentos (p=0,0032), exceto no Pulsada/ 7 que permaneceu estável em todas as amostragens. Os peixes submetidos ao protocolo de alimentação contínua com *A. vera* (*Aloe* Contínua) se recuperaram, retornando aos valores basais em 6 h após o desafio (p=0,0006), diferenciando-se dos animais que receberam controle de forma contínua, que mantiveram altos valores de ARL até 24 h (p=0,0866) (Figura 5A).

A atividade de lisozima não diferiu significativamente entre os tempos de amostragem nos peixes alimentados continuamente com a ração controle (Contr. Contínua) (p=0,1741), mas aumentou significativamente a partir de 6h após inoculação com LPS nos peixes alimentados com ração suplementada com A. Vera, de forma contínua (p<0,0001) e pulsada por 7 dias (p=0,0003). Nos peixes alimentados com ração suplementada com A. Vera, de forma pulsada por 15 dias, foi observado maior atividade de lisozima

sérica em 24h após inoculação com LPS (p=0,0034) (Figura5B).

A AHC não apresentou diferenças após a aplicação dos protocolos alimentares (coleta basal), mas a administração intraperitonial do LPS ativou o sistema em peixes do protocolo alimentar de alimentação pulsada a cada 7 dias (Pulsada/ 7) 3 h depois do desafio (p<0,0001). Nesta amostragem, a AHC era maior em todos os protocolos que continham *A. vera* (*Aloe* Contínua, Pulsada/ 15 e Pulsada/ 7) em relação ao protocolo sem o extrato da planta (p<.0001; p=0.0034; p=0.0003). Neste protocolo (Contr Contínua), não houve ativação, mantendo-se em valores basais em todos os tempos de amostragem. Os peixes do protocolo com oferta contínua de *A. vera* (*Aloe* Contínua) exibiram valores mais elevados às 6 h, com retornou aos valores basais às 24 h (p=0,0417). Nos peixes do Pulsada/ 15, houve apenas uma flutuação dos valores da AHC ao longo das amostragens (Figura 5C).

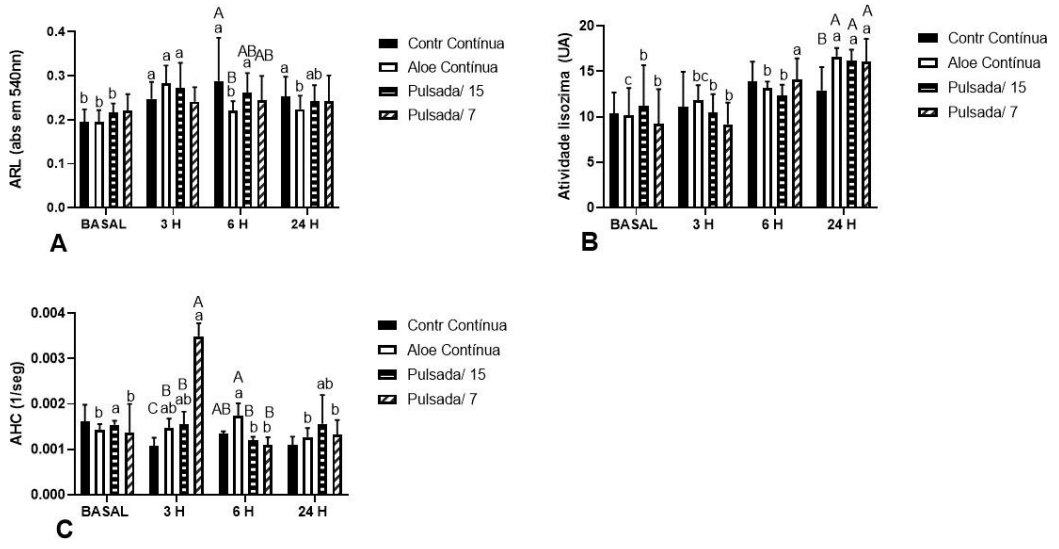

Figura 5. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) (A), atividade sérica da lisozima (B), atividade hemolítica do sistema complemento (AHC) (C), em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada, inoculados como LPS e amostrados 3, 6 e 24 horas após inoculação. Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração

comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento e letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de amostragem ($p<0,05$).

5.3 Perfil de células circulantes

5.3.1 Hematócrito (HCT), número de eritrócito (RBC), volume corpuscular médio (VCM)

Hematócrito teve diferença entre tempos de amostragem para alguns tratamentos (aumentou em 6h após inoculação no tratamento Pulsada/15 e em 24h nos alimentados com a ração controle de forma contínua ($p=0,0183$). Número de eritrócitos diferiu tratamentos no tempo basal (menor número de eritrócitos nos peixes alimentados com a ração controle de forma contínua em relação o suplementados com *A. vera*, de forma contínua ou pulsada) ($p=0,0205$).

VCM diferiu entre tratamento em alguns tempos e entre tempos para alguns tratamentos, apresentram maiores médias nos peixes alimentados com ração controle de forma contínua em relação aos submetidos à alimentação pulsada 15 dias no tempo basal e em relação aos demais tratamentos no tempo 6h. Apenas os peixes submetidos ao protocolo de alimentação pulsada por 15 dias tiveram aumento do VCM 3h após inoculação do LPS, com retorno ao basal em 24h ($p=0,0188$) (Figura 6).

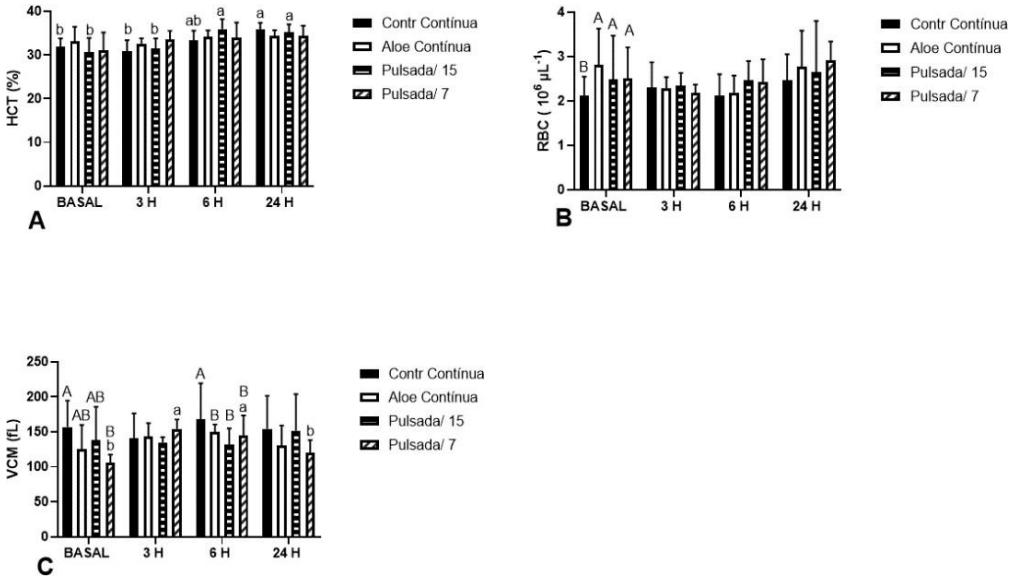

Figura 6. Hematócrito (A), número de eritrócito (B), volume corpuscular médio (VCM) (C) em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada, inoculados como LPS e amostrados 3, 6 e 24 horas após inoculação. Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento e letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de amostragem ($p<0,05$).

5.3.2 Contagem diferencial de células leucocitárias

O número de linfócitos de peixes alimentados com todos os protocolos apresentou redução significativa às 3 e 6 h após o desafio com LPS, seguido de recuperação às 24 h (todos protocolos, $p<0,0001$). No entanto, às 3 h, observa-se os peixes que receberam suplementação com *A. vera*, seja contínua ou pulsada, estão com maior número de linfócitos do que os do Controle contínuo (*Aloe* Contínua, pulsada/ 15 e pulsada/ 7) ($p<0,0001$) (Figura 7A).

Em relação ao número de monócitos, o perfil observado foi inverso ao dos linfócitos. O número de monócitos aumentou 3 h após o desafio com LPS,

mas nesse momento não houve diferença significativa entre os protocolos (p=0,5561). Às 6 h, o número dos monócitos continuou elevado nos peixes que receberam *A. vera*, diferindo dos peixes do tratamento controle (p=0,0256) (Figura 7B).

Em relação ao número de neutrófilos, o aumento ocorreu às 06h em todos os protocolos alimentares, mas, comparativamente entre tratamentos, os peixes alimentados com Aloe vera de forma contínua foram os que apresentaram menor número de neutrófilos (p=0,0496). Às 24 h, de modo geral, houve recuperação no número de neutrófilos aos valores basais, exceto nos peixes do protocolo *Aloe* contínua, cujo número de neutrófilos a permaneceu elevado (Figura 7C).

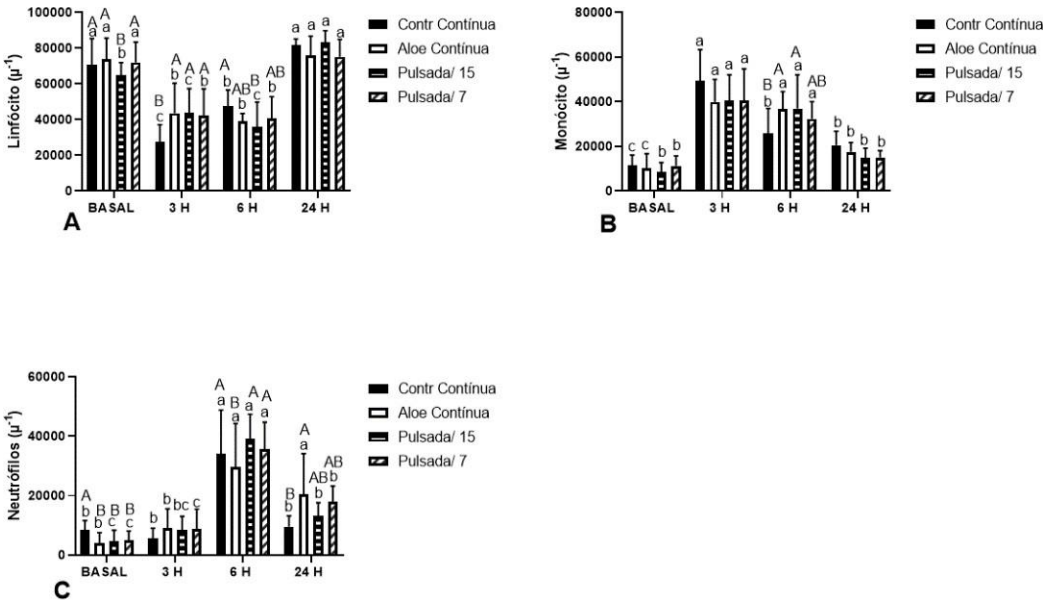

Figura 12. Número de linfócitos (A), monócitos (B) e neutrófilos (C) em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada, inoculados como LPS e amostrados 3, 6 e 24 horas após inoculação. Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras

minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento e letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de amostragem (p<0,05).

5.4 Indicadores do sistema antioxidante

5.4.1 Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa S-transferase

A atividade da SOD, após os 29 dias de aplicação dos protocolos alimentares, diminuiu nos dois protocolos de alimentação pulsada (Pulsada/15 e pulsada/ 7) (p=0,0032) e manteve valores semelhantes até 24 h depois da injeção de LPS (p=0.9628). Após 3h do desafio com LPS, foi verificada maior atividade de SOD, nos peixes dos tratamentos pulsada 15 e pulsada/7 em 3h após inoculação. Nos peixes alimentados continuamente com ração suplementada com A. vera (p=0,0028) e controle (p=0,0012) maior atividade de SOD foi observada, em 6h e 24h, respectivamente (p=0,6191 e p=0,1671) (Figura 8A).

A atividade hepática da CAT foi reduzida nos peixes submetidos a 29 dias ao protocolo alimentar pulsada/7 (p<0,0001). Nos peixes do protocolo controle (Contr. contínua), a atividade da CAT foi ativada 24 h depois da injeção de LPS (p<0,0001), enquanto nos peixes do protocolo com suplementação contínua de *A. vera* (*Aloe* contínua), a atividade aumentou com após 3 h e 6 h de injeção e alcançou maior ativação em 24 h (p<0,0001). Os protocolos de alimentação pulsada (Pulsada/ 15 e pulsada/ 7) promoveram ativação imediata da enzima 3 h após o desafio (p<0,0001), seguida de ligeira redução, mas, sem recuperação do valor basal em até 24h (p=0.0034) (Figura 8B).

Nos peixes do protocolo controle (Contr. contínua) houve um aumento da atividade da GST depois do desafio com LPS, com valores mais elevados em6 e 24 h (p<0,0001). Já os peixes submetidos aos protocolos *Aloe* contínua e Pulsada/ 15 mostraram aumento de atividade às 6 h, mantendo-se elevada às 24 h (p=0,0005 e p=0,0136, respectivamente). Nos peixes submetidos aos protocolos pulsada/ 7, a ativação da GST aconteceu às 3 h (p=0,0014), sem recuperação dos valores basais às 24 h (p=0,1035) (Figura 8C).

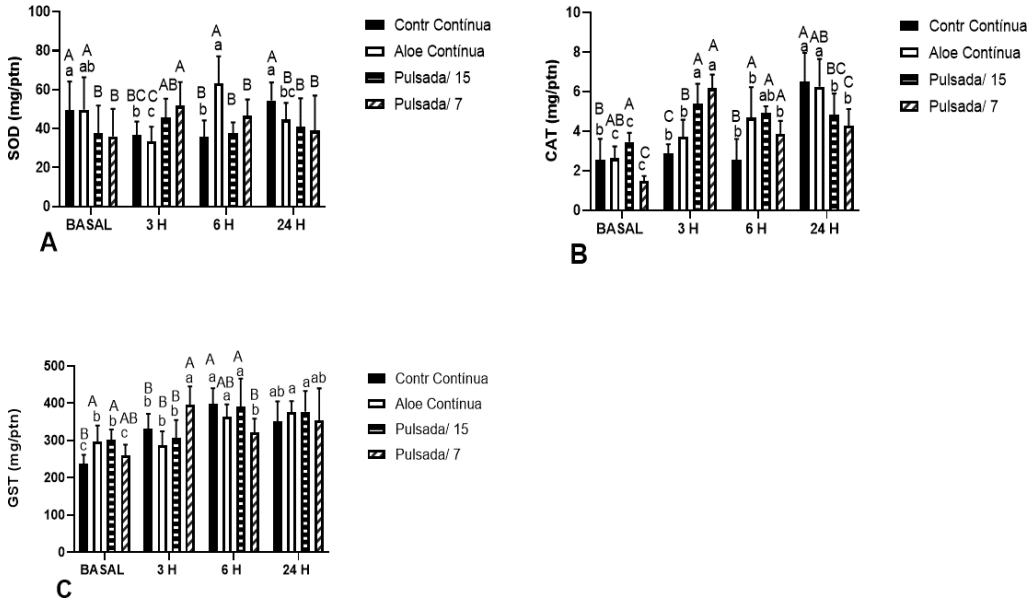

Figura 8. Atividade hepática da superóxido dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), Glutationa S-Transferase (GST) (C), em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada, inoculados como LPS e amostrados 3, 6 e 24 horas após inoculação. Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento e letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de amostragem ($p<0,05$).

5.4.2 Glutationa reduzida (GSH) e Peroxidação Lipídica (LPO)

Após os 29 dias de aplicação dos protocolos alimentares, a concentração de GSH foi menor nos peixes do protocolo pulsada/ 7 ($p<0,0001$). A injeção de LPS promoveu diminuição na concentração de GSH às 3 h nos peixes do Contr. Contínua, com retorno aos níveis basais e estabilidade em 6 h e 24 h ($p<0,0001$). Nos peixes dos protocolos *Aloe* contínua e pulsada/ 15, as concentrações permaneceram sem diferenças significativas às 3 e 6 h, e sofreram redução às 24 h no pulsada/ 15 ($p=0,0005$ e $p=0,0136$, respectivamente). Nos peixes do protocolo pulsada/ 7, a injeção

aumentou a concentração de GSH às 3 h, restabelecendo gradativamente os valores basais em 24 h (p=0,0014) (Figura9A).

Às 3 e 6 h após o desafio com LPS, a LPO foi maior nos peixes do protocolo Contr. contínua (p=0,0341 e p=0,0112, respectivamente). Em relação aos protocolos que utilizaram *A. vera*, não se observou mudanças expressivas nos valores de peroxidação após injeção do LPS, exceto uma leve redução nos peixes do protocolo pulsada/ 15 em 6 e 24 h após o desafio (p= 0,0377). No caso dos protocolos *Aloe* contínua e pulsada/7, não se observou alteração significativa em relação aos valores basais (p=0,8455 e p=0,0824, respectivamente) (Figura 9B).

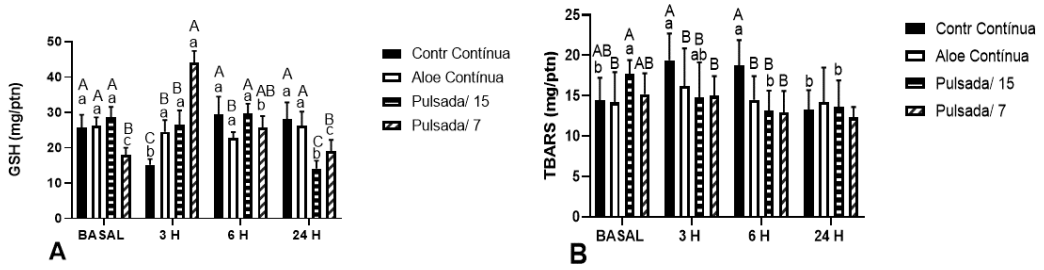

Figura 9. Atividade hepática da glutationa reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO) em juvenis de pacus alimentados com dieta suplementada com *Aloe vera* em protocolo de alimentação contínua e pulsada, inoculados como LPS e amostrados 3, 6 e 24 horas após inoculação. Contr. Contínua: alimentação contínua com ração comercial; *Aloe* Contínua: alimentação contínua com ração comercial suplementada com *Aloe vera*; Pulsada/15: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 15 dias. Pulsada/7: alimentação pulsada com ração comercial suplementada com *A. vera* alternada a cada 7 dias. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento e letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de amostragem (p<0,05).

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a suplementação dietária com *Aloe vera* (1%) em juvenis de pacu, desafiados com LPS após o período de alimentação de 29 dias, quando oferecida por meio de diferentes protocolos, modulou os indicadores estudados. No caso das respostas metabólicas, reduziu as concentrações de lipídeos hepáticos; no sistema imune, reduziu a atividade respiratória após uma resposta inicial de ativação, ativou a atividade hemolítica do sistema complemento e da lisozima logo após o desafio, e minimizou a linfopenia e o aumento de monócitos; por fim, modulou também o sistema antioxidante. Neste sistema, aumentou a atividade hepática da SOD, CAT, GST, bem como a concentração do substrato das enzimas, a GSH, reduzindo, por fim, o estresse oxidativo, com menor peroxidação lipídica.

O presente estudo não revelou diferenças significativas na concentração de glicose plasmática por efeito da *A. vera* ou dos protocolos, mas houve um aumento 3 h depois da injeção de LPS, sugerindo uma condição em que houve necessidade de mobilização de energia. Estudos anteriores mostraram aumentos de glicose em situações de desafio, como transporte e outros manejos de rotina (Carneiro e Urbinati, 2001; Brandão et al., 2006). Estudo de Zanuzzo et al. (2012), em que se utilizou *A. vera* na água de transporte, documentou aumento na concentração inicial de glicose (2 e 4 horas pós-manejo de transporte), embora o uso de *A. vera* diluída não tenha afetado os níveis glicêmicos.

A suplementação contínua com *A. vera* resultou em menor porcentagem de lipídeo hepático sugerindo possível mobilização deste estoque permitindo uma correlação com o aumento do colesterol nos peixes alimentados com *A. vera,* em especial no protocolo Pulsada/7, embora não tenha havido alteração nas concentrações de lipídeos dos músculos ou das vísceras. Em estudo anterior com a mesma espécie de peixe do presente estudo (Assis & Urbinati, 2020), a administração de 1% de extrato de *A. vera* por apenas 7 dias promoveu aumento dos estoques de lipídeos no fígado e músculo, diferente do observado neste estudo, em oferta mais longa do extrato. De acordo com Amri et al. (2022), quanto maior a concentração da *Aloe* administrada, maior a expressão de genes que estimulam a produção de lipídeos e maior o número e diâmetro de vacúolos

lipídicos no fígado, tendo como resultado esteatose e estresse oxidativo. Os autores recomendaram o uso de 0,5% do extrato da planta.

O uso de imunoestimulante tem sido objeto de estudo nos últimos anos, revelando inúmeros fitoquímicos e antimicrobianos de grande importância que permitem a substituição de alguns antibióticos utilizados, um deles vem sendo usado na produção avícola (Khan, 2023). Além disso, tem sido observado um poder imunoestimulante e antioxidante natural em peixes, camarões, coelhos e aves (Vahedi et al., 2011; Trejo-Flores et al., 2018; Assis & Urbinati, 2020).

Como indicador do sistema imune inato, a atividade respiratória dos leucócitos, especialmente fagócitos, é o processo em que essas células produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a fagocitose (Jeney e Anderson, 1993). As EROs desempenham um papel crucial na resposta imune inata e permite uma eficaz destruição de patógenos intracelulares, neutralização de toxinas e facilitação da digestão de partículas fagocitadas (Biller e Takahashi, 2018). Em nosso estudo, o desafio para o sistema imune inato foi realizado com a injeção de LPS, entretanto o aumento da ARL, 3 h depois da injeção, ocorreu igualmente para todos os grupos, inclusive o controle. Às 6 e 24 h, é possível observar que o protocolo de oferta contínua de *A. vera* reduziu a ARL a valores basais, sugerindo maior proteção imune. No estudo de Assis & Urbinati (2020), a atividade respiratória de leucócitos em pacus que receberam 0,5% e 1,0% de extrato de *A. vera*, por 7 dias, aumentou após a alimentação, mas após a inoculação com *A. hydrophila* inativada apenas o extrato a 2% foi capaz de minimizar a explosão respiratória dos leucócitos.

Em relação à atividade da lisozima, outro importante indicador da imunidade inata (Saurabh & Sahoo, 2008), neste estudo houve aumento em 24h após injeção do LPS nos peixes que receberam o extrato de *A. vera*, indicando uma influência positiva do extrato, independente do protocolo pelo qual foi oferecido aos peixes. Além disso, Gabriel et al. (2015) observaram também efeito positivo na atividade sérica de lisozima de Tilápia GIFT, usando 0,5%, 1%, 2% e 4 % de *A. vera* durante 8 semanas. Esse mesmo resultado foi observado em esturjão siberiano (*Acipenser baerii*), entretanto, os animais receberam uma suplementação contínua durante 2 meses numa concentração do extrato de

1,5% (Moghaddam et al., 2016). Embora os protocolos experimentais nos estudos citados sejam diferentes entre si, o extrato de *A. vera* atuou como estimulante do sistema imune dos peixes.

Outro componente importante do sistema imune inato é o sistema complemento, ativado por moléculas da superfície dos micro-organismos e composto por inúmeras proteínas responsáveis por sinalizar a invasão e estimular o processo inflamatório para combater o agente patogênico (Boshra et al., 2006; Biller-Takahashi et al., 2012).

No presente estudo, o extrato de *A. vera* ativou a atividade hemolítica do sistema complemento, logo após o desafio com LPS (3 h), resposta observada em peixes alimentados seguindo os 3 protocolos com dietas suplementadas. Nossos achados vêm reforçar dados já descritos para esta espécies. Em estudo anterior, Assis e Urbinati (2020) relataram que pacus alimentados com 1% de *A. vera* e inoculados com bacterina de *A. hydrophila* apresentaram ativação do sistema complemento 3 h após a inoculação, respostasemelhante à observada no presente estudo, o que confirma a propriedade imunestimuladora da planta e sugere melhora da resistência dos peixes contra infecção bacteriana. Essa ação foi descrita também por Zanuzzo et al. (2017), que relataram que a suplementação de *A. vera* (0,5%, 1% e 2%) na dieta de pacu promoveu um impacto positivo significativo na atividade hemolítica do sistema complemento dependente da concentração do extrato. Os peixes foram desafiados com transporte e inoculação com *A. hydrophila*. E os resultados estão correlacionados com o nosso estudo, no qual foi observada uma ativação da AHC nos tratamentos que receberam suplementação, ao passo que o tratamento controlenão apresentou diferenças significativas entre os tempos de coleta.

As células leucocitárias, como os linfócitos, neutrófilos e monócitos, também fazem parte do sistema de defesa do organismo e respondem aos imunoestimulantes com aumento na produção e atividade das células (Secombes, 1996). Neste estudo, os peixes alimentados com todos os protocolos alimentares apresentaram linfopenia após injeção de LPS, mas, esta foi minimizada nos peixes suplementados com *A. vera*. Estudo de Gabriel et al. (2015) mostrou resultado semelhante. Os autores testaram 4 concentrações de

A. vera, e constataram que os linfócitos diminuíram em todos os grupos experimentais durante período de desafio com *Streptococcus iniae*, exceto nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 4% de *A. vera*.

O comportamento dos monócitos também indicou que a injeção de LPS estimulou a resposta do sistema imune, visto o aumento na população dessas células logo após a injeção. A monocitose é um indicativo de resposta inflamatória, de defesa. Logo após o desafio, essa resposta foi atenuada pelo extrato de *A. vera*, resposta que permaneceu às 6 h, quando nos peixes controle ela foi menor. Pode-se considerar, então, uma resposta positiva mais prolongada nos grupos tratados com o extrato. Estudo de Selvaraj et al. (2005) mostrou queo uso de outro imunoestimulante natural, o β-glucano, também aumentou a presença de monócitos em carpas que passaram por uma infecção por *A. hydrophila.*

Todos esses processos de ajuste fisiológico e defesa através do sistema imunológico são processos que utilizam muita energia (Gimbo et al., 2015) e produzem naturalmente as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e quando somadas a um manejo estressante, o aumento nessa produção pode alcançar o ponto em que o sistema antioxidante naturalmente presente nas células não são eficientes e começam a causar prejuízos ao animal (Barbosa et al., 2010). A ativação das vias responsáveis pela produção e mobilização de energia podem alterar a homeostase redox mitocondrial, essencial para inúmeras funções celulares (Sies, 2018). A atuação dos componentes do sistema antioxidante enzimático ocorre para estabelecer esse equilíbrio, neutralizando e reparando os danos causados por esses compostos. Dessa forma, evita-se a ocorrência de danos oxidativos mais significativos no organismo do animal por meio de antioxidantesenzimáticos e não enzimáticos (Barreiros e David, 2006).

Para fortalecer esse mecanismo, a suplementação natural pode estimular a atividade das enzimas antioxidantes quando expostas a condições de estresse. Além disso, normalmente, esses suplementos contêm compostos que atuam como antioxidantes não enzimáticos, tais como as vitaminas C e E, zinco, bem como alguns polissacarídeos e flavonoides (Shahidi, 2015; Awad & Awaad,2017).

Dentro dos elementos enzimáticos, a superóxido dismutase (SOD) é

destacada como o principal mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, atuando para acelerar a transformação de ânions superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (McCord e Fridovich, 1969). Em conjunto, a SOD inicia a conversão do superóxido, e a enzima catalase (CAT) completa o processo neutralizando o H_2O_2 resultante. Esse sistema é crucial para prevenir danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio e garantir a homeostase redox nas células. A GST age na detoxicação do organismo, eliminação de xenobióticos e outros metabólitos derivados da peroxidação lipídica pela conjugação com a GSH (Raza, 2011; Croom, 2012), e na redução de peróxidos (Regoli et al., 2011).

No presente estudo, o extrato de *A. vera* modulou o sistema antioxidante, por meio do aumento da atividade hepática da SOD, CAT, GST, bem como a concentração do substrato das enzimas, a GSH, reduzindo, por fim, o estresse oxidativo. Ao mesmo tempo que foi possível observar aumento da atividade das enzimas e do substrato GSH, em diferentes momentos do desafio com LPS, houve menor nível de oxidação de lipídeos, mensurado pelo LPO. A peroxidação lipídica (LPO) ocorre como resultado da oxidação, especialmente nos lipídios poli-insaturados das membranas celulares, devido à ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), caracterizando assim o estresse oxidativo (Barrera et al., 2018).

Estudo anterior (Jiang et al., 2022), com peixe dourados (*Carassius auratus*), avaliou a aplicação da Aloe-emodina (AE): 0, 0,08; 0,8 e 8% e documentou aumento nas atividades das enzimas antioxidantes hepáticas, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPX) nas concentrações mais altas, sugerindo aumento na capacidade antioxidante hepática. Kate et al. (2023) utilizaram hortelã como suplemento e expuseram *P. hypothalmus* à amônia, analisando a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no fígadoe nas brânquias em diferentes momentos. Em comparação com o grupo controle, os resultados apontaram que, no tratamento com produtos à base de hortelã, ocorreu uma redução nas atividades de SOD e CAT. O autor interpreta essa diminuição como uma possível eliminação de ânions de oxigênio e uma melhoria no sistema antioxidante.

Em estudo conduzido por Dotta et al. (2018), juvenis de tilápia do Nilo foram alimentados com dietas suplementadas com 1% da mistura de extratos de própolis e babosa e desafiados com *A. hydrophila*. A análise da atividade de enzimas antioxidantes no baço revelou uma resposta mais robusta nas enzimas GR (glutationa reduzida) e CAT, indicando um potencial na ativação do sistema antioxidante desses peixes em comparação com os demais grupos.

Embora, evidências venham mostrando a importância da *A. vera* na modulação dos sistemas imune e antioxidante dos peixes, é necessário que sejam melhor definidos os protocolos experimentais, como por exemplo as concentrações ideais para as diferentes espécies e o tempo de administração, visto que há estudos que mostram que a suplementação de grandes concentrações de *A. vera* ou que protocolos alimentares que não são adequados para a espécie podem promover efeito contrário e causar assim esteatose, aumento da peroxidação lipídica e diminuição da capacidade antioxidante (Golestan et al., 2015; Amri et al., 2022).

7 CONCLUSÃO

A suplementação de *Aloe vera* teve efeito metabólico, modulando a concentração de lipídeos no fígado; estimulou as respostas imunológicas (atividade respiratória de leucócitos, atividade da lisozima e sistema complemento) e enzimáticas antioxidantes (CAT e SOD). Com isso, reduzindo peroxidação em pacus desafiados com a LPS obtido da *Escherichia coli* e reduzindo.

8 REFERÊNCIAS

AHLWAT K. S., KHATKAR B.S**., Proessing, food applications and safety of aloe vera products: a review**. *J Food Sci Technol,* 48:525-533; 2011.

AMRI, A., BOURAOUI, Z., BALBUENA-PECINO, S., CAPILLA, E., GHARRED, T., HAOUAS, Z., GUERBEJ, H., HOSNI, K., NAVARRO, I.,

JEBALI, J. **Dietary supplementation with Aloe vera induces hepatic steatosis and oxidative stress together with a disruption of cellular signaling pathways**

and lipid metabolism-related genes' expression in gilthead sea bream (Sparus aurata). *Aquaculture*, 559, 738433; 2022.

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.

ASCAÑO O. K., TAMPOS C. R., TENDAN J. T., ZAUSA C., TUMAOB K., TEODOSIO T. B., REGATALIO R. **Utilization of Aloe Vera Extract in Making Paper Glue**. A Research Paper, 2010.

ASSIS, R.W.S., URBINATI, E.C. **Physiological activity of Aloe vera in pacu (Piaractus mesopotamicus) inoculated with Aeromonas hydrophila.** *Fish Physiology and Biochemistry*, v.46, p.1421–1430, 2020.

AWAD, ELHAM; AWAAD, AMANI. **Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish.** *Fish & shellfish immunology*, v. 67, p. 40-54, 2017.

BACCHETTA, C.; ROSSI, A. S.; ALE, A.; CAZENAVE, J. **Physiological effects of stocking density on the fish Piaractus mesopotamicus fed with red seaweed (Pyropia columbina) and β-carotene-supplemented diets.** *Aquaculture Research*, v.51. p. 1992-2003, 2020.

BACH, D. B. E LOPES, M. A. **Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (Aloe vera L.).** *Ciência e Agrotecnologia*. v. 31, n. 4 pp. 1136- 1144; 2007.

BARBOSA FILHO, J. S.; OLIVEIRA FILHO, J. S.; GOMES, E. G.O.; MORAES, M. S. B.; PESSÔA FILHO, A. T.; OLIVEIRA, E. J. D.; NASCIMENTO, J. W. A.; CONCEIÇÃO, D. C. O. **Pharmacological properties of Aloe vera: an integrative review.** *Research, Society and Development,* [S. l.], v. 11, n. 3, p. e6311326062, 2022.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R. e BRESSAN, J**. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Revista de Nutrição*, 23, 629-643, 2010.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense.** *World Allergy Organ* J, v. 5, p. 9-19, 2012.

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.

BARRERA, G., PIZZIMENTI, S., DAGA, M., DIANZANI, C., ARCARO, A., CETRANGOLO, G.P., GIORDANO, G., CUCCI, M.A., GRAF, M. AND GENTILE, F. **Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders**. *Antioxidants*, 7(8), p.102.;2018.

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.

BARTON, B.A.; MORGAN, J.D.; VIJAYAN, M.M. **Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish.** *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, p.111-148; 2002.

BASTOS, V. C., SALLES, J. B., VALENTE, R. H., LEÓN, I. R., PERALES, J., DANTAS, R. F., ALBANO, R. M., BASTOS, F. F., BASTOS, J. C. **Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (Piaractus mesopotamicus), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal.** *Biochimie*, v.89, n.11, p.1332-1342; 2007.

BAYNE C. J., GERWICK L. **The acute phase response and innate immunity of fish.** Developmental and Comparative Immunology, v.25, p.725-43; 2001.

BOSHRA H., LI J., SUNYER J.O. **Recent advances on the complementsystem of teleost fish**. Fish Shellfish Immunol 20:239–262; 2006.

MOGHADDAM, S.B., HAGHIGHI, M., SHARIF ROHANI, M., HAMIDI, M., & GHASEMI, M. **The effects of different levels of Aloe vera extract on some of the hematological and non-specific immune parameters in Siberian sturgeon (Acipenser baerii).** Iranian Journal of Fisheries Sciences, 16(4), 1234-1247. (2017).

BEUTLER E., DURAN O., KELLY, B. M. **Improved method for the determination of blood glutathione.** *Journal of Laboratory and ClinicalMedicine*. p. 861,882, 1963.

BI, D., WANG, Y., GAO, Y., LI, X., CHU, Q., CUI, J., & XU, T**. Recognition of lipopolysaccharide and activation of NF-κB by cytosolic sensor NOD1 in teleost fish.** Frontiers in Immunology, v.9, p.1413, 2018.

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

BICUDO, A. J. A., ABIMORAD, E. G., CARNEIRO, D. J., **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies para a aquicultura brasileira.** 1ª edição ampliada. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis, 2016. p 217-226.

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.

BILLER-TAKAHASHI J.D, TAKAHASHI L.S, MINGATTO F. E.; URBINATI E.C. **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, J. D.; TAKAHASHI, L. S. **Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 90, p. 3403-3414, 2018.

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

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.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. **Amphibians declines: an immunological perspective**. *Developmental and Comparative Immunology*, New York, v.23, p.459-472, 1999.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2001**. Salt as a stress response mitigator of matrinxã Brycon cephalus (Teleostei: Characidae) during transport**. *Aquaculture Research*, v.32, p.297-304, 2001.

CROOM E. **Metabolism of xenobiotics of human environments**. *Prog Mol Biol Transl* Sci 112:31–88; 2012.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE. L. E. C. Immune system – Part I. **Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular**

mechanisms of inflammatory responses. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, p. 434-461, 2010.

DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. **Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES).** *Journal of Fish Diseases,* v.20, p.241-273; 1997.

DORR A.J.M., PACINI N., ABATE M.C. AND M. PREARO. **Effects of a seleniumenriched diet on antioxidant response in adult crayfish (Procambarus clarkia).** *Chemosphere*, v. 73, p.1090-1095; 2008.

DOTTA, G., DE ANDRADE, J. I. A., GONÇALVES, E. L. T., BRUM, A., MATTOS, J. J., MARASCHIN, M., & MARTINS, M. L. **Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and Aloe barbadensis.** *Fish & Shellfish Immunology,* 39(2), 280-284.-284; 2014.

DOTTA G., ANDRADE J. I. A., GARCIA P., JESUS G. F. A., MOURIÑO J. L. P., MATTOS J. J., BAINY A. C. D. B, MARTINS M. L. **Antioxidant enzymes, hematology and histology of spleen in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts challenged with Aeromonas hydrophila.** *Fish & shellfish immunology,* v. 79, p. 175-180; 2018.

ELLIS A.E. **Stress and modulation of defense mechanisms in fish.** In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI E.C.; FRACALOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI N. 2004. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. SãoPaulo: TecArt, p.147165; 1981

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

ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. **Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport.** *Jounal ofFish Bioogy*, v.28, p.511-521; 1986.

FERREIRA, C. S. M., DA SILVA, E. C., DE SOUSA GASPAR, F. D., & VENEZA, I. B. **Torta de buriti (Mauritia flexuosa) como ingrediente alternativo em rações para juvenis de Tambaqui (Colossoma macropomum).** *Research, Society and Development,* 10(8), e24510817345-e24510817345; 2021.

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.

FRANCO R, MARTINEZ-PINILLA E**. Chemical rules on the assessment of antioxidant potential in food and food additives aimed at reducing oxidative stress and neurodegeneration.** *Food Chem*. 235:318–323; 2017

GABRIEL, N. N., QIANG, J., HE, J., MA, X. Y., KPUNDEH, M. D., & XU, P. **Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against Streptococcus iniae in tilapia (GIFT).** *Fish & Shellfish Immunology*, 44(2), 504-514; 2015.

GIMBO R. Y., FÁVERO G. C., MONTOYA L. N. F., URBINATI E. C., **Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (Piaractus mesopotamicus),** *Fish & Shellfish Immunology,* Volume 43, Issue 2, Pages 295-300, ISSN 1050-4648; 2015.

GOETZ, F.W.; ILIEV, D.B.; MCCAULEY, L.A.R.; LIARTE, C.Q.; TORT, L.B.; PLANAS, J.V.; MACKENZIE, S. **Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) macrophages.** *Molecular Immunology*, v.41, p.1199-1210; 2004.

GODOY, H.B.R.; LANDELL-FILHO, L.C.; BIANCHINI-SOBRINHO, E. GODOY, M.M.**O uso da silagem de subprodutos da filetagem de peixe na alimentação de suínos em crescimento – parâmetros séricos.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.45, n.6, p.429-436; 2008.

GOLESTAN, G., SALATI, A.P., KEYVANSHOKOOH, S., ZAKERI, M. AND MORADIAN, H., 2015. **Effect of dietary aloe vera on growth and lipid peroxidation indices in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).** In *Veterinary Research Forum*; Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University,Urmia, Iran; Vol. 6, No. 1, p. 63; 2015.

GOMES, J.D.C.; AMARAL, A.M.B.; STORCK, T.R. et al. **Can Vitamin C Supplementation Improve the Antioxidant Capacity of Rhamdia quelen Fish Exposed to Atrazine?** *Arch Environ Contam Toxicol* 82, 551–557; 2022.

HABEEB, F.; SHAKIR, E.; BRADBURY, F.; CAMERON, P.; TARAVATI, M.R.; DRUMMOND, A.J.; GRAY, A.I. FERRO, V.A. **Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel. *Methods***, v.42,

p.315–320; 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts**. *Archives of biochemistry and biophysics*, *246*(2), 501-514.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine.** *Oxford: Clarendon Press*, p. 543; 1989.

HAMMAN, J.H. **Composition and applications of Aloe vera leaf gel.** *Molecules* v.13, p.1599–1616; 2008.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals.** *Functional metabolism: regulation and adaptation*, p. 319-368; 2004.

HOLMGREN, Arne. **Thioredoxin.** *Annual review of biochemistry,* v. 54, n. 1,p. 237-271; 1985

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

HOSEINIFAR, S.H., YOUSEFI, S., DOAN, H.V., ASHOURI, G., GIOACCHINI, G., MARADONNA, F., CARNEVALI, O. **Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics.** *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 29(2), 198-217; 2020

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. **Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific mechanisms in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).** *Aquaculture,* v.116,p.315-319, 1993.

JIANG J., PAN H., CHANG O, ZHANG D., XIE J., REN Y., WANG L., KANG J., WANG Y., SHI C. **Effects of Aloe-emodin on growth performance, biochemical parameters, and histopathology of goldfish (Carassius auratus).** *Aquaculture*, v. 550, p. 737891; 2022.

KATE, G. U.; KRISHNANI, K. K.; KUMAR, N.; SUKHDHANE, K.; VERMA, A. K.; BRAHMANE, M. P.; CHADHA, N. K.; KUMAR, J. **Abiotic and biotic stress relief effects of medicinal and aromatic plant-derived product in striped catfish Pangasianodon hypophthalmus.** *Fish & Shellfish Immunology*, 135,108625; 2023.

KAY, M.M.B.; BOSMAN, G.J.C.G.M.; SHAPIRO, S.S.; BENDICH, A.; BASSEL, P.S. **Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes**.

Proceedings of the National Academy of Sciences v.83, p.2463-2467; 1986.

KHAN, R. U., NAZ, S., DE MARZO, D., DIMUCCIO, M. M., BOZZO, G., TUFARELLI, V., RAGNI, M. **Aloe vera: a sustainable green alternative to exclude antibiotics in modern poultry production.** *Antibiotics*, 12(1), 44; 2022.

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

KEEN J. H.; HABIG W. H.; JAKOBY W. B. **Mechanism of the several activities of the glutathione S-transferases.** *Journal of Biology Chemistry v.* 251 p. 61836188; 1976.

KRAHWINKEL, D. J.; BOOTHE JUNIOR, H. W. **Topical and SystemicMedications for Wounds.** *The Veterinary Clinics of Small Animals,* v.36, p.739-757; 2006.

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.

MCCORD J.M.; FRIDOVICH, I. **Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprien).** *Journal of Biological Chemistry,* 244, 6049-6055; 1969.

MELLO, M.M.M.; FARIA, C.F.P; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **β-glucan modulates cortisol levels in stressed pacu (Piaractus mesopotamicus) inoculated with heat-killed Aeromonas hydrophila.** Fish & Shellfish Immunology, v.93, p.1076-1083; 2019.

MISHRA, V.; SHAH, C.; MOKASHE, N.; CHAVAN, R.; YADAV, H.; PRAJAPATI, J. **Probiotics as potential antioxidants: a systematic review.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.63, n.14, p.3615–3626; 2015.

MOGHADDAM, S.B., HAGHIGHI, M., SHARIF ROHANI, M., HAMIDI, M., & GHASEMI, M. **The effects of different levels of Aloe vera extract on someof the hematological and non-specific immune parameters in Siberian sturgeon (Acipenser baerii).** *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(4), 1234-1247. 2017

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.

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.

NGUYEN, T. H., AGBOHESSOU, P. S., KESTEMONT, P., NGUYEN, Q. H., TRAN, N. T., KESTEMONT, P. **Immune responses and acute inflammation in common carp Cyprinus carpio injected by E. coli lipopolysaccharide (LPS) as affected by dietary oils.** *Fish & Shellfish Immunology*, P.1-12; 2022.

OLIVEIRA-JUNIOR, A. A; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L. **Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, Podocnemis expansa (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells.** *Research in Veterinary Science*, 86: 146–151; 2008.

PAULSEN, S. M., LUNDE, H., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. **In vivo effects of β-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (Salmo salar).** *Fish & Shellfish Immunology*,v.14, p.39-54; 2003.

PEIXEBR. **Anuário Peixe BR da piscicultura 2022.** Associação Brasileira da Piscicultura, São Paulo, 12 p., 2023. Disponível em: https://www.peixebr.com.br/Anuario2023/AnuarioPeixeBR2023.pdf. Acesso em: Dezembro 2023.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. **Impaired glutathione redox status in associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves,** *Chemosphere*, p. 214-226; 2002.

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.363370; 1978.

RAJESWARI, R.; UMADEVI, M.; RAHALE, C.S.; PUSHPA, R.; SELVAVENKADESH, S.; KUMAR, K.P.S.; BHOWMIK, D. **Aloe vera: the miracle plant its medicinal and traditional uses in India.** *Journal of Pharmacognosis and Phytochemistry*, v.1, p.118–124; 2014.

RAUTA, P. R, NAYAK, B.; Das, S. **Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms**. *Immunology Letters* v. 148:23 –3; 2012.

RAZA H. **Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease.** FEBS J. 278:4243–4251; 2011.

REGOLI F., GIULIANI M.E., BENEDETTI M., ARUKWE A. **Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple conferetissues.** Aquatic Toxicol 105S:56–66; 2011.

ROSENFELD, G. **Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grüwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido.** *Memórias do Instituto Butantan*, v.20, p.329-334; 1947.

SAKAI M., **Current research status of fish immunostimulants,** Aquaculture v.172, p.63-92; 1999.

SÁNCHEZ-MACHADO, D.I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SENDÓN, R; SANCHES-SILVA, A. **Aloe vera: ancient knowledge with new frontiers.** *Trends of Food and Science Technology*, v.61, p.94–102; 2017.

SANTOS, M. Q. D. C., LIMA, M. D. A. C., SANTOS, L. D., PEREIRA-FILHO, M., ONO, E. A., & AFFONSO, E. G. **Estratégias alimentares e relação entreenergia e proteína sobre o desempenho e a fisiologia de tambaqui.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, p.955-961; 2013.

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 offish. In: Infectious disease**. In: Aquaculture Prevention and Control, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p.3-68; 2012.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment.** San Diego: Academic Press, p.63-103; 1996.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. **Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (Cyprinus carpio) infected with Aeromonas hydrophila.** *Fish & Shellfish Immunology*, v.19, p.293-306; 2005.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. **Phenolics and polyphenolics in foods, beverages, and spices: Antioxidant activity and health effects–A review.***Journal*

of functional foods, v. 18, p. 820-897; 2015

SHEPHERD, B.S.; SPEAR, A.R.; PHILIP, A.M.; LEAMAN, D.W.; STEPIEN, C.A.; SEPULVEDA-VILLETE, O.J.; PALMQUIST, D.E.; VIJAYAN, M.M. **Effects of cortisol and lipopolysaccharide on expression of select growth-, stress- and immune-related genes in rainbow trout liver.** *Fish &Shellfish Immunology* v. 74, p. 410–418; 2018

SIES, H.. **On the history of oxidative stress: concept and some aspects of current development**. *Cur. Opin. Toxicol*. 7, 122–126; 2018.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, AJJOVA. **Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity.** *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 16, n. 3, p. 402- 413; 2010.

SIWICKI A.K., ANDERSON D. P., RUMSEY G. L. **Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis.** *Veterinary Immunology and Immunopathology,* v.41, p.125- 139; 1994.

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

STEVENS, N. **O Poder Curativo da Babosa,** 1999. Disponível em: <http://www.naturama online.com.br/aloe-vera/>. Acesso em: Agosto 2022.

SWAIN, P.; NAYAK, S.; NANDA, P.K.; DASH, S. **Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review.** Fish & Shellfish Immunology, v.25, p.191–201; 2008.

TACHIBANA, L., TELLI, G.S., DIAS, D.C., GONÇALVES, G.S., ISHIKAWA, C.M., CAVALCANTE, R.B., NATORI, M.M., HAMED, S.B., RANZANI-PAIVA, M.J.T. **Effect of feeding strategy of probiotic Enterococcus faecium on growth performance, hematologic, biochemical parameters, and non- specific immune response of Nile tilapia***. Aquaculture Reports,* 16, 100277;2020.

TADESE, D. A., SONG, C. Y., SUN, C. X., LIU, B., ZHOU, Q. L, XU, P., GE, X. P.], LIU, M. Y., XU, X. D., TAMIRU, M., ZHOU, Z. G., LAKEW, A., KEVIN, N. T**. The role of medicinal plants currently used in aquaculture and their mechanisms of action: A review**. *Reviews in Aquaculture,* 14(2), 816-847; 2022.

TIZARD I.R**. Imunologia veterinária: uma introdução.** São Paulo: Roca, 2002.

TREJO-FLORES, J. V., LUNA-GONZÁLEZ, A., ÁLVAREZ-RUIZ, P., ESCAMILLA-MONTES, R., FIERRO-CORONADO, J. A., PERAZA-GÓMEZ,
V., RUBIO-CASTRO, A**. Immune-related gene expression in Penaeus vannamei fed Aloe vera.** *Latin american journal of aquatic research*, 46(4), 756-764; 2018.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.71-193; 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 fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP, p.87-105; 2014.

URBINATI, E. C.; TAKAHASHI, L. S. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** 3ª edição. Santa Maria. Editora UFMS; 2020.

VAHEDI, G., TAGHAVI, M., MALEKI, A. K., & HABIBIAN, R. **The effect of Aloe vera extract on humoral and cellular immune response in rabbit.** *African Journal of Biotechnology*, 10(26), 5225-5228; 2011.

WANG C, YUE X, LU X, LIU B. **The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam Meretrix meretrix.** Fish Shellfish Immunol. 34(1):91–99; 2013.